

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**EXPRESSION ET FONCTION DE LA PROTÉINE SURVIVINE
DANS LE MYÉLOME MULTIPLE :
IMPLICATIONS CLINICO-BIOLOGIQUES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Hématologie

présentée

et soutenue publiquement par

ROMAGNOLI Mathilde

le 09 avril 2008, devant le jury ci-dessous

Président M. R. BATAILLE Professeur, Université de Nantes

Rapporteurs M. C. PRIGENT Directeur de Recherche, CNRS UMR6061, Rennes

M. O. COQUERET Professeur, Université d'Angers

Examineurs M. T. FEST Professeur, Université de Rennes

Directrice de thèse Mme S. BARILLE-NION

INTRODUCTION.....	6
LE CYCLE CELLULAIRE	7
I. Introduction.....	7
II. Déroulement du cycle cellulaire	7
1. La phase G1.....	9
2. La transition G1/S.....	10
3. La transition G2/M	11
III. Les points de contrôle du cycle cellulaire	12
A. Le point de contrôle du dommage à l'ADN	12
B. Le point de contrôle de la phase S.....	13
C. Le point de contrôle dépendant des topoisomérases II	13
D. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique	14
1. Les acteurs du SAC.....	14
2. Le contrôle de l'attachement et de la tension par le SAC.....	16
3. La régulation du SAC et la sortie de mitose par le CPC.....	17
V. Dérégulation du cycle cellulaire dans les cancers	19
A. Prolifération indépendante des signaux de croissance	19
B. Prolifération insensible aux points de contrôle.....	20
L'APOPTOSE	22
I. Introduction.....	22
II. Les caspases	23
A. Structure et fonction	23
B. Activation des caspases	25
III. Les voies d'apoptose	26
A. La voie extrinsèque des récepteurs de mort.....	26
1. La superfamille des TNF-R	26
2. Régulation de la voie extrinsèque	28
B. La voie intrinsèque mitochondriale.....	29
1. Le rôle de la mitochondrie.....	29
2. Mécanismes de l'apoptose mitochondriale « classique ».....	30
3. L'apoptose liée au stress du réticulum endoplasmique.....	31
IV. La régulation de la mort cellulaire	32
A. La famille Bcl-2.....	32
1. Découverte de la famille Bcl-2	32
2. Structure.....	32
3. Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.....	34
4. Mécanismes d'activation de Bax et Bak	35
B. La famille des IAP	37

1. Découverte de la famille des IAP	37
2. Structure.....	38
3. Expression	39
4. Inhibition des caspases.....	40
5. Régulation protéique des IAP	42
<i>Ubiquitination et dégradation</i>	42
<i>Les antagonistes endogènes des IAP</i>	43
V. Dérégulation de l'apoptose dans les cancers	44
LE MYELOME MULTIPLE	47
I. Introduction.....	47
II. Oncogenèse du MM et évolution de la maladie	48
A. Origine du MM.....	48
B. Oncogenèse du MM	49
C. Classification et diagnostic	50
III. Biologie du MM	51
A. Instabilité génomique du MM	51
1. Les translocations.....	52
2. L'hyperdiploïdie	52
3. Les délétions du chromosome 13	53
4. Gain du chromosome 1q.....	53
5. Perte du chromosome 17p.....	54
B. Dérégulation de l'homéostasie cellulaire	54
1. Dérégulation du cycle cellulaire.....	54
<i>L'index de prolifération</i>	54
<i>Les molécules du cycle cellulaire</i>	55
<i>Le rôle des centrosomes</i>	57
2. Dérégulation de l'apoptose	58
<i>La famille Bcl-2</i>	58
<i>La famille des IAP</i>	58
<i>Réponse UPR et protéines HSP</i>	59
3. L'expression du CD45	60
C. Le rôle de l'environnement médullaire	62
D. Le rôle des cytokines et voies de signalisation.....	63
1. L'IL6	63
2. L'IGF1	65
3. La voie NF- κ B	65
<i>Les voies NF-κB classique et alternative</i>	65
<i>L'intérêt de l'extinction de la voie NF-κB dans le traitement du MM</i>	67
<i>Anomalies génétiques de la voie NF-κB dans le MM</i>	67
IV. Les facteurs pronostiques.....	68

A. Les facteurs intrinsèques au clone plasmocytaire	69
B. Facteurs liés à la masse tumorale	69
C. Facteurs liés à la résorption osseuse.....	70
D. Facteurs génétiques.....	71
V. Les traitements.....	72
LA PROTEINE SURVIVINE	74
I. Introduction.....	74
II. Découverte et expression tissulaire	75
III. Structure protéique	75
IV. Régulation de l'expression	77
A. Régulation transcriptionnelle.....	77
1. Le promoteur du gène <i>survivine</i>	77
<i>Régulation dépendante du cycle cellulaire</i>	<i>77</i>
<i>Régulation indépendante du cycle cellulaire</i>	<i>78</i>
2. Les variants d'épissage de la survivine	80
B. Régulations post-traductionnelles	81
1. Phosphorylation.....	81
2. Ubiquitination.....	82
VI. Fonctions cellulaires.....	83
A. Une double fonction	83
B. Cycle cellulaire	84
1. Membre du complexe CPC	84
2. Protéine associée aux microtubules.....	85
3. Promotion de la transition G1/S	86
C. Apoptose.....	86
1. Une protéine de la famille des IAP	86
2. Blocage de l'apoptose dans les cellules en interphase	87
<i>Compartmentation de la survivine.....</i>	<i>87</i>
<i>Coopération moléculaire.....</i>	<i>88</i>
3. Blocage de la catastrophe mitotique	89
<i>Phosphorylation par Cdk1</i>	<i>89</i>
<i>Coopération avec Aurora-B</i>	<i>90</i>
VII. Implications physiologiques et pathologiques	92
A. Développement de l'embryon	92
B. Cellules normales chez l'adulte.....	93
C. Pathologies	94
VI. Outils en cancérologie	94
A. Pronostic.....	94
B. Cible thérapeutique	95

RESULTATS.....	97
ARTICLE 1 :.....	99
L'impact significatif de la survivine dans la croissance myélomateuse	99
ARTICLE 2 :.....	103
La balance entre Survivine et Bim régule la croissance tumorale.....	103
et corrèle avec le pronostic des patients atteints de MM	103
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	138
ANNEXE 1 : ARTICLE.....	152
ANNEXE 2 : REVUE.....	155
BIBLIOGRAPHIE.....	170

TABLE DES ILLUSTRATIONS:

Figure 1 : Schéma du déroulement du cycle cellulaire	7
Figure 2 : Principaux complexes Cycline-Cdk au cours du déroulement du cycle cellulaire	8
Figure 3 : Relation entre le SAC et la machinerie du cycle cellulaire	14
Figure 4 : Différents types d'attachement des chromosomes au fuseau mitotique	15
Figure 5 : Localisations et fonctions du complexe CPC au cours de la mitose	17
Figure 6 : Structure des caspases	23
Figure 7 : Superfamille des récepteurs du TNF	26
Figure 8 : Libération des protéines apoptogéniques à partir de la mitochondrie	29
Figure 9 : Structure des membres de la famille Bcl-2	32
Figure 10 : Rôle central de la famille Bcl-2 dans l'intégration des signaux de mort et de survie	34
Figure 11 : Modèles d'activation de Bax et Bak par les protéines « BH3-only »	35
Figure 12 : Structure des membres de la famille des IAP	37
Figure 13 : Rôle de XIAP dans l'inhibition des caspases	39
Figure 14 : Interactions de XIAP avec les Caspases-3 et -9	40
Figure 15 : Développement et différenciation des lymphocytes B	47
Figure 16 : Evénements génétiques et évolution biologique du MM	49
Figure 17 : Modèle de dérégulation des cyclines de type D dans le MM	55
Figure 18 : Modèle cellulaire pour la croissance et la maturation du MM sur la base de l'hétérogénéité de l'expression du CD45	60
Figure 19 : Interactions entre les cellules de MM et le microenvironnement médullaire	62
Figure 20 : Principales voies de signalisation activées par l'IL6 et l'IGF1 dans le MM	63
Figure 21 : Voies NF-κB classique et alternative	65
Figure 22 : Différents niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la survivine	77
Figure 23 : Modèle d'activité de la survivine selon sa localisation et le cycle cellulaire	90

INTRODUCTION

LE CYCLE CELLULAIRE

I. Introduction

Le cycle cellulaire est un processus universel par lequel les cellules se reproduisent, soutenant ainsi la croissance et le développement de tous les organismes vivants. Les événements les plus importants du cycle cellulaire concernent la copie puis le partage du matériel héréditaire, c'est-à-dire la réplication de l'ADN chromosomique durant la phase S et la séparation des chromosomes répliqués durant la mitose. Le cycle cellulaire est orchestré afin que ses événements se déroulent selon une chronologie précise et avec une grande fiabilité, veillant à la correction des erreurs survenues au cours de leur exécution. Les mécanismes moléculaires de ces contrôles sont hautement conservés de l'eucaryote unicellulaire au métazoaire complexe tel que l'Homme (Nurse 2000). La perte de précision dans l'exécution du cycle cellulaire entraîne l'augmentation de l'instabilité génétique, un facteur maintenant bien connu dans la survenue des cancers. L'utilisation de modèles cellulaires eucaryotes comme la levure et le xénope, plus facilement manipulables que les cellules humaines, constituent de précieux outils pour l'identification et la compréhension de ces mécanismes moléculaires.

II. Déroulement du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases principales (Figure 1). La cellule synthétise des ARN et des protéines durant la phase G1, se préparant à la synthèse de l'ADN pour la réplication des chromosomes durant la phase S (synthèse). Après avoir traversé la phase G2, la cellule s'engage dans le processus complexe de la mitose (phase M) assurant la séparation des chromosomes entre les deux futures cellules filles individualisées ensuite par cytotéiérèse. Les phases G1 et G2 sont des intervalles (G pour « gaps ») de préparation de la cellule à des processus essentiels. L'ensemble des phases G1, S et G2 constitue l'interphase : période qui sépare deux mitoses. La plupart des cellules de vertébrés qui ne prolifèrent pas quittent le cycle en G1 pour entrer dans une phase de quiescence notée G0.

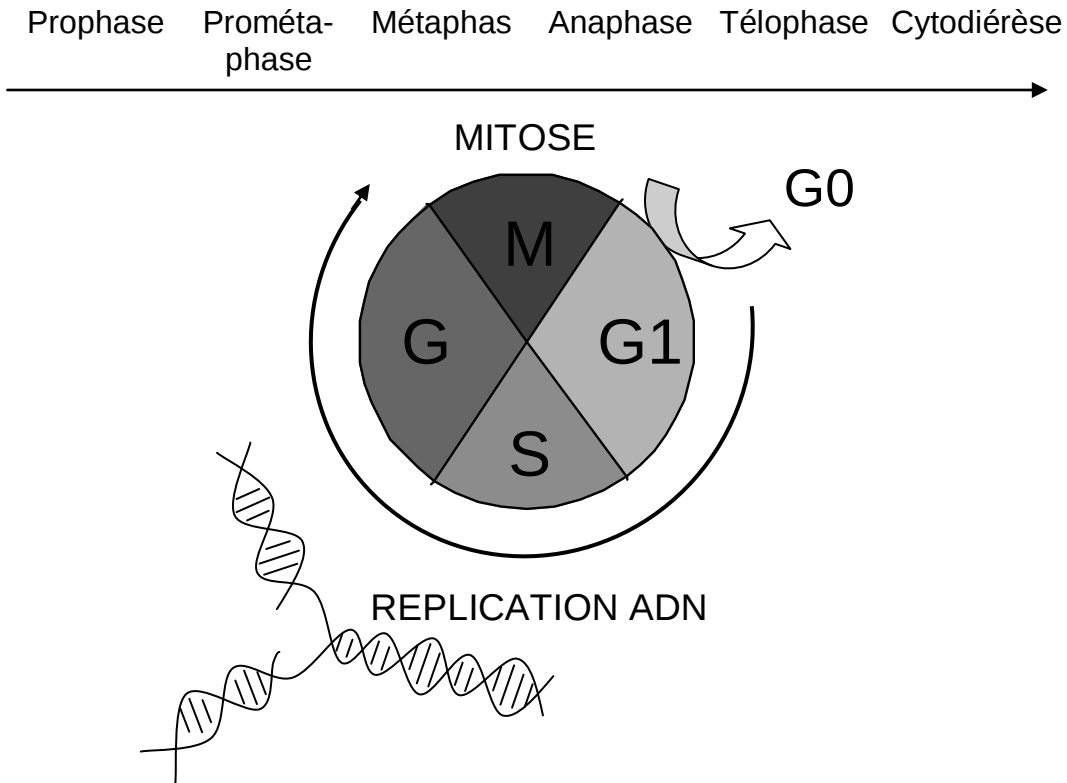


Figure 1 : Schéma du déroulement du cycle cellulaire

G0 = phase de quiescence, G1 et G2 = intervalles de préparation, S = synthèse ou réplication de l'ADN, M = mitose qui comprend: prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télaphase et cytotdiérèse (photos obtenues par microscopie électronique, 1200x, Nultsch W et Grahle A)

Les principaux acteurs du cycle cellulaire sont des protéines kinases hétérodimériques à activité sérine/thréonine (Figure 2). Ces complexes sont composés d'une unité catalytique (Cdk pour « cyclin-dependent kinase ») qui correspond à une kinase dont l'activité est dépendante d'une unité régulatrice appelée Cycline car synthétisée et dégradée à chaque cycle (Malumbres and Barbacid 2005). L'activité de ces complexes peut être bloquée par des inhibiteurs regroupés sous le terme de CDKI (« Cdk inhibitors »). Deux familles de CDKI ont été identifiées : la famille INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}) et la famille Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) (Sherr and Roberts 1999).

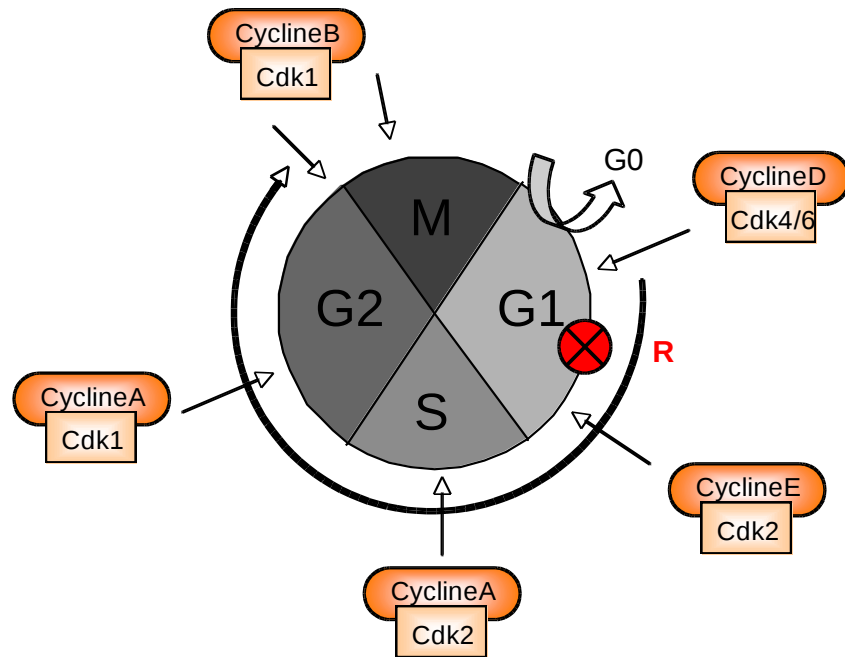


Figure 2 : Principaux complexes Cycline-Cdk au cours du déroulement du cycle cellulaire.

G0 = phase de quiescence, R = point de restriction, G1 et G2 = intervalles de préparation, S = synthèse ou réplication de l'ADN, M = mitose.

1. La phase G1

L'entrée dans le cycle est en étroite relation avec des signaux extérieurs afin de synchroniser cycle cellulaire et croissance. Cultivées en l'absence de facteur de croissance, les cellules de mammifères sont à l'état diploïde et arrêtées en phase G0. Après l'apport en facteurs de croissance, ces cellules dites quiescentes franchissent le point de restriction qui leur permet d'initier et de progresser à travers la phase G1 vers la phase S (Blagosklonny and Pardee 2002). Le début de la phase G1 est la seule partie du cycle cellulaire dépendante des facteurs de croissance, elle est dite dépendante des mitogènes. En effet, une fois le point de restriction franchi, la privation en facteurs de croissance n'est plus capable de bloquer la progression du cycle cellulaire.

La transition du point de restriction est permise par l'accumulation de protéines dont la synthèse est sensible aux facteurs de croissance. La famille des cyclines de type D a été montrée comme étant impliquée dans cette transition. Les facteurs de croissance régulent la CyclineD1 au moyen de quatre mécanismes : induction de sa transcription, protection vis-à-vis du protéasome, translocation au noyau et assemblage avec ses partenaires catalytiques

(Cdk4 et Cdk6) (Ekholm and Reed 2000). L'activation précoce de la voie des MAPK de type ERK puis l'activation plus tardive de la voie PI3K/Akt sont requises pour la transition G1/S induite par les facteurs de croissance (Jones and Kazlauskas 2001). Une fois assemblés, les complexes CyclineD-Cdk4 et CyclineD-Cdk6 actifs phosphorylent les membres de la famille des protéines du rétinoblastome (Rb) (Hinds et al. 1992) qui comprend Rb, p107 et p130. Ces protéines comportent de multiples sites de phosphorylation pour les Cdk, par exemple Rb en possède 16, seuls quelques-uns sont reconnus par les complexes CyclineD-Cdk. Des études *in vitro* ont démontré qu'il existait une redondance entre Cdk4 et Cdk6 et aussi parmi les cyclines de type D. Il est probable que les propriétés uniques de ces molécules soient liées à leur spécificité tissulaire et/ou leur activation différentielle au cours du développement (Ciemerych and Sicinski 2005).

La forme non-phosphorylée de Rb bloque la transition G1/S par sa liaison au facteur de transcription E2F et par la répression de la transcription. La phosphorylation de Rb l'empêche de se lier à E2F qui peut alors induire ou réprimer la transcription de nombreux gènes nécessaires à la transition G1/S. Notamment, E2F1 permet la trans-activation de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des nucléotides et la synthèse d'ADN. La dépendance en facteurs de croissance s'arrête avec la phosphorylation de Rb en milieu de phase G1 (Weinberg 1995). Cependant, d'autres acteurs protéiques interviennent ensuite pour amplifier le mécanisme. En effet, E2F1 induit l'expression de la CyclineE qui forme un complexe avec Cdk2 et nécessaire à une complète phosphorylation de Rb. De plus, CyclineE-Cdk2 phosphoryle p27^{Kip1}, entraînant la dégradation de cet inhibiteur (Blagosklonny and Pardee 2002).

2. La transition G1/S

En plus de la phosphorylation de Rb, l'activité kinase du complexe CyclineE-Cdk2 est essentielle à l'initiation de la réplication de l'ADN en favorisant la localisation des protéines de maintenance des chromosomes (MCM) au niveau des origines de réplication. D'autres substrats sont connus pour être phosphorylés par CyclineE-Cdk2, comme des protéines impliquées dans la modification des histones, la réplication et la réparation de l'ADN, ou encore la duplication et la maturation des centrosomes (Malumbres and Barbacid 2005). Mais une fois entré en phase S, il est nécessaire que ce complexe soit dégradé afin d'éviter un phénomène de re-réplication. Ceci est assuré en partie par la rapide dégradation de la CyclineE par le protéasome au moyen de l'ubiquitine ligase SCF.

Après la dégradation de la CyclineE, Cdk2 s'associe aux Cyclines de type A nouvellement synthétisées grâce à la forte inactivation de Rb qui a permis leur transcription. La CyclineA-Cdk2 peut alors phosphoryler de nombreuses protéines requises dans la propre progression de la phase S ainsi que sa sortie. Ces protéines incluent des régulateurs de la CyclineA (Rb), des facteurs de transcription (E2F1), des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, la modification des histones, la protéolyse dépendante de l'ubiquitine ainsi que les points de contrôle du cycle cellulaire (p53, p21^{Cip1}, MDM2) (Sherr and Roberts 1999).

3. La transition G2/M

En fin de phase S, les cyclines de type A s'associent à Cdk1. Les complexes CyclineA-Cdk2 et CyclineA-Cdk1 partagent plusieurs substrats tels que les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN (MCM et Cdc7) ou dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (Rb, p53 et BRCA2). Le rôle différentiel de ces deux complexes au cours des phases S et G2 reste obscur. Pendant la phase S, les cyclines de type A sont dégradées par le protéasome et les cyclines de type B sont activement synthétisées (Malumbres and Barbacid 2005).

Cdk1 se lie alors aux cyclines de type B formant un complexe essentiel pour l'enclenchement de la mitose. Cdk1 se lie préférentiellement aux isoformes B1 et B2 des cyclines B. Le rôle de l'isoforme B3 n'est pas encore bien compris. Le complexe CyclineB-Cdk1, appelé MPF pour « mitose promoting factor », régulent plusieurs événements au cours de la transition G2/M et de la progression à travers la mitose. Dans le cytoplasme, le MPF s'associe aux centrosomes durant la prophase, où il induit la séparation des centrosomes. Le MPF est aussi impliqué dans différents processus comme la condensation des chromosomes, la fragmentation du réseau Golgien et la dissociation de l'enveloppe nucléaire (Malumbres and Barbacid 2005). En fait, le MPF pourrait phosphoryler plus de 70 protéines chez les mammifères et une étude de criblage des substrats de Cdk1 chez les levures semble considérablement allonger cette liste (Ubersax et al. 2003). L'inactivation du MPF est indispensable pour la sortie de mitose. Ceci est assuré par l'APC/C (« anaphase promoting complex/cyclosome ») qui envoie le MPF vers le protéasome et donc induit sa dégradation.

III. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, les points de contrôle établissent une relation de dépendance entre deux processus biochimiquement indépendants, assurant ainsi la réalisation complète d'une phase du cycle avant le passage à la suivante. Ces étapes sont cruciales dans la régulation de la prolifération et la conservation de l'intégrité du génome, elles sont donc contrôlées à chaque cycle même lors d'un déroulement correct du cycle.

A. Le point de contrôle du dommage à l'ADN

Le dommage à l'ADN est un événement relativement commun au cours de la vie d'une cellule et peut être dramatique pour sa vie et plus largement celle de l'organisme. En effet, sous l'effet de rayonnements ionisants ou du simple fonctionnement de la cellule, en induisant la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species »), l'ADN subit des lésions qui peuvent provoquer une instabilité génétique et plus tard l'apparition de cancers. La coordination entre réplication de l'ADN (quantité) et réparation des dommages à l'ADN (qualité) est donc absolument indispensable pour conserver l'intégrité du génome. La détection de dommages à l'ADN se fait tout au long du cycle cellulaire. Suite à une lésion de l'ADN, plusieurs réponses sont induites : (i) élimination du dommage à l'ADN et restauration de la continuité du duplex d'ADN, (ii) activation du point de contrôle du dommage à l'ADN qui bloque le cycle cellulaire pour permettre la réparation et éviter la transmission de chromosomes endommagés ou incomplets, (iii) induction de l'apoptose (mort cellulaire programmée) si le dommage est trop sérieux et la cellule considérablement dérégulée (Sancar et al. 2004).

De façon simplifiée, le point de contrôle du dommage à l'ADN fait appel aux deux membres de la famille des PIKK (« phosphoinositide 3-kinase-like kinase ») : ATM et ATR (Hurley and Bunz 2007). ATM (« ataxia telangiectasia mutated ») est plus spécialisée dans la réponse aux cassures double-brin causée par les radiations ionisantes, tandis que ATR (apparentée à ATM) l'est plus face aux dommages causés par l'action des ultra-violets (Abraham 2001). ATR et ATM phosphorylent Chk1 et Chk2 respectivement (« checkpoint kinases 1 and 2 »), qui entraînent l'arrêt du cycle cellulaire via la phosphorylation de plusieurs cibles (Cdc25, p53, BRCA1). Néanmoins, ATM et ATR peuvent fonctionner ensemble, formant un circuit moléculaire intégré (Hurley and Bunz 2007). De façon intéressante, les souris Chk1^{-/-} comme ATR^{-/-} ne sont pas viables (Liu et al. 2000) au

contraire des souris $Chk2^{-/-}$ ou $ATM^{-/-}$ qui semblent montrer des points de contrôle proches de la normale (Xu et al. 1996) (Jack et al. 2002). Cependant, comme les mutations de $p53$, celles de $Chk2$ peuvent être la cause du syndrome de Li-Fraumeni qui correspond au développement simultané de plusieurs cancers et dont la transmission est héréditaire selon un mode dominant (Sancar et al. 2004).

B. Le point de contrôle de la phase S

Le point de contrôle de la phase S s'assure que la mitose ne commence pas avant la réplication complète de l'ADN afin de prévenir l'apparition de cellules aneuploïdes (Smith et al. 2002). Seule la kinase ATR serait requise pour bloquer l'enclenchement de la mitose avant la fin de la réplication. En effet, même si la réplication est bloquée, la déplétion de ATR chez le xénope cause l'activation prématurée du complexe responsable de l'entrée en mitose : CyclineB-Cdk1 (Hekmat-Nejad et al. 2000). Dans ce système, ATR est associée à la chromatine de façon dépendante de la réplication, formant un large complexe sous forme de foci nucléaires regroupant de nombreuses protéines : des suppresseurs de tumeurs, des protéines de la réparation de l'ADN et des points de contrôle. Ce complexe se dissocie une fois la réplication complète. Chez les eucaryotes supérieurs, différentes études identifient $Chk1$, plutôt que $Chk2$, comme la kinase clé du point de contrôle de la phase S. L'immunodéplétion de $Chk1$ dans des extraits d'œufs de xénope induit l'incapacité à retarder le cycle cellulaire en réponse au blocage de la réplication (Kumagai et al. 1998), phénotype aussi observé suite à l'immunodéplétion de ATR (Guo et al. 2000).

C. Le point de contrôle dépendant des topoisomérases II

Les ADN topoisomérases II sont requises pour la condensation et la ségrégation des chromosomes chez les eucaryotes. Bien que ce soit des événements mitotiques, leur achèvement correct dépend en partie de l'activité des topoisomérases II au cours de la réplication de l'ADN et de la phase G2. Les topoisomérases II éliminent les caténations des molécules d'ADN qui pourraient empêcher la condensation de la chromatine en début de mitose. Cependant, l'identification des acteurs et des mécanismes précis de ce contrôle est ralentie par son absence chez les levures et le manque de spécificité des inhibiteurs de topoisomérases II qui induisent fréquemment des dommages à l'ADN (Smith et al. 2002).

D. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

En 1991, deux criblages indépendants identifient plusieurs gènes dont la mutation permet à *S.cerevisiae* de contourner l'arrêt en mitose en présence de poisons du fuseau : les gènes MAD (« mitotic-arrest deficient ») et BUB (« budding uninhibited by benzimidazole ») (Hoyt et al. 1991) (Li and Murray 1991). Ces gènes sont conservés chez tous les eucaryotes et impliqués dans une voie de signalisation active en prométaphase qui empêche la séparation des chromatides sœurs. C'est le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, noté SAC pour « spindle-assembly checkpoint ».

1. Les acteurs du SAC

Le SAC cible Cdc20, un cofacteur de l'ubiquitine ligase APC/C (« anaphase-promoting complex/cyclosome »). Plus précisément, le SAC inhibe la capacité de Cdc20 à activer la polyubiquitination de deux substrats par APC/C, securine et CyclineB, qui sont alors protégés de leur dégradation par le protéasome (Figure 3). La securine inhibe une protéase connue sous le nom de séparase. La séparase est requise pour le clivage des complexes de cohésine qui assurent le maintien des chromatides sœurs ensemble, ce clivage étant un événement nécessaire à l'exécution de l'anaphase (Peters 2006). De plus, la protéolyse de la CyclineB permet d'inhiber Cdk1, la kinase mitotique majeure, ce qui entraîne la sortie de la mitose. En gardant Cdc20 sous contrôle, le SAC empêche cette cascade d'événements, prolongeant ainsi la prométaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes aient une configuration amphitélétique (bi-orientation) sur la plaque métaphasique, c'est-à-dire que les deux chromatides sœurs soient attachées chacune à un pôle opposé de la cellule. Finalement, la bi-orientation des chromosomes permet d'éteindre le SAC, de lever l'arrêt en mitose et d'enclencher l'anaphase.

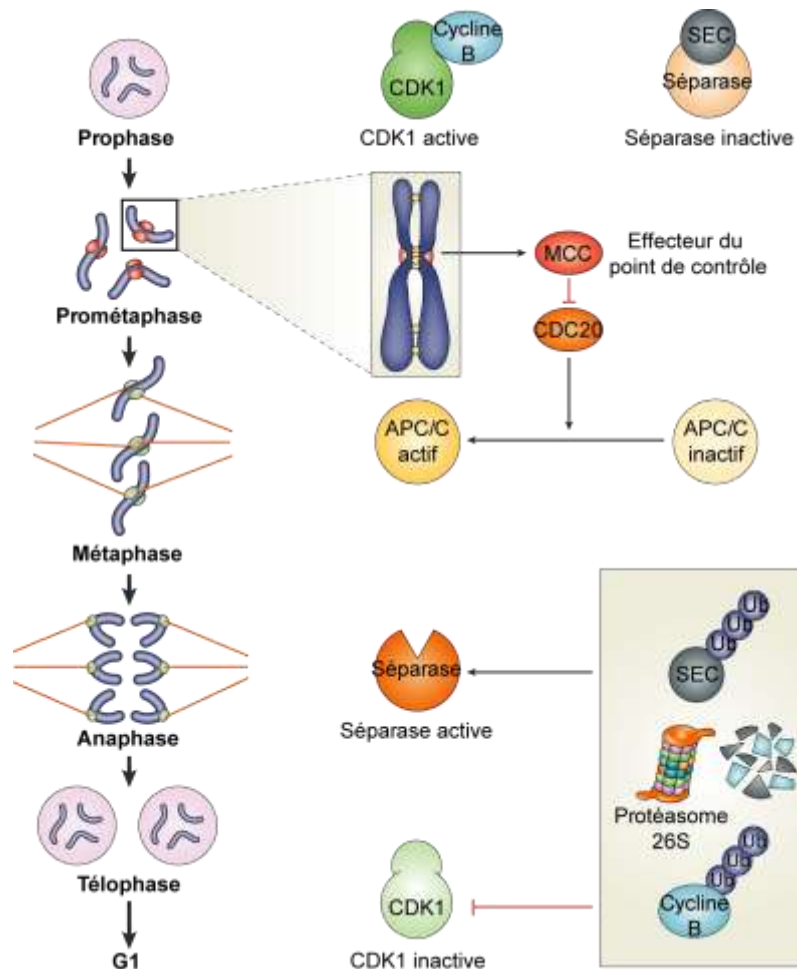


Figure 3 : Relation entre le SAC et la machinerie du cycle cellulaire.

Lorsque les chromosomes (en bleu) sont correctement attachés aux deux pôles de la cellule, le SAC est inactivé, Cdc20 peut activer l'APC/C qui entraîne la dégradation de la sécurine (SEC) et donc l'activation de la séparase conduisant à la dégradation de la cohésine maintenant les deux chromatides ensemble. L'APC/C permet aussi la dégradation de la CyclineB, donc l'inactivation de Cdk1. D'après Musacchio A et Salmon ED, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):379-93.

Le complexe du point de contrôle mitotique MCC (« mitotic checkpoint complex ») qui contient les trois protéines du SAC - MAD2, BUBR1 (Mad3) et BUB3 - ainsi que Cdc20 lui-même, constitue l'effecteur du SAC (Sudakin et al. 2001). Le MCC se lie à l'APC/C et le rend incapable d'exercer son activité ubiquitine ligase sur la CyclineB et la sécurine (Figure 3). En dehors du complexe MCC, d'autres protéines constituent le corps du SAC comme MAD1, BUB1, MPS1 (« multipolar spindle 1 ») et Aurora-B. Ces protéines sont nécessaires pour amplifier le SAC et la formation du complexe MCC. De nombreuses protéines additionnelles régulent l'activité du SAC chez les eucaryotes supérieurs, comme par exemple des kinases (PLK1 : « polo-like kinase 1 ») et des protéines motrices des microtubules (kinésine et dynéine) (Musacchio and Salmon 2007).

Au cours de la prométaphase, Cdc20 et toutes les protéines du SAC sont concentrés au niveau du kinétochore qui est un large assemblage protéique localisé au niveau des centromères et impliqué dans l'attachement des chromosomes au fuseau de microtubules. En fait, le kinétochore fournit une plateforme catalytique qui accélère l'assemblage du MCC. Finalement, le SAC contrôle un aspect du fuseau : l'interaction entre le kinétochore et les microtubules (Musacchio and Salmon 2007).

2. Le contrôle de l'attachement et de la tension par le SAC

La configuration amphitélétique des chromatides sœurs est la seule condition qui fournit à la fois un signal d'attachement et un signal de tension des kinétochores aux microtubules, la cellule peut alors progresser vers l'anaphase (Figure 4).

Certaines protéines du SAC sont immédiatement éliminées du kinétochore après l'attachement du bout « plus » du microtubule à celui-ci. C'est le cas de MAD2, qui est localisé uniquement au niveau des kinétochores non attachés en prométaphase ou dans les cellules traitées par du nocodazole qui induit la dépolymérisation des microtubules et donc empêche l'attachement des kinétochores aux microtubules. Inversement, la quantité de MAD2 est considérablement réduite (de 50 à 100 fois) lorsque le kinétochore est occupé par des microtubules (Figure 4) (Waters et al. 1998). L'absence de MAD2 participe à l'extinction du SAC.

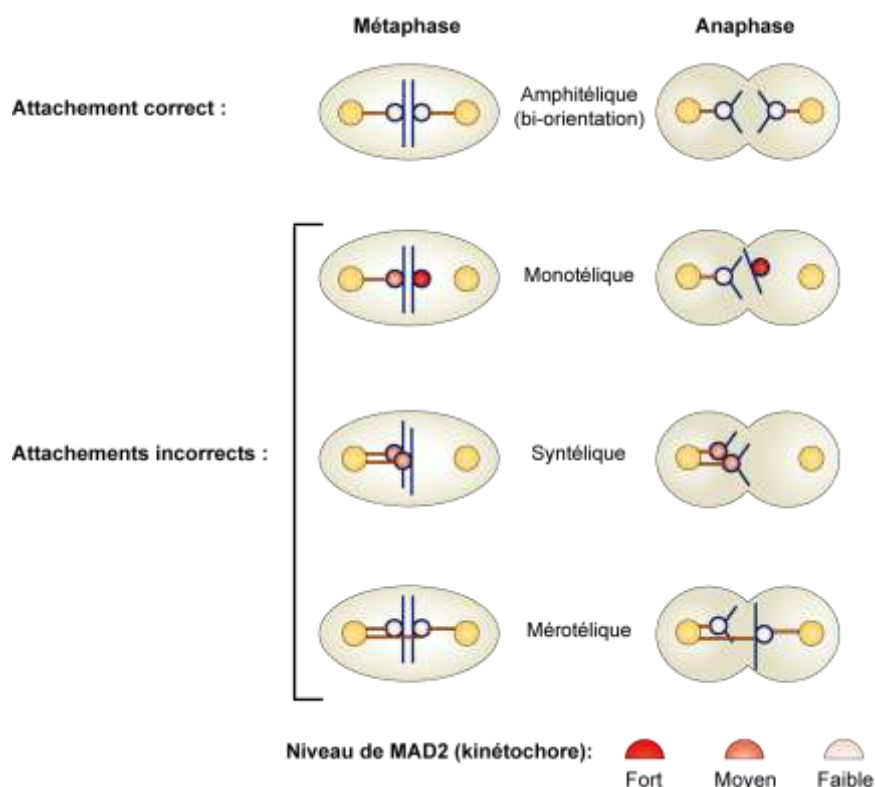


Figure 4 : Différents types d'attachement des chromosomes au fuseau mitotique.

Attachements des chromatides sœurs en métaphase et leurs conséquences lors de la progression en anaphase. D'après Musacchio A et Salmon ED, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):379-93.

L'étirement de la chromatine centromérique augmente la distance entre les deux kinétochores fils et donc la tension dans le cas de chromosomes amphotéliqués. La tension constitue un critère fondamental pour discriminer les attachements incorrects. Par exemple, si deux kinétochores fils sont attachés aux microtubules d'un même pôle de la cellule (attachement synthétique), aucune tension ne sera générée. L'attachement incorrect est alors déstabilisé par Aurora-B afin qu'un nouvel attachement correct soit réalisé (Pinsky and Biggins 2005). Donc la tension au niveau du centromère participe aussi à l'extinction du SAC, en collaboration avec l'attachement kinétochore-microtubules.

3. La régulation du SAC et la sortie de mitose par le CPC

Le « chromosomal passenger complex » ou CPC est composé de la kinase Aurora-B et de trois protéines non-enzymatiques : INCENP (« inner centromere protein »), survivine et boréoline qui assurent la régulation de la localisation, de l'activité kinasique et de la stabilité d'Aurora-B (Ruchaud et al. 2007a). L'ARN interférence ciblant un des membres du CPC induit la délocalisation des autres membres, l'arrêt en mitose et la déstabilisation d'une ou plusieurs des autres sous unités (Honda et al. 2003). En effet, INCENP constituerait une protéine de structure en interagissant avec les trois autres membres du complexe. De plus, l'extrémité C-terminale de INCENP serait impliquée dans la fixation et la modulation de l'activité sérine/thréonine kinase de Aurora-B par une boucle d'amplification. La survivine participerait à la localisation du complexe et la boréoline à sa stabilisation. Les fonctions du CPC sont multiples au cours de la mitose. Elles s'étendent du contrôle des interactions kinétochore-microtubule et de la cohésion entre les chromatides sœurs à l'achèvement de la cytodierèse. Le CPC intervient également dans la régulation de la structure des chromosomes et du fuseau mitotique. D'ailleurs, la localisation particulière du CPC au cours de la mitose reflète probablement ses différentes fonctions (Figure 5). En effet, le CPC est observé sur la chromatine (bras et centromères des chromosomes) en prophase, localisé au niveau des centromères en métaphase puis sur le cortex et fuseau équatoriaux en anaphase et enfin concentré au niveau du sillon de clivage en télophase (Ruchaud et al. 2007a).

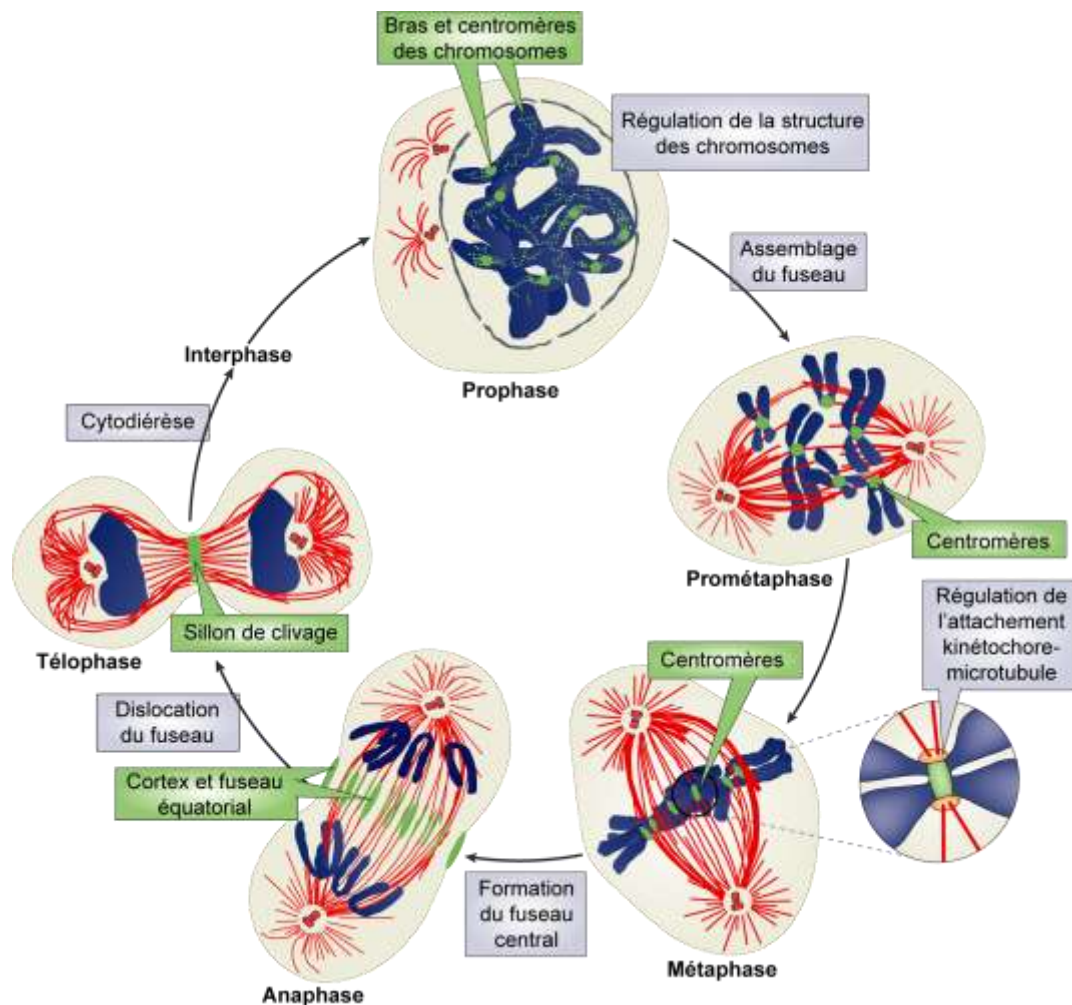


Figure 5 : Localisations et fonctions du complexe CPC au cours de la mitose.

Les multiples fonctions (en gris) du CPC sont étroitement liées à sa dynamique de localisation (en vert) durant la mitose. En prophase : le CPC est trouvé sur les bras et centromères des chromosomes où il participe à leur structure et à l'assemblage du fuseau mitotique. En prométaphase et métaphase : le CPC se concentre aux centromères où il aide le point de contrôle du SAC dans l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique. En anaphase : le CPC est localisé sur le cortex et le fuseau équatorial où il assure la formation du fuseau central puis du sillon de clivage en télophase afin de permettre la cytotdiérèse. *D'après Ruchaud S et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Oct;8(10):798-812.*

Si un détecteur de tension existe lors du SAC, le CPC est un bon candidat. Aurora-B n'est pas requise pour maintenir un arrêt en mitose causé par un manque d'attachement des kinétochores aux microtubules (cas du nocodazole par exemple) mais nécessaire pour l'arrêt temporaire du cycle cellulaire sous certaines conditions qui empêchent la formation d'une tension intra-kinétochore (cas du taxol et des chromosomes non répliqués par exemple). Aurora-B détecte et déstabilise les attachements incorrects, les kinétochores non attachés étant ensuite détectés par le SAC (Pinsky and Biggins 2005). En effet, Aurora-B est spécialement impliquée dans la correction des attachements mérotéliques (Figure 4). De tels

attachements ne peuvent pas être détectés par le SAC puisque dans ce cas, la bi-orientation des chromosomes produit un signal d'occupation et de tension des kinétochores suffisant pour outrepasser le SAC. Sans correction, l'attachement mérotélique du chromosome conduit à une réduction de sa mobilité et à un défaut de ségrégation de ses chromatides lors de l'anaphase. Le complexe INCENP-survivine jouerait un rôle important dans la détection de la tension tandis que Aurora-B serait essentielle pour la déstabilisation des attachements incorrects, entre autre par la phosphorylation de la kinésine MCAK (Vader et al. 2006). Cependant, Aurora-B pourrait aussi participer directement au SAC en favorisant l'assemblage du complexe MCC (Morrow et al. 2005). En effet, l'inhibition de Aurora-B réduit significativement la localisation de MAD2 et BUBR1 au niveau des kinétochores sous l'effet du nocodazole.

Enfin, le CPC est absolument essentiel lors de la cytodierèse. INCENP est retrouvé au niveau du sillon de clivage avant la myosine II. Bien que la localisation normale du CPC ne soit pas nécessaire pour l'initiation du sillon, des études révèlent son rôle crucial dans l'achèvement de la cytodierèse. Aurora-B semble requise pour la phosphorylation et la localisation de protéines de la famille des kinésines (MLKP1 et MLKP2), la vimentine ou encore des protéines activatrices des Rac GTPase (Ruchaud et al. 2007a).

V. Dérégulation du cycle cellulaire dans les cancers

A. Prolifération indépendante des signaux de croissance

Aucun type de cellules normales ne peut proliférer en absence de signaux de croissance. Au contraire, les cellules tumorales montrent invariablement une grande diminution de leur dépendance à de tels signaux provenant du microenvironnement puisqu'elles génèrent elles-mêmes leurs propres signaux de croissance. Nombreux sont les oncogènes qui miment l'effet des signaux de croissance (Hanahan and Weinberg 2000).

Trois stratégies moléculaires ont été mises en évidence dans l'acquisition de l'autonomie des cellules tumorales aux mitogènes : altération des signaux extracellulaires, des transducteurs transmembranaires de ces signaux ou des circuits intracellulaires qui traduisent ces signaux en action. En effet, il n'est pas rare que les cellules cancéreuses

acquièrent la capacité à synthétiser des facteurs de croissance auxquels elles répondent, créant une boucle autocrine. C'est le cas des glioblastomes et sarcomes qui produisent respectivement du PDGF (« platelet-derived growth factor ») et du TGF α (« tumor growth factor α ») (Hanahan and Weinberg 2000). La surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance peut aussi être à l'origine d'une sensibilité exacerbée à des niveaux très faibles de ces facteurs conduisant à une prolifération anormale. Par exemple, HER2/neu est surexprimé dans les tumeurs du sein (Slamon et al. 1987). L'altération structurale du récepteur, comme des versions tronquées sans partie cytoplasmique, peut également conduire à l'activation constitutive de celui-ci. Un changement dans les types d'intégrines exprimés à la surface de la cellule peut aussi avoir des répercussions sur les signaux transmis par la matrice extracellulaire. Le mécanisme le plus complexe est l'altération des circuits moléculaires intracellulaires. La voie Ras/Raf/MAPK joue un rôle central dans la cancérogenèse. Environ 25% des tumeurs humaines présentent une forme active de Ras en absence de stimulation en amont (Medema and Bos 1993). De plus, il existe de nombreuses connexions entre Ras et d'autres voies de signalisation comme avec PI3K.

Cependant, le concept d'autonomie est plus large que la cellule tumorale elle-même. L'environnement comme les cellules stromales, endothéliales, immunitaires et les autres cellules tumorales voisines forme un tout qui soutient la croissance de la tumeur.

B. Prolifération insensible aux points de contrôle

Des phénomènes d'adaptation aux points de contrôle ont été originellement décrits chez *S.cerevisiae* et *Xenopus*. Récemment, ces mêmes phénomènes ont été révélés dans les cellules humaines (Syljuasen 2007). Bien que la plupart des cellules résistantes aux points de contrôle meurent des suites d'une accumulation excessive de dommages à l'ADN, certaines peuvent survivre et proliférer avec leur ADN endommagé. L'adaptation aux points de contrôle du cycle cellulaire favorise ainsi l'instabilité chromosomique et donc l'apparition de cancers.

Les mécanismes moléculaires d'adaptation des cellules humaines aux points de contrôle du cycle cellulaire restent à élucider. Les travaux réalisés sur les levures et l'œuf de xénope fournissent une précieuse aide pour les recherches conduites chez l'Homme. Il semblerait qu'une cellule à l'ADN endommagé arrêtée en phase G2 de façon prolongée voit son taux de CyclineB augmenté graduellement jusqu'à lui permettre de passer le point de contrôle et d'entrer en mitose. En effet, chez le xénope, cette adaptation aux points de

contrôle n'est pas le résultat d'un processus entraînant une décision active, mais semble plutôt correspondre au résultat d'un point de contrôle prolongé et dépendant de la kinase ATR (Syljuasen 2007).

L'oncogène c-Myc est également impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire. Son expression anormale résulte en une activation oncogénique et contribue à la progression de nombreuses tumeurs. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire comme p15^{INK4b}, p27^{Cip1} ou gadd45 dans les cellules dépourvues de c-Myc par rapport aux cellules parentales (Gartel and Shchors 2003). La transcription du gène de p21^{Kip1} est réduite dans les cellules qui surexpriment c-Myc (Coller et al. 2000). En fait, c-Myc semble impliqué dans la modulation de l'expression de 10 à 15% des gènes d'une cellule, participant ainsi à la prolifération, la survie et l'établissement d'un environnement oncogénique permissif. Récemment, une fonction plus large a été attribuée à c-Myc. En effet, au-delà de son activité de facteur de transcription traditionnel, cet oncogène participerait au maintien d'un état transcriptionnel actif de manière globale à travers le recrutement de nombreux modulateurs de la structure de la chromatine (Knoepfler 2007). D'ailleurs, la surexpression de c-Myc a été impliquée dans l'instabilité génomique et les réarrangements chromosomiques à travers le remodelage des télomères de chromosomes (Louis et al. 2005).

Dans les cellules normales, l'activation accidentelle d'oncogènes entraîne une réponse empêchant la progression vers un état tumoral. Cette réponse peut être due à la mort cellulaire ou à l'arrêt permanent du cycle cellulaire appelé sénescence. Le plus souvent, la sénescence correspond à un arrêt du cycle cellulaire irréversible et métaboliquement viable. Cependant, une des caractéristiques des cellules tumorales est leur résistance à l'induction de la sénescence par des dommages à l'ADN ou un dysfonctionnement des télomères de leurs chromosomes (Mallette and Ferbeyre 2007). Ainsi, leur prolifération est maintenue, ce qui est indispensable pour la tumeur. Néanmoins, un défaut de sénescence est souvent insuffisant pour la transformation oncogénique (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Les cellules malignes doivent trouver un moyen de proliférer sans mourir malgré leur instabilité génomique.

L'APOPTOSE

I. Introduction

La mort cellulaire programmée désigne une mort cellulaire physiologique impliquant un processus actif sous le contrôle d'un programme génétique codé par la cellule elle-même. Initialement utilisé pour décrire des cellules qui meurent à un moment et à un lieu précis au cours du développement, c'est aussi un processus par lequel des cellules surnuméraires, dysfonctionnelles ou ectopiques disparaissent de l'organisme. La mort cellulaire programmée est donc nécessaire au développement et au bon fonctionnement de tout organisme vivant.

Dès le milieu du XIXe siècle, on savait que la disparition d'une cellule ne résultait pas d'une simple incapacité à résister à l'usure du temps ou aux agressions de l'environnement mais plutôt de la capacité à s'autodétruire. Cependant, c'est seulement depuis moins de 30 ans que la mort cellulaire programmée est considérée par les biologistes comme une fonction à part entière. Ce domaine de recherche a alors connu un essor considérable. *Apoptosis* est un terme grec qui désigne la chute des feuilles d'arbres et des pétales de fleurs, qui sont des événements programmés. En 1972, Kerr, Wyllie et Currie utilisent pour la première fois le terme d'apoptose pour décrire un phénomène de mort cellulaire programmée qui suit une séquence d'événements cellulaires précis (Kerr et al. 1972). La définition de l'apoptose repose alors uniquement sur des critères morphologiques associant condensation cytoplasmique et chromatinienne, fragmentation de l'ADN, bourgeonnement de la membrane plasmique et perte de l'asymétrie membranaire. Ces changements sont rapidement suivis par la phagocytose des corps apoptotiques, ce qui permet d'opposer l'apoptose à la nécrose. En effet, la nécrose correspond à une mort cellulaire accidentelle entraînée par des dommages physiques ou chimiques de la cellule. Au contraire d'une cellule nécrotique, une cellule apoptotique ne déverse pas son contenu cytoplasmique dans l'espace intercellulaire, ce qui minimise voire élimine les réactions inflammatoires.

La cellule en apoptose est caractérisée par la dégradation de son ADN en fragments de 180 à 200 paires de bases. L'externalisation des phosphatidylsérines, normalement confinées sur la membrane interne de la membrane plasmique, constitue également une caractéristique des cellules apoptotiques. Ceci permet aux corps apoptotiques contenant des

éléments cytoplasmiques et nucléaires d'être reconnus et phagocytés. Le processus d'apoptose est alors terminé sans avoir entraîné de réaction inflammatoire. En effet, la mort cellulaire programmée par apoptose est avant tout la réponse à une situation physiologique, comme c'est le cas lors du développement embryonnaire et post-natal, de l'établissement du système immunitaire, de la réponse immunitaire et du maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, l'apoptose et la mitose sont complémentaires tout en ayant des rôles opposés, ils régulent ensemble les différentes populations cellulaires d'un organisme. Cependant, tout comme le cycle cellulaire, des anomalies survenant dans la régulation de l'apoptose peuvent participer à des situations pathologiques comme c'est le cas pour les maladies neurodégénératives ou le cancer (Elmore 2007).

Enfin, des liens existent entre les différents mécanismes de mort cellulaire programmée. Si la nécrose est souvent observée en tant qu'apoptose secondaire notamment pour les cultures *in vitro* puisque celle-ci ne peuvent subir la phagocytose, d'autres types de mort cellulaire programmée ainsi que leurs interconnexions sont à l'étude. L'autophagie représente un autre mécanisme de mort cellulaire programmée qui, comme l'apoptose, possède un rôle important dans le développement et les réponses cellulaires à la privation en nutriments, et semble même impliquée dans certaines maladies humaines. La mort cellulaire par autophagie est caractérisée par la séquestration de cytoplasme et d'organelles dans des vésicules particulières appelées « autophagosomes » qui déversent leur contenu dans les propres lysosomes de la cellule pour leur dégradation. L'autophagie et l'apoptose ne sont pas exclusives. D'ailleurs, l'autophagie peut constituer une phase précoce à l'apoptose. Cependant, dans certaines circonstances, elle peut au contraire constituer un mécanisme de sauvegarde et d'adaptation pour la cellule à un environnement non favorable pour sa croissance. Ainsi, la relation entre l'autophagie et l'apoptose semble ambivalente (Maiuri et al. 2007).

II. Les caspases

A. Structure et fonction

Les caspases sont des endoprotéases à cystéine qui sont synthétisées dans la cellule sous forme de proenzymes c'est-à-dire des précurseurs enzymatiques inactifs. Ces

protéases sommeillent dans la cellule saine, mais en réponse à un stimulus de mort cellulaire, sont converties en enzymes actives, soit par clivage protéolytique soit par recrutement au sein de larges complexes. Les caspases peuvent alors cliver leurs substrats typiquement après des résidus d'aspartate et sont responsables de la plupart des changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de la mort par apoptose. La spécificité des caspases pour leur substrat est conservée et déterminée en particulier par la nature du résidu en position 4 du site de reconnaissance (WEXD, DEXD ou (L/V)EXD) (Shi 2002).

Le rôle fondamental des caspases dans le processus apoptotique a été défini pour la première fois quand CED-3, une protéase à cystéine requise pour l'apoptose, fut découverte chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. CED-3 fut ensuite identifiée comme faisant partie d'une famille de protéases hautement conservée au cours de l'évolution. Le premier homologue identifié chez les mammifères fut ICE (pour « interleukin-1 converting enzyme »), plus tard rebaptisé Caspase-1. Actuellement, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères (Figure 6), 7 d'entre elles sont centrales dans la régulation du processus d'apoptose (Lamkanfi et al. 2002). En dehors de cette fonction, les caspases ont également été impliquées dans le système immunitaire à travers des processus comme la prolifération, la différenciation ou encore l'expression de cytokines (Sehra and Dent 2006).

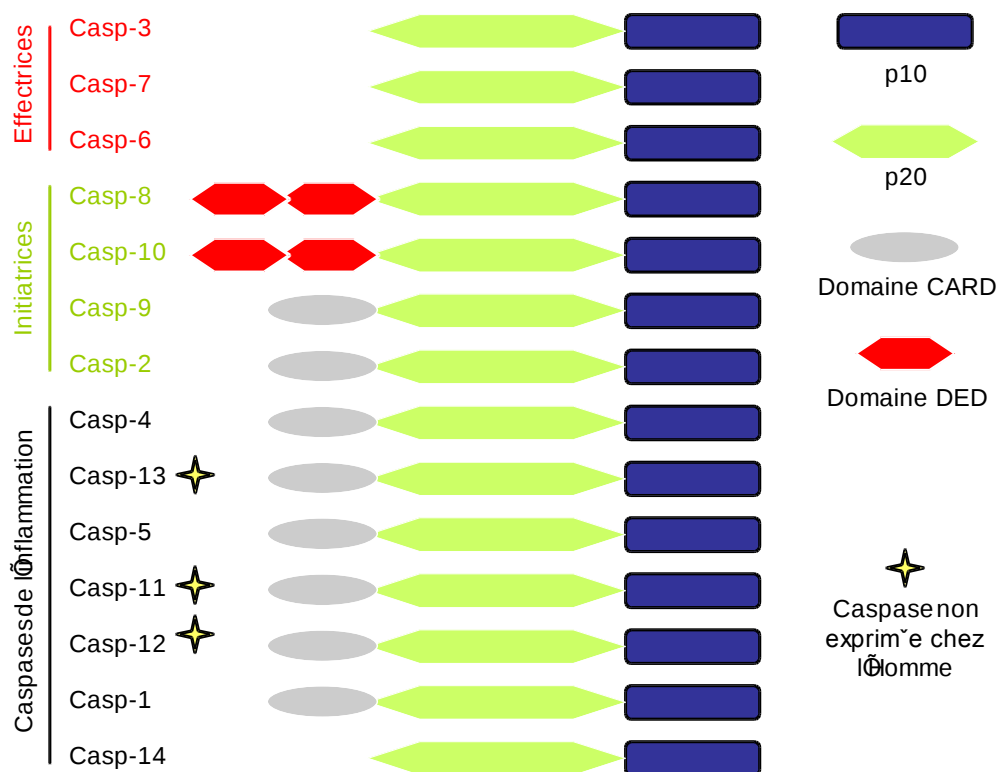


Figure 6 : Structure des caspases.

Sous forme de proenzyme, les caspases contiennent trois domaines : l'extrémité N-terminale porte le prodomaine, l'extrémité C-terminale porte une petite sous-unité et entre les deux, on trouve une grande sous-unité contenant le site catalytique à résidu cystéine dans un motif conservé (QACXG où X = R, Q ou G) (Figure 6). Le prodomaine est séparé de la grande sous-unité par un résidu d'aspartate constituant un site de clivage, alors qu'un ou plusieurs sites sont présents entre la grande et la petite sous-unité. Deux événements de clivage sont nécessaires pour activer la caspase en protéase fonctionnelle. Le premier clivage protéolytique divise la proenzyme en grande et petite sous-unité. Le second élimine le prodomaine. Finalement, la caspase fonctionnelle forme un tétramère de deux grandes (p20) et deux petites (p10) sous-unités. La présence du résidu aspartate dans le site de clivage de la caspase fait que la caspase a la capacité de s'autoactiver suite à son agrégation ou d'être activée par une autre caspase lors d'une boucle d'amplification (Earnshaw et al. 1999).

B. Activation des caspases

Chez les mammifères, les caspases apoptotiques sont classées en deux groupes selon leur structure et leur fonction: les caspases initiatrices qui sont les Caspases-2, -8, -9 et -10, et les caspases exécutrices qui sont les Caspases-3, -6 et -7 (Figure 6). Les caspases initiatrices diffèrent des caspases exécutrices par leur long domaine au niveau de leur extrémité N-terminale qui leur permet d'interagir avec des domaines DED (pour « death effector domain ») ou CARD (pour « caspase recruitment domain ») présents dans les protéines adaptatrices comme FADD (pour « Fas-associated protein with death domain ») ou Apaf-1 (pour « apoptosis protease activating factor-1 »), respectivement. Les caspases exécutrices possèdent un prodomaine plus court (de 10 à 40 résidus) ne leur permettant pas d'être recrutées et oligomérisées. Ces caspases sont activées à la suite de leur clivage par une autre caspase à prodomaine court ou long, ou encore par le granzyme B, aboutissant à un fonctionnement dit en cascade (Shi 2004). L'activation des caspases initiatrices peut résulter de deux signalisations de mort cellulaire : (i) la voie extrinsèque des récepteurs de mort et (ii) la voie intrinsèque mitochondriale.

III. Les voies d'apoptose

A. La voie extrinsèque des récepteurs de mort

Les récepteurs de mort sont des protéines transmembranaires qui activent l'apoptose suite à la fixation de leurs ligands spécifiques. L'apoptose peut donc être déclenchée par des signaux provenant de l'environnement de la cellule. Cette voie est importante notamment dans le cadre de l'immunité.

1. La superfamille des TNF-R

La voie apoptotique extrinsèque est déclenchée par l'activation des récepteurs de la famille du TNF-R (« tumor necrosis factor receptor») (Figure 7). Cette famille est subdivisée en trois groupes classés selon leur structure et leur fonction (Locksley et al. 2001).

Le premier groupe des TNF-R comprend six récepteurs de mort cellulaire : CD95 aussi appelé Fas, TNFR1 (pour « tumor necrosis factor receptor 1 »), DR3 (pour « death receptor 3 »), DR4 aussi appelé TRAIL-R1, DR5 aussi appelé TRAIL-R2, et DR6. Les ligands de ces récepteurs appartiennent à la famille du TNF : CD95L (encore appelé FasL) lie le CD95, le TNF et la Lymphotoxin- α (LT- α) lient le TNFR1, Apo3 lie DR3, TRAIL (pour « TNF related apoptosis inducing ligand ») aussi appelé Apo2L lie DR4 et DR5. Le ligand de DR6 reste inconnu à ce jour. Ces récepteurs ont la particularité de posséder dans leur partie intracellulaire une région conservée appelée domaine de mort (DD pour « death domain »). Ce motif d'environ 80 acides aminés est requis pour la transmission du signal de mort par ces récepteurs. Quant à leur partie extracellulaire, elle est riche en cystéine et faiblement conservée (25% d'homologie) d'un membre à l'autre de la famille, contrairement à la partie intracellulaire. L'apoptose induite par ces récepteurs fait intervenir des protéines adaptatrices qui agissent en formant de larges complexes nécessaires à la transduction du signal (Dempsey et al. 2003).

Fas/FasL correspond au modèle classique de l'apoptose déclenchée par ces récepteurs. La liaison de FasL à son récepteur entraîne la trimérisation de celui-ci qui permet la juxtaposition de trois domaines de mort (DD). La partie intracellulaire de Fas se lie alors à la protéine adaptatrice FADD par l'intermédiaire de leurs DD. Outre son DD, FADD possède

un domaine effecteur de mort (DED) grâce auquel la Caspase-8 est recrutée sous sa forme de proenzyme constituant ainsi un large complexe protéique appelé DISC (« death-inducing signaling complex »). Le rapprochement des pro-Caspases-8 au sein du DISC permet leur clivage réciproque et la libération des formes actives de la Caspase-8 dans le cytosol qui peuvent à leur tour, cliver des caspases effectrices. La Caspase-8 peut aussi cliver Bid, une protéine dite à « BH3 only » de la famille Bcl-2, qui sous sa forme active (tBid) met en jeu la mécanique mitochondriale de l'apoptose. Les autres récepteurs comme TRAIL-R1 et TRAIL-R2 semblent faire intervenir les mêmes mécanismes de recrutement.

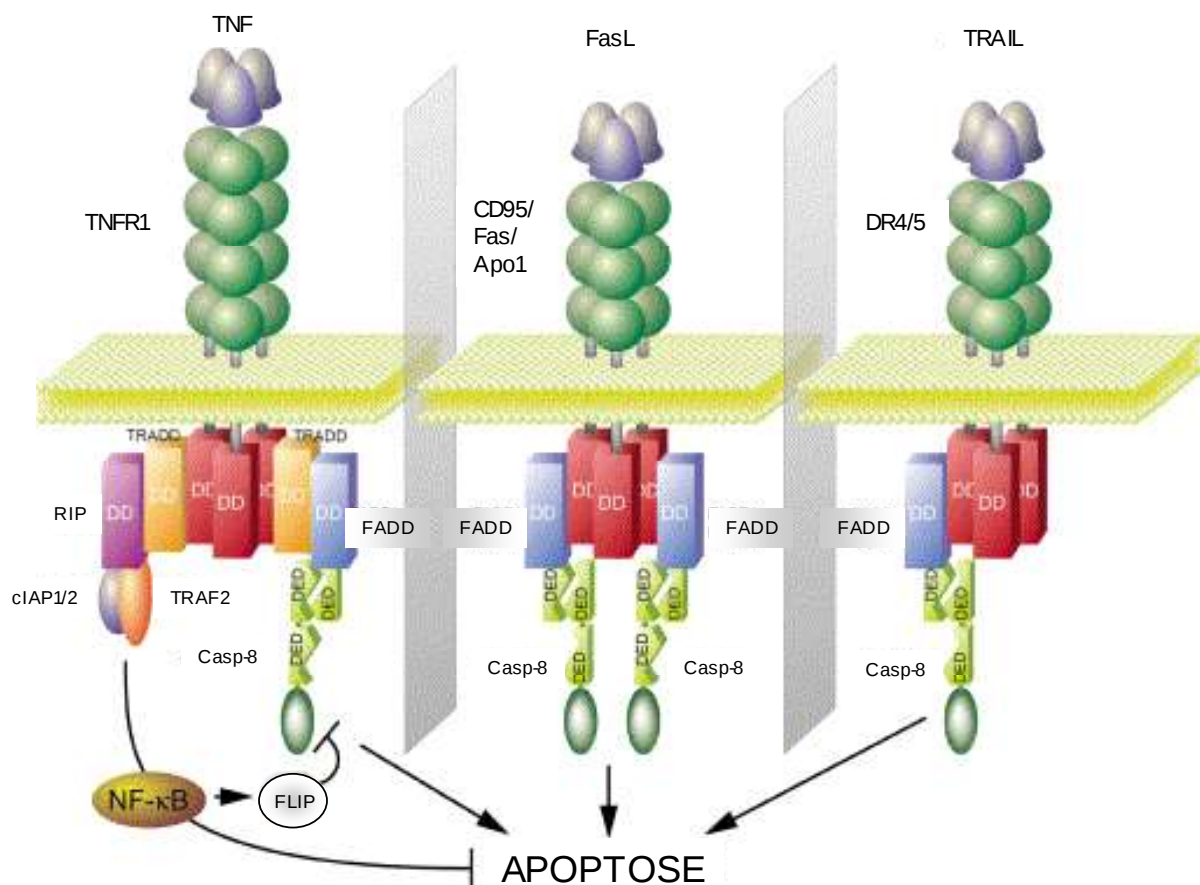


Figure 7 : Superfamille des récepteurs du TNF.

D'après Danial NN et Korsmeyer SJ, Cell. 2004 Jan 23;116(2):205-19

Au contraire, TNFR1, DR3 et DR6 utilisent d'autres protéines adaptatrices. Avant le recrutement de FADD, TNFR1 requiert celui de TRADD (« TNF receptor associated death domain ») qui fixe la kinase RIP (« receptor interacting protein ») et la molécule TRAF-2 (« TNF receptor associated factor ») pour former un complexe multiprotéique. Dans un premier temps, ce complexe permet d'activer les voies NF-κB et JNK. La voie NF-κB régulant l'expression de protéines anti-apoptotiques comme c-FLIP, les IAP (« inhibitors of apoptosis proteins ») et Bcl-2, l'activation de TNFR1 n'est pas en faveur d'une apoptose

mais plutôt d'une survie contre-balançant le message de mort induit par la Caspase-8 (Figure 7). Dans un deuxième temps, ce complexe se dissocie du TNFR1 qui peut alors recruter FADD et la Caspase-8 afin de déclencher l'apoptose. Donc, le TNFR1 est capable d'induire l'apoptose uniquement dans certaines conditions comme lors de l'inactivation de la voie NF- κ B.

Le deuxième groupe de récepteurs de mort comprend TNFR2, CD40, CD30, LTBR, OX40, 4-1BB, BAFF-R, BCMA, TACI, RANK, p75NGFR, HVEM, TNFRSF18, TROY, EDAR, XEDAR, RELT et Fn14. Grâce à leur domaine intracellulaire TIMs, ils recrutent TRAF qui active des voies de signalisation comme ERK, JNK, p38 ou NF- κ B. Le troisième groupe comprend les récepteurs sans domaine de transduction : TRAIL-R3, TRAIL-R4, Decoy-R3 et ostéoprotégérine (OPG), qui sont des récepteurs « leurres » capables de lier le ligand sans transmettre de message et donc de moduler l'effet des deux autres groupes de récepteurs de mort.

2. Régulation de la voie extrinsèque

La Caspase-8 semble être un élément essentiel dans la voie d'apoptose déclenchée par l'activation des récepteurs de mort. En effet, des fibroblastes embryonnaires dépourvus de Caspase-8 sont résistants aux effets cytotoxiques de FasL, TNF et TRAIL (Creagh and Martin 2003).

La régulation de cette voie d'apoptose se fait en partie par l'activation paradoxale de voies de survie, de prolifération ou de différenciation (NF- κ B, ERK, p38, JNK, PI3K) lors de l'activation de certains récepteurs de mort par leurs ligands et selon le type de protéines adaptatrices ainsi recrutées (Micheau and Tschopp 2003). De plus, c-FLIP (« Flice-like inhibitory protein ») joue un rôle central dans la régulation de cette voie d'apoptose. Sous sa forme longue, c-FLIP s'oppose au recrutement de la Caspase-8 par FADD et bloque aussi son incorporation au complexe TRADD/RIP/TRAFF-2 (Tschopp et al. 1998; Elmore 2007) (Peter 2004). L'expression de c-FLIP est en partie sous la dépendance de la voie NF- κ B qui, comme cela a déjà été dit, activée par TNFR1 induit la survie des cellules. Il existe donc une contradiction en ce qui concerne la réponse aux signaux de mort ou de survie par un même récepteur. Cette complexité mécanistique permet à la cellule, après l'intégration de ces signaux, de pencher vers un côté de la balance : mort ou survie ?

B. La voie intrinsèque mitochondriale

1. Le rôle de la mitochondrie

La mitochondrie est un organe intracellulaire composé d'une matrice entourée d'une membrane interne et d'une membrane externe formant un espace intermembranaire. Elle est depuis longtemps identifiée comme l'organe indispensable à la production d'ATP et n'a été que récemment impliquée dans la régulation des mécanismes de mort cellulaire lorsqu'il a été montré que le cytoplasme dépourvu de mitochondrie n'était pas capable d'induire l'apoptose *in vitro*.

La voie intrinsèque de l'apoptose est encore appelée voie du stress. Elle est activée en réponse à des signaux intracellulaires multiples qui perturbent l'homéostasie cellulaire, comme par exemple : les dommages à l'ADN, la privation en facteurs de croissance, l'hypoxie, l'altération du cytosquelette et la dérégulation de la prolifération cellulaire (Bras et al. 2005). La Caspase-8, activée par les récepteurs de mort, peut aussi déclencher la voie d'apoptose mitochondriale par l'intermédiaire de tBid. D'ailleurs, la voie d'apoptose mitochondriale initialement restreinte à une voie d'amplification de la voie des récepteurs de mort, est maintenant considérée comme une voie à part entière.

Suite à de tels stimuli de stress, la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie et son potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) sont perturbés, créant ainsi des pores dans la membrane notés PTPC (pour « permeability transition pore complex ») et constitués de Cyclophiline D, d'ANT (« adenine nucleotide translocator ») pour la membrane interne et de VDAC (« voltage dependent anion channel ») pour la membrane externe (Kroemer et al. 2007). Plusieurs facteurs pro-apoptotiques normalement séquestrés dans l'espace intermembranaire sont alors libérés dans le cytosol et à l'origine de l'activation de l'apoptose : (1) le Cytochrome c active l'apoptose dépendante des caspases, (2) AIF et l'endonucléase G, une fois transloqués au noyau, entraînent la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine de manière indépendante des caspases, et (3) Smac/DIABLO et HtrA2/Omi bloquent l'effet des inhibiteurs de l'apoptose : les protéines IAP (Figure 8).

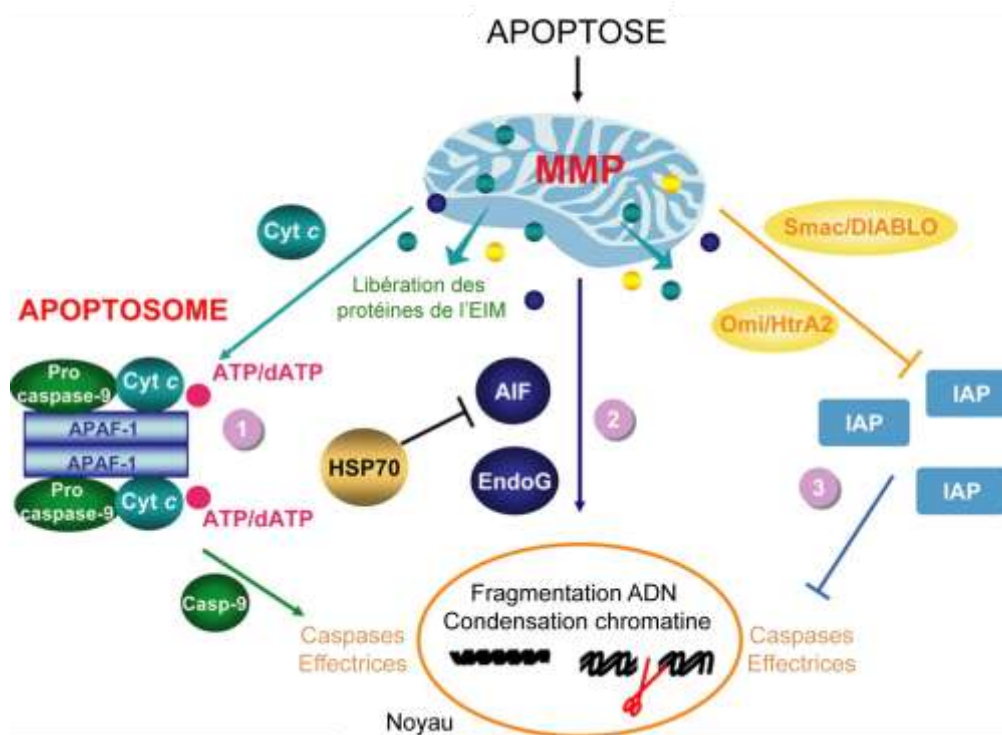


Figure 8 : Libération des protéines apoptogéniques à partir de la mitochondrie.

MMP = perméabilisation de la membrane mitochondriale, EIM = espace intermembranaire de la mitochondrie. D'après Kroemer G et al., *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163.

2. Mécanismes de l'apoptose mitochondriale « classique »

La voie classique de l'apoptose est déclenchée par la libération du Cytochrome c dans le cytosol. La liaison du Cytochrome c à Apaf-1 induit un changement conformationnel de ce dernier qui peut alors lier l'ATP et la pro-Caspase-9, formant ainsi un complexe heptamérique appelé apoptosome (Figure 8). C'est au sein de l'apoptosome que la Caspase-9 est rendue active, et en tant que caspase initiateur, elle entraîne l'activation des Caspases-3 et -7. La Caspase-3 peut alors activer les Caspases-2 et -6 puis les Caspases-8 et -10 (Creagh and Martin 2003). Les cellules ne possédant pas la Caspase-9 ou l'Apaf-1 sont résistantes à l'apoptose induite par la voie mitochondriale (Green 2000).

D'autres protéines (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, l'endonucléase G, AIF et d'autres) sont libérées par la mitochondrie dans le cytoplasme afin de consolider et d'amplifier l'apoptose (Figure 8) (Kroemer et al. 2007). Smac/DIABLO est mature suite au clivage protéolytique dans l'espace intermembranaire mitochondrial d'une séquence de 55 acides aminés à son extrémité N-terminale. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 inhibent les protéines de la famille des IAP (pour « inhibitors of apoptosis proteins ») qui pourraient bloquer l'apoptose. L'endonucléase G contribue avec d'autres nucléases à la fragmentation de l'ADN. La

flavoprotéine AIF (« apoptosis inducing factor ») est impliquée dans la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN. L'endonucléase G et AIF entraînent ces phénomènes de manière indépendante des caspases.

En amont de la mitochondrie, les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 semblent contrôler la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et l'activation des caspases (Adams and Cory 2007). Ainsi, la protéine Bcl-2 bloque la libération du Cytochrome c. En revanche, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sont nécessaires à la libération des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie en réponse aux différents signaux intrinsèques délivrés par les protéines « BH3-only » de la même famille. La voie classique de l'apoptose est régulée par les protéines de la famille des IAP qui inhibent les caspases et par les protéines de la famille des Hsp (« heat shock protein ») (Sreedhar and Csermely 2004). Les Hsp sont des protéines chaperonnes qui interagissent et séquestrent les différents composants de l'apoptosome et donc inhibent l'activation de la pro-Caspase-9. Les protéines des familles Bcl-2 et IAP seront abordées dans un chapitre consacré à la régulation de l'apoptose.

3. L'apoptose liée au stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique ou RE est un organite sous forme de réseau présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Il a un rôle important dans la détoxification des cellules et le stockage du calcium. Cependant, ses fonctions principales sont la production des macromolécules, le transfert des substances vers l'appareil de Golgi et la modification des protéines. En effet, le RE joue un rôle critique dans le repliement correct des protéines qui pourront alors être transportées vers l'appareil de Golgi.

Le RE comprend une machinerie de signalisation de stress nommé UPR pour « unfolded protein response » qui est activée sous l'effet de stress environnementaux comme lors des infections virales, des carences nutritionnelles ou de la présence de substances toxiques. La défaillance et l'accumulation de protéines mal conformées, et la perturbation de l'homéostasie calcique au niveau du RE déclenchent un signal de stress qui peut aboutir à la mort cellulaire. L'UPR est donc impliquée dans la résistance aux stress et dans la régulation de l'apoptose (Breckenridge et al. 2003). La Caspase-12 pourrait constituer la molécule-clé dans l'initiation de la voie d'apoptose déclenchée par le système UPR en activant directement la Caspase-9 (Rao et al. 2004). Cependant, le rôle de la Caspase-12 reste controversé.

IV. La régulation de la mort cellulaire

A. La famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 contrôlent l'intégrité de la membrane mitochondriale en intégrant les différents signaux de stress de la cellule. Ainsi, ils jouent un rôle crucial dans le processus apoptotique (Danial 2007).

1. Découverte de la famille Bcl-2

Le rôle oncogénique de Bcl-2 (« B-cell leukemia/lymphoma 2 ») a été découvert en 1985 suite au clonage du point de cassure de la translocation réciproque entre les chromosomes 14 et 18, mettant ainsi le gène *bcl-2* sous la dépendance du promoteur fort du gène des *immunoglobulines* (Tsujimoto et al. 1985) (Bakhshi et al. 1985) (Cleary et al. 1986). Cette cassure, caractéristique des lymphomes B folliculaires, entraîne la surexpression de Bcl-2 et confère un avantage de survie aux cellules tumorales. Avec cette découverte, une nouvelle classe d'oncogènes émerge. En effet, les régulateurs de la mort cellulaire, au contraire des autres oncogènes connus jusqu'alors, ne favorisent pas la prolifération, mais bloquent activement l'apoptose. Ces données ont permis d'établir le concept selon lequel un défaut d'apoptose pouvait intervenir dans le développement tumoral.

2. Structure

La protéine Bcl-2 est le membre fondateur de la famille Bcl-2 qui comprend plus de 18 membres chez les mammifères (Figure 9). L'originalité de cette famille est qu'elle comprend aussi bien des protéines anti- que pro-apoptotiques, lesquelles partagent une séquence d'homologie connue sous le nom de domaine BH pour « Bcl-2 homology » qui correspond à une hélice α . Tous les membres anti-apoptotiques et une partie des membres pro-apoptotiques (Bax et Bak) correspondent à des protéines à multidomaines partageant trois à quatre domaines BH : BH1-BH4. L'autre partie des membres pro-apoptotiques correspond aux protéines à « BH3-only » puisqu'elles portent uniquement un domaine BH : le domaine BH3. Grâce aux régions BH, les différents membres de cette famille ont la capacité de se lier les uns les autres, ce qui est essentiel à leurs fonctions. En effet, les

domaines BH1, BH2 et BH3 des protéines anti-apoptotiques forment une poche hydrophobe qui peut se lier à la face hydrophobe de l'hélice α amphipathique du domaine BH3 des membres pro-apoptotiques. Le domaine BH4 intervient dans la stabilisation de la poche hydrophobe. Aussi, la boucle entre les domaines BH3 et BH4 est sujette à diverses modifications post-traductionnelles régulant ainsi la fonction de survie des membres anti-apoptotiques (Youle and Strasser 2008). En plus des domaines BH, plusieurs protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire leur permettant d'être intégrées dans les membranes subcellulaires incluant la membrane externe de la mitochondrie et les membranes du RE et du noyau (Youle and Strasser 2008).

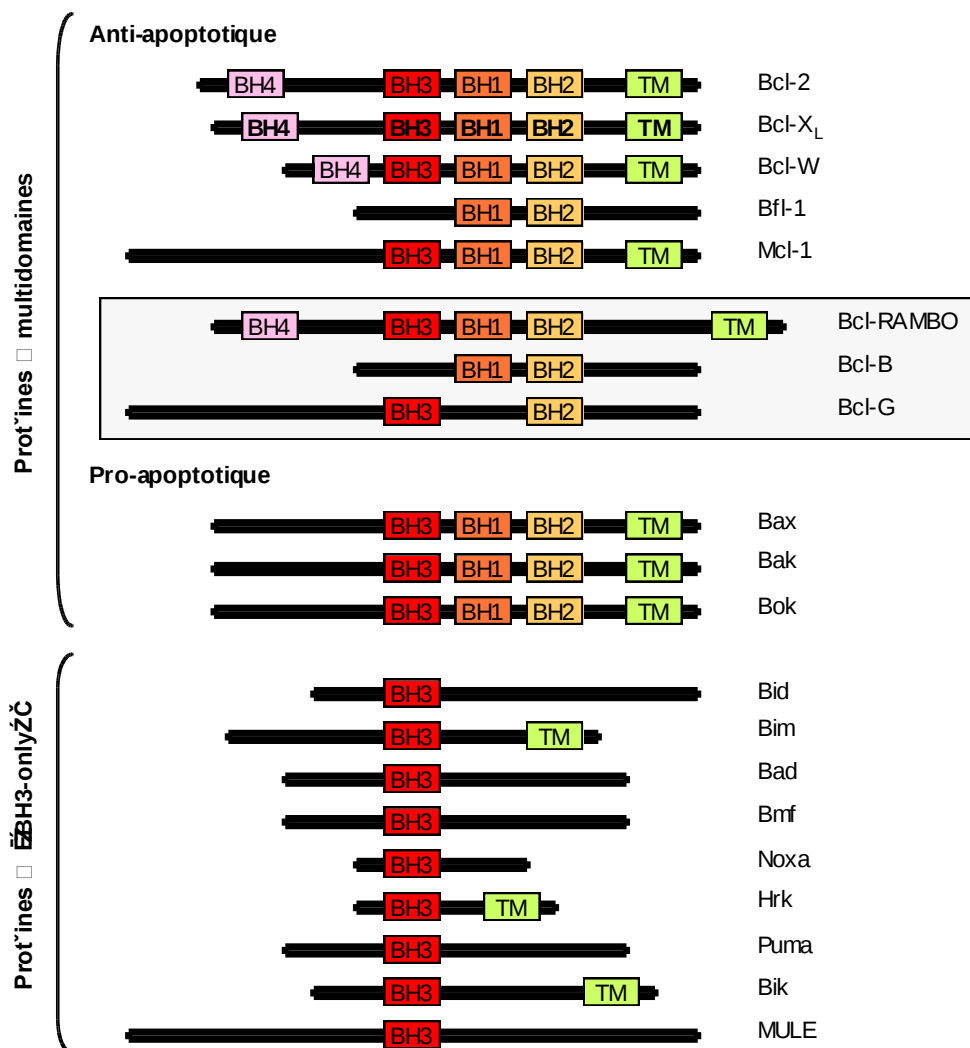


Figure 9 : Structure des membres de la famille Bcl-2.

BH = domaine d'homologie Bcl-2, TM = région transmembranaire. Les 3 protéines dans le cadre gris sont moins bien étudiées et ne peuvent pas être classées avec certitude pour le moment.

D'après Youle RJ et Strasser A, Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):47-59.

3. Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

Les cellules doublement déficientes pour les deux protéines pro-apoptotiques à multidomaines, Bax et Bak, sont incapables de libérer leur Cytochrome c et sont résistantes à tous les stimuli apoptotiques qui activent la voie intrinsèque de l'apoptose (Wei et al. 2001). Ces deux membres assurent donc l'entrée vers la voie mitochondriale de l'apoptose. Il semble que Bax et Bak ne soient pas redondants mais prépondérants selon le type cellulaire.

L'activation de Bax et Bak au cours de l'apoptose nécessite de multiples changements de conformation permettant leur homo-oligomérisation au sein de la membrane mitochondriale. Le mécanisme lié à ce changement conformationnel diffère pour chacun. Bax est une protéine monomérique sous forme soluble dans le cytosol ou attachée à la membrane mitochondriale, qui s'insère dans la membrane mitochondriale externe sous l'effet d'un stimulus apoptotique, les monomères s'associent entre eux pour former des pores (Annis et al. 2005). Au contraire, Bak est une protéine résidante de la mitochondrie, les monomères de Bak sont donc déjà intégrés dans la membrane mitochondriale externe avant même l'induction de l'apoptose. En absence de signal apoptotique, l'oligomérisation de Bak doit être inhibée pour stabiliser sa conformation monomérique. Ceci est assuré par son interaction avec soit VDAC2, une protéine de la membrane mitochondriale externe, soit Mcl-1 ou Bcl-X_L, deux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Danial 2007).

L'homo-oligomérisation de Bax et Bak semble essentiel à la formation de pores dans la mitochondrie et donc au mécanisme de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et à la libération du Cytochrome c. De récentes études suggèrent que seuls les oligomères de Bax pourraient former un canal de diamètre suffisamment large pour permettre le passage du Cytochrome c (Dlugosz et al. 2006) (Peng et al. 2006a). Cependant, le mécanisme précis de la libération du Cytochrome c dans le cytosol n'est pas encore élucidé. Plusieurs questions subsistent : existe-t-il des pores distincts de Bax et de Bak, des pores hybrides avec d'autres protéines de la mitochondrie ou même un autre mécanisme global de perméabilisation mitochondriale ? En plus de leur rôle à la mitochondrie, Bax et Bak interviennent dans la fuite de Ca²⁺ à partir du RE qui peut être capté par la mitochondrie et en affecter son intégrité (Danial 2007).

4. Mécanismes d'activation de Bax et Bak

En amont, les protéines « BH3-only » constituent les sentinelles qui répondent aux signaux de survie et de mort, et sont requises pour l'induction de la mort par Bax et Bak (Figure 10) (Hacker and Weber 2007). Le rôle des « BH3-only » est restreint selon le tissu et le signal de stress, ces protéines sont sous le contrôle de modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles. Noxa et Puma sont transcrits sous l'effet de p53, en accord avec leur rôle de sentinelle lors d'un dommage à l'ADN. Bid est clivé en tBid (sa forme active) par la Caspase-8 sous l'effet de l'activation des récepteurs de mort. L'activité de Bad est régulée par phosphorylation. Bim est séquestré au niveau des microtubules par son interaction avec la dynéine. Le grand nombre de ces protéines s'explique par leur spécialisation plutôt que par une éventuelle redondance (Danial 2007). Ainsi, différents signaux de stress peuvent être captés par la mitochondrie, une sentinelle « BH3-only » spécialisée et adaptée sera recrutée pour chaque type de signal : dommage à l'ADN, privation en facteurs de croissance et glucose, mauvaise conformation de protéines, hypoxie...

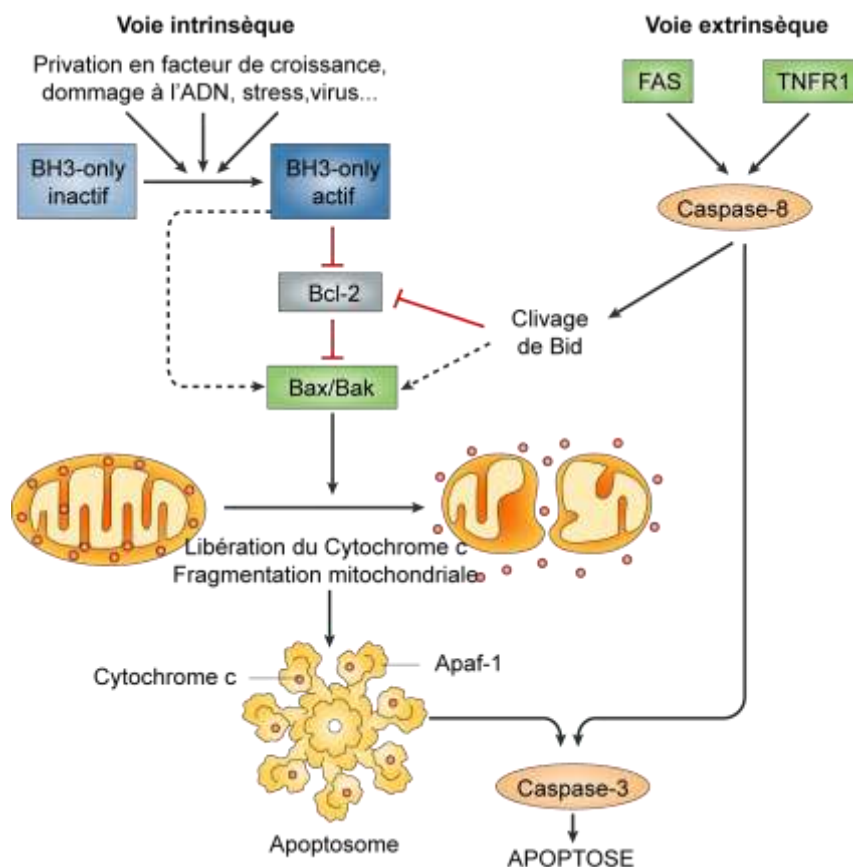


Figure 10 : Rôle central de la famille Bcl-2 dans l'intégration des signaux de mort et de survie.

D'après Youle RJ et Strasser A, Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):47-59.

Les protéines « BH3-only » sont actives quand la face hydrophobe de leur hélice BH3 est exposée, leur permettant d'interagir avec la poche hydrophobe de leurs partenaires à multidomaines. Deux modèles d'activation de Bax et Bak par les protéines « BH3-only » sont élaborés : les modèles d'activation indirecte et directe (Figure 11) (Adams and Cory 2007) (Danial 2007).

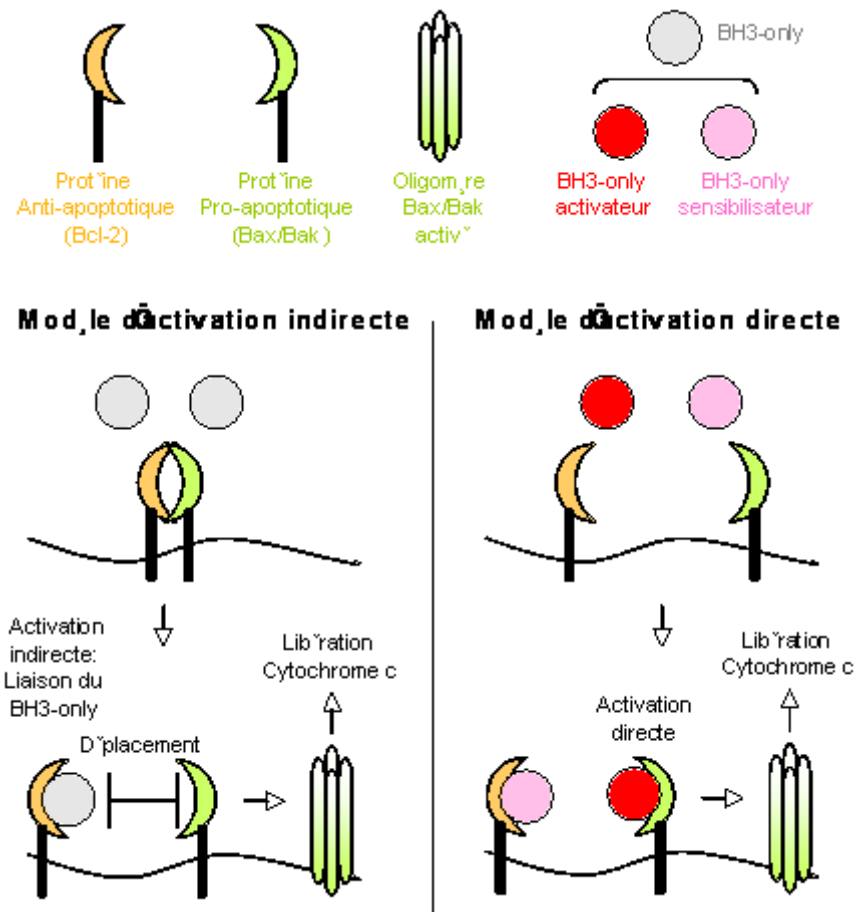


Figure 11 : Modèles d'activation de Bax et Bak par les protéines « BH3-only ».

D'après Danial NN, Clin Cancer Res. 2007 Dec 15;13(24):7254-63.

Le modèle d'activation indirecte se base sur des interactions inhibitrices entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques à multidomaines. Les protéines « BH3-only » initient l'apoptose en se liant aux protéines anti-apoptotiques et en libérant ainsi leurs partenaires pro-apoptotiques, Bax et Bak (Willis et al. 2005). Ce modèle place les protéines « BH3-only » en amont des membres anti-apoptotiques, eux-mêmes en amont des membres pro-apoptotiques à multidomaines. Il existe deux catégories de protéines « BH3-only » selon leur sélectivité vis-à-vis des membres anti-apoptotiques (Chen et al. 2005). Par exemple, Bid et Bim peuvent se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques alors que Noxa et Bad interagissent préférentiellement avec Mcl-1 et Bcl-X_L.

Le modèle d'activation directe propose que les deux catégories de protéines « BH3-only » correspondent aux activateurs et aux sensibilisateurs. Dans ce modèle, les « BH3-only » activateurs, comme Bid et Bim, peuvent interagir avec les membres à multidomaines qu'ils soient anti- ou pro-apoptotiques et peuvent directement induire l'oligomérisation de Bax et Bak en se liant à eux (Letai et al. 2002) (Kuwana et al. 2005). Puma pourrait être un « BH3-only » activateur et sensibilisateur selon les situations (Cartron et al. 2004). Dans ce modèle, la fonction principale des molécules anti-apoptotiques est de séquestrer les « BH3-only » activateurs. La balance penche vers l'apoptose lorsque ces derniers deviennent majoritaires par rapport aux protéines anti-apoptotiques et/ou lorsque que les « BH3-only » sensibilisateurs remplacent les activateurs dans la poche des protéines anti-apoptotiques, libérant ainsi les activateurs qui peuvent alors induire l'oligomérisation de Bax et Bak. Les activateurs ne sont que très transitoirement associés à Bax et Bak, c'est le scénario de « hit and run ». Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, mais cohabitent probablement au sein d'une même cellule.

B. La famille des IAP

Les IAP (« inhibitors of apoptosis proteins ») sont les seules protéines endogènes connues pour réguler l'activité des caspases à la fois initiatrices et effectrices. Ainsi, les IAP bloquent l'apoptose induite par une grande variété de stimuli comme l'activation des récepteurs de mort, la privation en facteurs de croissance, les radiations ionisantes ou encore les dommages génotoxiques.

1. Découverte de la famille des IAP

Les deux premiers gènes des IAP ont été identifiés en 1993 (Crook et al. 1993) et 1994 (Birnbaum et al. 1994) chez les baculovirus pour leur capacité à compenser la perte de fonction de P35, un puissant inhibiteur baculoviral des caspases. Les IAP sont utilisées par les baculovirus pour permettre leur propagation virale en bloquant la réponse apoptotique de défense de la cellule hôte de l'insecte. Depuis cette découverte, les protéines IAP ont été identifiées dans une grande variété d'espèces allant de la levure aux mammifères.

2. Structure

Chez les mammifères, 8 IAP ont été identifiées jusqu'à maintenant (Hunter et al. 2007) : NAIP (neuronal IAP/BIR containing gene 1/BIRC1), c-IAP1 (cellular IAP1/BIRC2), c-IAP2 (cellular IAP2/BIRC3), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis/BIRC4), survivine (BIRC5), BRUCE/Apollon (BIR containing ubiquitin conjugating enzyme/BIRC6), livine (BIRC7) et Ts-IAP (testis-specific IAP/BIRC8) (Figure 12).

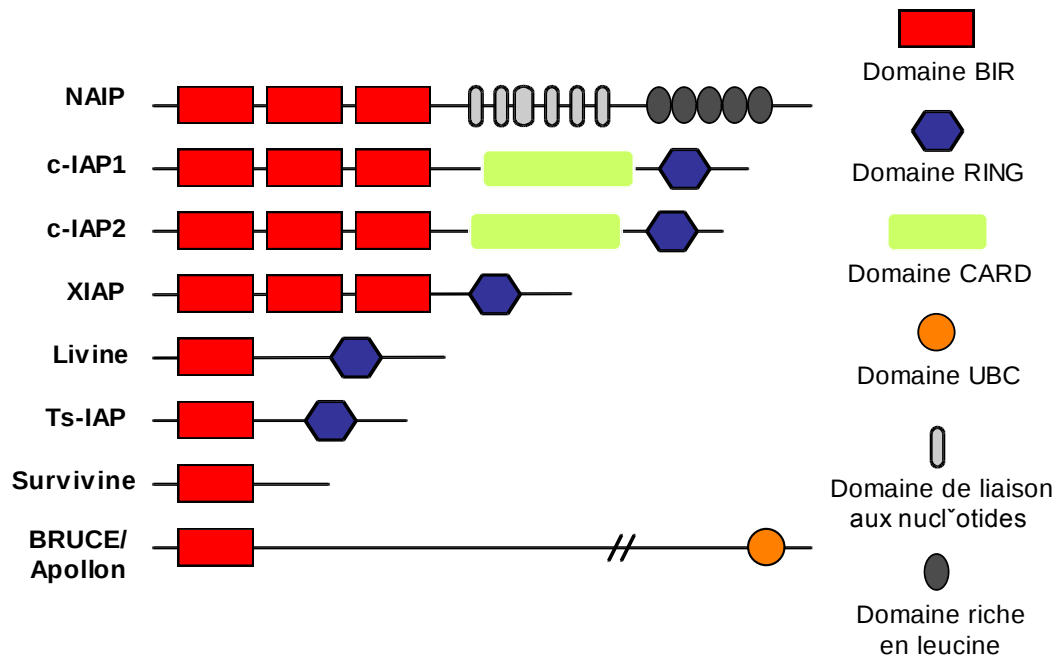


Figure 12 : Structure des membres de la famille des IAP.

D'après Hunter AL et al., Apoptosis. 2007 Sep;12(9):1543-68.

Les IAP contiennent tous un à trois domaines structuraux BIR (« baculovirus IAP repeat »). Le domaine BIR, de 70 à 80 acides aminés riches en cystéine et histidine, chélate un atome de zinc et forme une structure globulaire de 4 ou 5 hélices α et de feuillets β en nombre variable. Initialement, il était pensé qu'un seul domaine BIR était suffisant pour l'inhibition directe des caspases par les IAP. Nous verrons que ce n'est pas aussi simple que ça, puisque malgré leur ressemblance, tous les domaines BIR ne sont pas égaux. D'une façon générale, le BIR fonctionne en tant que domaine d'interaction protéique. D'autres domaines peuvent être retrouvés dans les IAP, notamment les domaines RING (« really interesting new gene »), UBC (« ubiquitin conjugating enzyme ») et CARD (« caspase recruitment domain »). Pour XIAP, c-IAP1, c-IAP2 et livine, il est montré que leur domaine RING possède une activité ubiquitine ligase (E3) régulant directement leur propre ubiquitination et la dégradation d'autres protéines. BRUCE porte un domaine UBC qui possède une activité ubiquitine de conjugaison (E2) (Vaux and Silke 2005). En ce qui

concerne le domaine CARD, seuls c-IAP1 et c-IAP2 en possèdent un. Classiquement, les domaines CARD peuvent s'oligomériser entre eux, mais leur fonction n'est pas bien connue dans les c-IAP. Indubitablement, leurs domaines CARD leur permettent de former des interactions protéiques, peut-être avec Apaf-1 ou des protéines portant des domaines DD ou DED (Martin 2001).

3. Expression

Chez l'Homme, XIAP est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus adultes et fœtaux. En fait, XIAP semble constituer la protéine IAP qui fournit une prévention constante vis-à-vis de l'apoptose dans les cellules saines. Son expression apparaît augmentée dans de nombreuses lignées tumorales, ce qui renforce l'idée que le niveau d'expression de XIAP puisse contrôler le seuil apoptotique des cellules (Liston et al. 1996). De plus, le transcrit de XIAP possède un élément IRES (« internal ribosome entry site ») au niveau de son extrémité 5' non traduite qui permet son expression en condition de stress malgré le blocage de la transcription cap-dépendante (Holcik et al. 1999). XIAP est donc préférentiellement exprimé par rapport à d'autres protéines sous les mêmes conditions de stress. Par exemple, sous l'effet de faibles doses de radiations γ , XIAP est augmenté grâce à sa séquence IRES (Hunter et al. 2007).

En ce qui concerne c-IAP1 et c-IAP2, ils peuvent s'associer au récepteur de mort TNFR2 par l'intermédiaire de leur domaine BIR avec les domaines TRAF de l'hétérocomplexe TRAF1-TRAF2 (Rothe et al. 1995). TNFR1 peut également recruter c-IAP1 par son interaction avec TRAF2 via TRADD. Comme nous l'avons vu précédemment, les TNFR peuvent transmettre des signaux de mort et de survie. L'augmentation de l'expression des c-IAP est observée suite à l'activation de la voie NF- κ B en réponse à la signalisation des TNFR. Dans ce contexte, les c-IAP joueraient un rôle dans la protection des cellules contre apoptose induite par le TNF α en réduisant le niveau de Caspase-8 activée (Hunter et al. 2007).

Les autres membres de la famille des IAP ont des « patterns » d'expression différents selon les tissus : NAIP est abondant dans le cerveau (Lesne et al. 2005) et Ts-IAP est détecté uniquement au niveau du testicule (Lagace et al. 2001). Exprimé dans la plupart des tissus, mais de façon plus abondante dans le cerveau et le foie, BRUCE/Apollon est une protéine membranaire du réseau golgien et autres structures vésiculaires (Hao et al. 2004). La livine, aussi appelée ML-IAP (melanoma-IAP) ou KIAP (kidney IAP), est fortement

exprimée dans les tissus embryonnaires et les cellules transformées ainsi que dans plusieurs cancers (Chang and Schimmer 2007). Au contraire, la livine est indétectable dans la plupart des tissus différenciés normaux.

4. Inhibition des caspases

Très rapidement après la découverte de la famille des IAP, il a été montré que l'expression de ces protéines inhibait le processus apoptotique induit à la fois par la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Le mécanisme par lequel les IAP bloquent l'apoptose est identifié pour la première fois par Deveraux et al. Dans leurs études, XIAP est montré comme inefficace dans l'inhibition du clivage initial de la Caspase-3 par la Caspase-8, mais capable d'empêcher sa transformation en sous-unités matures (Deveraux et al. 1997). Donc XIAP inhibe la voie extrinsèque sans interférer directement sur l'activation de la Caspase-8, mais plutôt à travers l'inhibition des caspases effectrices en aval. De plus, l'étude des interactions protéiques de XIAP montre sa liaison aux Caspases-3 et -7, mais pas aux Caspases-1, -6 ou -8. Plus tard, des essais *in vitro* confirment que XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 empêchent le clivage protéolytique des pro-Caspases-3, -6 et -7 et bloquent aussi l'activation de la pro-Caspase-9 par le Cytochrome c (Figure 13) (Deveraux et al. 1998). Récemment, XIAP a été impliqué dans l'inhibition de AIF par la formation d'un complexe qui conduit à sa dégradation (Wilkinson et al. 2008).

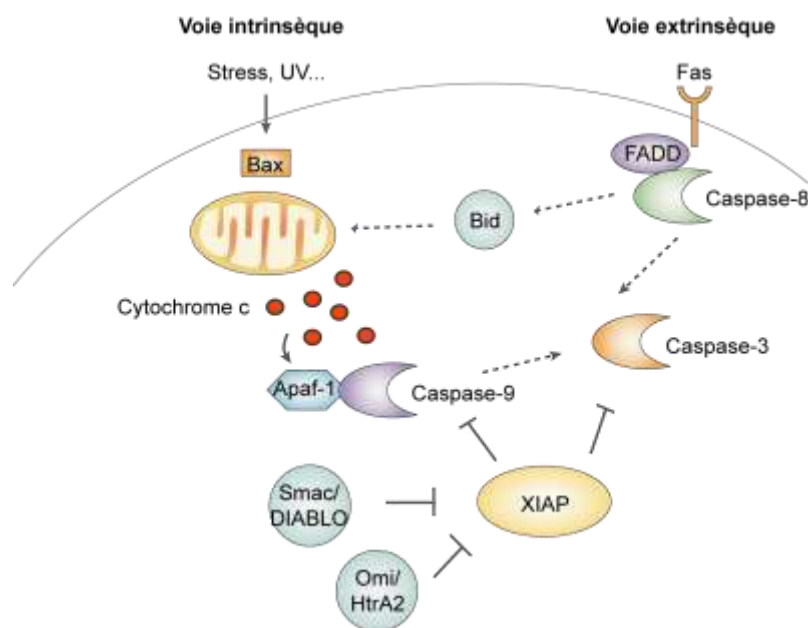


Figure 13 : Rôle de XIAP dans l'inhibition des caspases.

D'après Salvesen GS et Duckett CS, Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Jun;3(6):401-10.

Afin de disséquer le mécanisme d'inhibition des caspases par les IAP, la capacité des différents fragments de XIAP à supprimer l'activation des caspases *in vitro* et l'apoptose dans des cellules intactes, a été testée. Ainsi, il a été montré que le domaine BIR2 inhibe spécifiquement les Caspases-3 et -7 tandis que le domaine BIR3 bloque l'activité de la Caspase-9. Des études de cristallographie et de mutagenèse dirigée établissent que les domaines BIR des IAP ont en fait des mécanismes différents d'inhibition des caspases. Par exemple, le domaine BIR2 de XIAP requiert absolument de la région de liaison entre les domaines BIR1 et BIR2 pour bloquer les Caspases-3 et -7 (Figure 14). En fait, seule cette région est en contact avec la Caspase-3, le BIR2 étant complètement caché dans la structure cristalline. Cependant, l'interaction avec la Caspase-7 est légèrement différente puisque le BIR2 est nécessaire pour stabiliser l'interaction de la région de liaison avec la caspase. Par cristallographie, il a été montré que le BIR3 de XIAP forme un hétérodimère avec la Caspase-9, la stabilisant sous sa forme inactive en empêchant son homodimérisation qui est nécessaire à son activité auto-catalytique (Figure 14). En ce qui concerne le domaine BIR1, aucune activité inhibitrice des caspases n'a été démontrée. Pour XIAP, ce domaine serait impliqué dans sa régulation (Hunter et al. 2007).

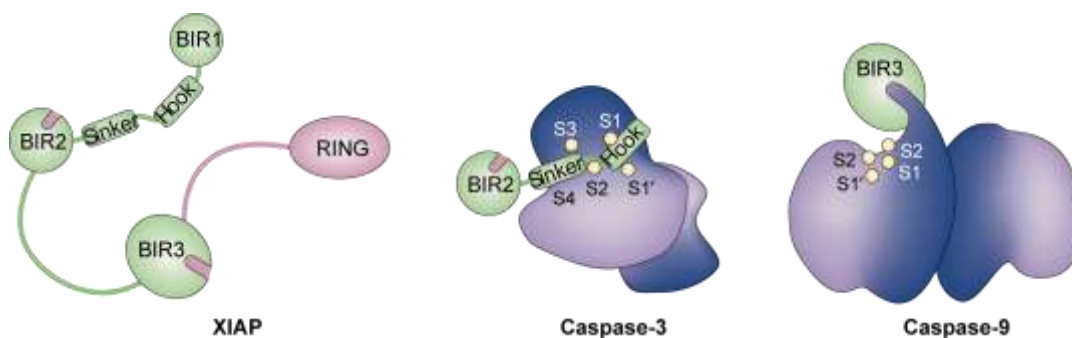


Figure 14 : Interactions de XIAP avec les Caspases-3 et -9.

Les domaines « sinker » et « hook » forment la région de liaison de XIAP, S = site actif des caspases.

D'après Salvesen GS et Duckett CS, Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Jun;3(6):401-10.

Récemment, il a été suggéré que seul XIAP constituait un véritable antagoniste direct des caspases, certains autres IAP pouvant lier les caspases sans les inhiber directement (Eckelman et al. 2006). En effet, c-IAP1 et c-IAP2 sont capables d'interagir directement avec les caspases, mais leur capacité à les inhiber *in vitro* a été attribuée à un artéfact de la fusion des c-IAP avec une particule de GST. De même, en système acellulaire, la livine semble pouvoir interagir avec les Caspases-3, -7 et -9, mais avec une affinité largement inférieure (environ 300 fois moins) à celle de XIAP pour ces mêmes caspases. En fait, seuls les motifs BIR de XIAP possèdent les résidus amino-acides indispensables à sa puissante activité inhibitrice vis-à-vis des caspases. Cependant, l'activité anti-apoptotique des autres IAP n'est

pas remise en cause. Les mécanismes anti-apoptotiques des IAP, à l'exception de XIAP, seraient indirects. En effet, les IAP semblent servir de piège pour leurs antagonistes afin de libérer XIAP, le seul inhibiteur des caspases. Par exemple, la livine interagit avec Smac/DIABLO, un inhibiteur direct des IAP, avec au moins la même affinité que XIAP (Chang and Schimmer 2007). BRUCE/Apollon fonctionne de façon similaire avec Smac/DIABLO et la Caspase-9, mais en plus les entraîne vers le protéasome via son domaine UBC (Hao et al. 2004). Aussi, les c-IAP pourraient inactiver les caspases en les entraînant vers le protéasome grâce à leur domaine RING ou par un autre système (Vaux and Silke 2005). Contrairement aux études précédentes, associés à TRAF2 les c-IAP inhiberaient l'activation de la voie NF- κ B, empêchant la sécrétion du TNF α qui est capable d'activer la Caspase-8 et d'induire la mort des cellules de manière autocrine (Varfolomeev et al. 2007) (Vince et al. 2007).

5. Régulation protéique des IAP

Ubiquitination et dégradation

L'ubiquitination des IAP et leur dégradation protéosomale subséquente constituent un événement clé dans la régulation du processus apoptotique. De plus, le domaine RING des IAP induit aussi bien la dégradation des IAP que celle de leurs substrats (Vaux and Silke 2005). En effet, le domaine RING de XIAP et c-IAP1/2 a été impliqué dans leur ubiquitination et leur dégradation suite à l'induction de l'apoptose. Leur dégradation peut être bloquée au moyen d'inhibiteurs de protéasome. D'autres études montrent que XIAP et c-IAP1 peuvent entraîner l'ubiquitination et la dégradation protéosomale des Caspases-3 et -7, par lesquelles ils augmentent leur capacité anti-apoptotique. Il n'est donc pas encore clair si cette activité est plutôt en faveur de l'activité anti-apoptotique des IAP ou au contraire si elle la contrebalance. Les études utilisant des mutants sans domaine RING ont fourni des arguments aux deux scénarios. Alternativement, il se pourrait que le domaine RING participe à l'inhibition de l'apoptose par l'ubiquitination des protéines avec lesquelles les IAP interagissent (caspases ou antagonistes des IAP) en cas de stimulus apoptotique faible, alors qu'un stress apoptotique fort entraînerait la dégradation des IAP et donc la mort cellulaire (Hunter et al. 2007).

De récentes études ont montré que l'ubiquitination et la dégradation de XIAP dépendaient de son statut de phosphorylation. En effet, XIAP est un substrat de la

sérine/thréonine kinase Akt, connue pour favoriser la survie et supprimer l'apoptose induite par de nombreux stimuli. Plus précisément, le domaine BIR1 de XIAP est phosphorylé en sérine 87 par Akt, ce qui réduit son auto-ubiquitination et donc stabilise XIAP (Dan et al. 2004).

Les antagonistes endogènes des IAP

Les antagonistes des IAP n'ont aucun domaine structurel en commun, si ce n'est qu'ils montrent presque tous le même mode de liaison aux IAP via leur motif IBM (« IAP binding motif ») comme c'est le cas de Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 et GSPT1/eRF3 (Hunter et al. 2007). Le motif IBM peut être généré suite à un clivage post-traductionnel. Il semble que les caspases elles-mêmes possèdent ce motif, les antagonistes des IAP peuvent alors fonctionner par compétition avec les caspases pour la liaison aux IAP.

Sous l'effet d'un signal apoptotique via la voie intrinsèque mitochondriale, Smac/DIABLO et le Cytochrome c sont libérés dans le cytoplasme selon des cinétiques similaires mais pas nécessairement identiques. Il semble que la libération de Smac/DIABLO requiert une perméabilité plus importante de la membrane mitochondriale externe, notamment par un dommage mitochondrial persistant ou plus intense. Dans ce cas, Smac/DIABLO interagit directement avec les protéines IAP dans le cytoplasme, empêchant ainsi leur interaction avec les caspases et leur activité ubiquitine ligase (Du et al. 2000). Comme Smac/DIABLO lors d'un signal apoptotique, Omi/HtrA2 mature est déversé de la mitochondrie vers le cytosol où cette sérine protéase peut interagir avec les protéines IAP, les empêchant ainsi de former des complexes avec les caspases (Hegde et al. 2002). Cependant, à la différence de Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 exerce en plus son activité protéasique sur les IAP (Srinivasula et al. 2003). En effet, quand Omi/HtrA2 est surexprimé, une augmentation de la dégradation de XIAP et c-IAP1 est observée. À l'inverse, quand Omi/HtrA2 est ciblé par ARN interférence, la dégradation ou le clivage des IAP n'est plus observé, conduisant ainsi à la résistance des cellules au traitement par TRAIL ou étoposide.

Des antagonistes contenant des motifs IBM ont également été trouvés dans d'autres organelles comme le réticulum endoplasmique (RE). Une de ces protéines récemment identifiées, le GSPT1/eRF3, est localisée dans le RE où elle subit une maturation suite à un signal apoptotique. GSPT1 est alors capable d'interagir avec les IAP, d'induire leur ubiquitination et d'entraîner l'apoptose en favorisant l'activation des caspases (Hegde et al. 2003). Ceci renforce l'idée de l'existence d'une communication entre la mitochondrie et le RE

dans l'induction de l'apoptose. Enfin, le seul antagoniste des IAP (identifié pour le moment) qui n'est pas directement impliqué dans le processus apoptotique est Chk1 (Galvan et al. 2004), une protéine essentielle dans le point de contrôle des dommages à l'ADN pour l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, lors d'une recherche de protéines contenant des motifs IBM au sein d'une base de données, la kinase Chk1 a été identifiée. Puis, il a été montré que Chk1 pouvait former des complexes avec XIAP. Depuis, d'autres protéines contenant un motif IBM ont été découvertes (Verhagen et al. 2007).

Les antagonistes des IAP ne possèdent pas obligatoirement de motif IBM. C'est le cas de la protéine XAF-1 (« XIAP-associated factor 1 »), identifiée pour la première fois chez la levure par un criblage en double-hybride avec XIAP en tant qu'appât. XAF-1 interagit directement avec XIAP pour empêcher son activité anti-apoptotique en provoquant sa re-localisation du cytosol au noyau, peut-être par la séquestration de XIAP (Liston et al. 2001). Cependant, XAF-1 semble aussi pouvoir exercer des effets pro-apoptotiques dans des cellules dépourvues de XIAP (Xia et al. 2006b). L'interaction de XAF-1 avec c-IAP1/2 pourrait expliquer cette observation (Hunter et al. 2007). XAF-1 est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus normaux (Hunter et al. 2007).

V. Dérégulation de l'apoptose dans les cancers

La dérégulation de l'homéostasie cellulaire est un événement pathologique majeur dans l'apparition et la progression des cancers. L'oncogenèse est un processus multifactoriel qui fait intervenir différents mécanismes responsables de la prolifération, la croissance et la survie cellulaires. La contribution d'un défaut d'apoptose a largement été démontrée dans le développement des tumeurs et leur agressivité ainsi que dans l'inefficacité des thérapies anti-tumorales (Danial and Korsmeyer 2004). Différentes anomalies au niveau des points de contrôle des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose ont été mises en évidence dans plusieurs cancers (Hanahan and Weinberg 2000).

Une diminution de l'expression des récepteurs de morts (CD95, TRAIL-R) a pu être observée sur des cellules chimiorésistantes de plusieurs cancers comme les leucémies ou les neuroblastomes. L'expression aberrante de c-FLIP, un des régulateurs négatifs de la voie apoptotique extrinsèque, semble montrer une corrélation avec la progression des tumeurs et leur chimiorésistance. En ce qui concerne les caspases, malgré leur rôle central dans

l'apoptose, leur mutation est un événement rare dans les tumeurs humaines. Cependant, leur expression est souvent diminuée par des modifications épigénétiques dans les cellules cancéreuses comme c'est le cas pour la Caspase-8. De plus, certains agents anti-cancéreux peuvent induire une activation de la voie NF- κ B, qui en retour semble bloquer l'apoptose notamment celle induite par TRAIL (Debatin and Krammer 2004). Ceci s'explique en partie par le fait que NF- κ B active la transcription de nombreux gènes de survie comme c-FLIP, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 et c-IAP2.

L'implication du niveau d'expression des protéines de la famille Bcl-2, surtout Bcl-2 et Bax, a été étudiée dans la réponse au traitement et la survie des patients. Les conclusions sont relativement controversées (Danial 2007). Par exemple, il est clair que la surexpression de Bcl-2 observée dans les lymphomes présentant la translocation t(14 ;18), est corrélée à un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements. Cependant, en absence de cette translocation, le niveau d'expression de Bcl-2 n'est pas informatif. En effet, les niveaux des protéines de la famille Bcl-2 peuvent fluctuer avec la différenciation et le cycle cellulaires, et donc refléter d'autres phénomènes que la résistance à l'apoptose. Ainsi, il semble qu'en plus de leurs niveaux d'expression, l'impact des interactions protéiques entre ces protéines est un élément crucial dans l'induction de l'apoptose. Rares sont les cancers n'exprimant aucune des protéines pro-apoptotiques à multidomaines de type Bax ou Bak. Par contre, les équilibres entre les membres de la famille Bcl-2 sont très souvent modulés dans les tumeurs. Les approches fonctionnelles sont donc certainement plus proches de la réalité que les approches purement descriptives (Deng et al. 2007).

Une variété de lignées cellulaires de cancer et d'échantillons de biopsies tumorales montre un niveau élevé d'expression des IAP. L'exemple le plus impressionnant est celui de la survivine que nous évoquerons dans un chapitre spécialement consacré à cette protéine. L'intérêt pronostique de la surexpression des IAP n'est pas aussi clair que pour celle de la survivine. Par exemple, le niveau protéique de XIAP corrèle avec la sévérité et le pronostic des leucémies myéloïdes aigues mais pas des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Cependant, étant donné le rôle central des protéines IAP dans la régulation de l'apoptose, l'impact de leurs niveaux d'expression dans le développement et la maintenance des cancers continue de faire l'objet de nombreuses études (Hunter et al. 2007). Plusieurs études génomiques des IAP soulignent leur fonction oncogénique. Par exemple, l'amplification d'une région chromosomique englobant les gènes *c-IAP1* et *c-IAP2* a été observée dans plusieurs cancers comme les glioblastomes, les médulloblastomes, les carcinomes rénaux et pulmonaires non à petites cellules. D'ailleurs, une analyse récente montre que cette amplification conduit à la surexpression de ces deux IAP dans des tumeurs

primaires de cancers du poumon. De plus, c-IAP2, en combinaison avec la surexpression de c-Myc, semble aussi pouvoir transformer des hépatoblastes p53^{-/-}, ce qui fournit la première preuve concrète du rôle de c-IAP2 en tant qu'oncogène. Dans les lymphomes B de type MALT, les translocations t(11 ;18) et t(1 ;14) ont été impliquées dans l'activation de NF-κB et la surexpression de c-IAP2. La translocation t(11 ;18) est la plus fréquente, elle est présente dans approximativement 50% des lymphomes MALT extra-nodaux et conduit à l'expression d'une protéine chimérique entre c-IAP2 et MALT1. Cette protéine comporte les domaines BIR de c-IAP2 fusionnés avec l'extrémité C-terminale de MALT1. La translocation la moins fréquente des deux, la translocation t(1 ;14), provoque la surexpression de Bcl-10. Les protéines c-IAP2-MALT1 et Bcl-10 entraînent l'activation de la voie NF-κB qui en retour active entre autres, la transcription de c-IAP2.

Les antagonistes endogènes des IAP peuvent également être mis en cause comme c'est le cas pour XAF-1 qui est trouvé extrêmement diminué dans un panel de lignées cellulaires tumorales (Fong et al. 2000). D'ailleurs, sa restauration entraîne une augmentation de la sensibilité de ces lignées à l'apoptose notamment induite par TRAIL. De plus, les ARNm *XAF-1* sont observés à un faible niveau dans des tissus humains de cancer du côlon par rapport aux tissus sains adjacents du même individu. Des phénomènes d'hyperméthylation du promoteur du gène *xaf-1* ont été mis en évidence. *XAF-1* est donc un gène suppresseur de tumeur.

LE MYELOME MULTIPLE

I. Introduction

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne qui affecte les cellules terminales de la différenciation lymphocytaire B : les plasmocytes, c'est-à-dire les cellules immunitaires productrices d'anticorps. Le MM se caractérise par une expansion clonale de plasmocytes tumoraux principalement dans la moelle osseuse, ce qui se traduit généralement par des lésions ostéolytiques douloureuses accompagnées de fractures spontanées, ainsi que d'une insuffisance médullaire entraînant des infections répétées liées à la défaillance du système immunitaire. Le MM est également caractérisé par un pic d'immunoglobulines (Ig) monoclonales. L'Ig concernée est le plus souvent une IgG ou A, et plus rarement une IgD, E ou M. Il peut aussi s'agir d'une sécrétion de chaînes légères des Ig : κ ou λ . Cependant, dans quelques cas, les plasmocytes myélomateux ne sécrètent aucune Ig, ces MM sont dits non sécrétants.

Au second rang après les lymphomes non-Hodgkiniens, le MM représente 15% des hémopathies malignes. En France, le MM est responsable de 2% de la mortalité due aux cancers. L'incidence du MM augmente rapidement avec l'âge (5 pour 100 000 individus à 50 ans contre 20 pour 100 000 individus à 80 ans) et est relativement similaire dans tous les pays développés. L'âge médian au diagnostic est de 65 ans et compte tenu du vieillissement de la population dans les pays développés, le nombre des MM ne cesse d'augmenter. Son étiologie reste non élucidée. Ce cancer est légèrement plus fréquent chez l'homme que chez la femme. L'incidence du MM est deux fois plus élevée chez la population noire américaine que chez les caucasiens. De plus, l'exposition aux radiations ionisantes semble constituer un facteur de risque au MM. Enfin, malgré quelques cas familiaux de MM, la prédisposition génétique et les facteurs environnementaux restent à éclaircir.

II. Oncogénèse du MM et évolution de la maladie

A. Origine du MM

La maturation des lymphocytes B fait intervenir plusieurs mécanismes de remodelage de ses gènes des Ig : recombinaison VDJ, hypermutation somatique et commutation isotypique (Kuehl and Bergsagel 2002). Dans la moelle osseuse, la recombinaison VDJ assemble des combinaisons de segments d'ADN V, D et J pour créer une Ig composée de chaînes lourdes (H) et légères (L). Le lymphocyte B naïf migre alors du site précurseur, la moelle osseuse, vers les organes lymphoïdes périphériques qui constituent le siège de la réponse immune dépendante de l'antigène, et où le lymphocyte B naïf peut se différencier en lymphocyte B mémoire ou en cellule plasmocytaire immature de type plasmablastique. Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B activés de façon dépendante des lymphocytes T vont initier la formation de centres germinatifs où ils sont soumis à un processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes des Ig et à la sélection des lymphocytes B de forte affinité pour l'antigène. Ces lymphocytes B subissent ensuite la commutation isotypique au cours de leur migration vers la moelle osseuse où les plasmoblastes ainsi générés se différencient en plasmocytes matures qui synthétisent et sécrètent des anticorps (Figure 15).

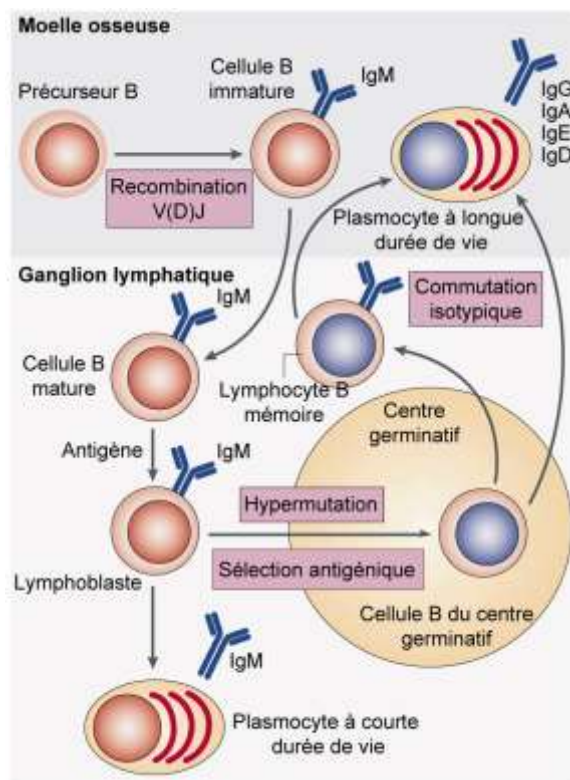


Figure 15 : Développement et différenciation des lymphocytes B.

D'après Kuehl WM et Bergsagel PL, Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):175-87.

La nature exacte de la cellule souche myélomateuse n'est pas totalement élucidée. Cependant, il semble que le précurseur de la tumeur soit un plasmoblaste, c'est-à-dire une cellule B « post-germinative » qui a subi les phénomènes physiologiques d'hypermutation somatique et de commutation isotypique des gènes codant pour les Ig. En effet, l'analyse des gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig a démontré que le clone malin présente un réarrangement VDJ identique, avec les mêmes mutations en VH et VL qui restent stables tout au long de la maladie (Klein et al. 1995) (Kuehl and Bergsagel 2002).

B. Oncogenèse du MM

Le MM est un modèle attrayant pour l'étude de l'oncogenèse (Figure 16). En effet, ce cancer peut être précédé par un stade pré-tumoral non malin identifiable biologiquement. Ce stade est appelé gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS (« monoclonal gammopathy of undetermined significance »). À l'opposé, le MM extramédullaire constitue le stade avancé de la maladie. Il est caractérisé par des plasmocytes circulants qui se nichent hors de la moelle osseuse (sang, liquide pleural, ascite) formant des métastases. Lorsque le sang est envahi par des plasmocytes myélomateux, on parle plus précisément de leucémie à plasmocytes : celle-ci est dite primaire si elle survient *de novo*, ou secondaire si elle évolue à partir d'un MM intramédullaire. Les lignées cellulaires de MM sont presque exclusivement générées à partir de ces prélèvements de liquides extramedullaires.

Le MM constituerait l'étape ultime d'un processus impliquant des mutations génétiques successives (Figure 16) (Bataille and Harousseau 1997) (Kuehl and Bergsagel 2002) (Bergsagel and Kuehl 2005). Les translocations primaires ont lieu précocement dans la pathogenèse tandis que les translocations secondaires semblent impliquées dans sa progression. La première étape serait une translocation illégitime impliquant le gène des chaînes lourdes des Ig (locus IGH) situé sur le chromosome 14, probablement lors de la commutation isotypique. En effet, au stade MGUS, plus de 50% des patients au diagnostic présentent déjà cette translocation sans qu'ils aient pour autant de signes cliniques du MM. Seules, les translocations primaires ne sont donc pas suffisantes pour induire l'oncogenèse (Avet-Loiseau et al. 1999). Ensuite, l'évolution du stade MGUS vers le MM est la conséquence de mutations successives au sein des plasmocytes. En effet, au cours de l'évolution de la maladie, une augmentation de l'instabilité caryotypique est observée notamment due à des translocations secondaires qui conduisent à la dérégulation de divers

oncogènes comme Ras, Myc ou p53, et qui corrént avec l'augmentation de la prolifération et la résistance aux traitements. Des anomalies touchant la structure mais aussi le nombre de chromosomes sont caractéristiques du MM et de son hétérogénéité (Magrangeas et al. 2005).

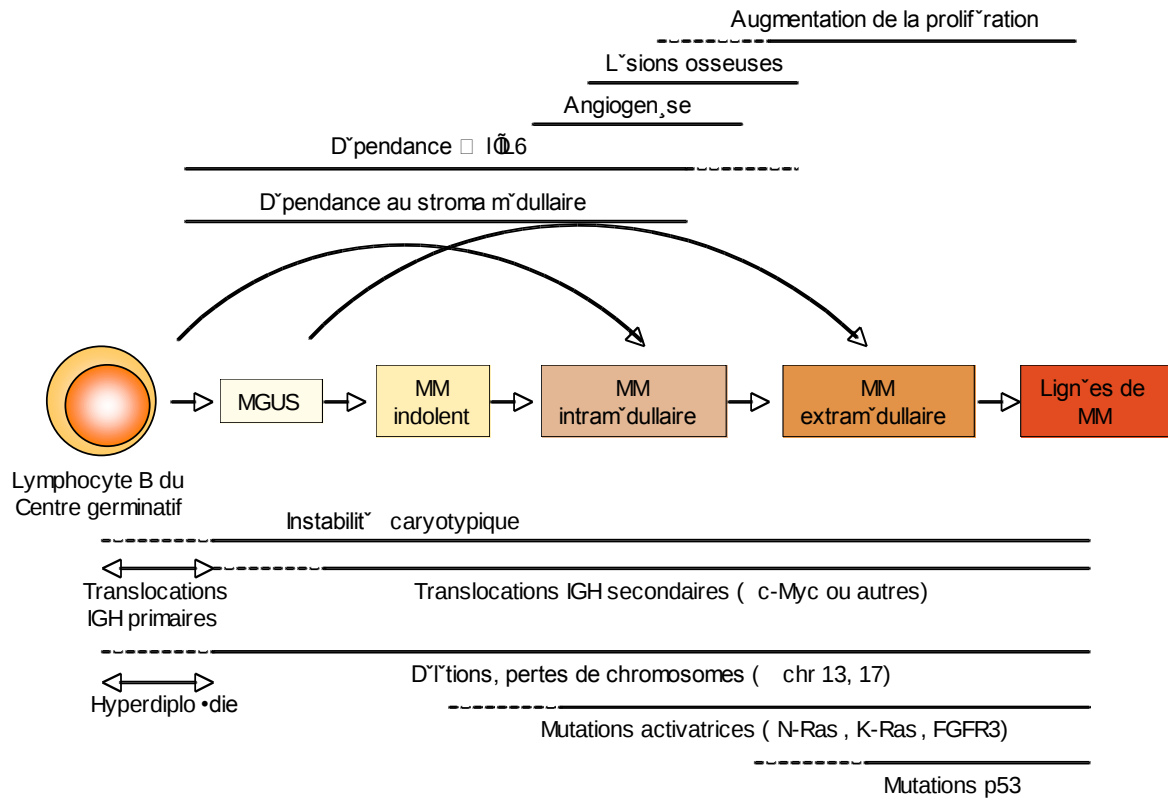


Figure 16 : Evénements génétiques et évolution biologique du MM.

D'après Kuehl WM et Bergsagel PL, Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):175-87.

C. Classification et diagnostic

Les critères de classification et de diagnostic ont été révisés par le Groupe Internationale du Myélome (Durie et al. 2003). Les MGUS se caractérisent par la présence d'une protéine monoclonale sérique de moins de 30 g/l et d'une plasmocytose médullaire inférieure à 10%. Le taux de transformation en MM est évalué à 1% par an avec une probabilité de transformation maligne de 11% en 25 ans. La quantité de protéine monoclonale sérique, l'isotype A de l'Ig monoclonale et les anomalies du ratio des chaînes légères sont des facteurs qui semblent prédire la progression du stade MGUS vers un MM (Rajkumar et al. 2006). L'évolution du taux d'Ig monoclonale dans la première année de suivie est un important prédicteur d'une évolution maligne (Rosinol et al. 2007). L'amylose

due à un dépôt de chaînes légères au niveau de différents tissus (reins, cœur, foie) peut constituer un symptôme des MGUS.

Le MM indolent montre un pic d'Ig monoclonale sérique de plus de 30 g/l et possède une plasmocytose médullaire stable et supérieure à 10% sans lésions ostéolytiques ou autres manifestations cliniques. Les MM indolents représentent 10% des MM et sont très proches des MGUS sur le plan clinique. Cependant, leur probabilité d'évoluer vers un MM symptomatique est presque totale (Kyle et al. 2007). Le terme MM asymptomatique est maintenant considéré comme plus approprié.

Le diagnostic du MM symptomatique repose sur la présence d'une Ig monoclonale dans le sérum et/ou dans les urines, l'augmentation des plasmocytes malins dans la moelle osseuse et/ou dans le sang et des lésions des organes ou des tissus incluant les lésions osseuses. Cependant, la présence d'une Ig monoclonale n'est pas indispensable pour poser le diagnostic de MM puisque environ 30% des MM symptomatiques ont une Ig monoclonale inférieure à 30 g/l et 3% n'en sécrètent pas. Aussi, 5% des patients atteints de MM symptomatique montrent un envahissement médullaire inférieur à 10%. Ce sont donc les symptômes qui aident à poser le diagnostic. Les plus courants sont les douleurs osseuses et l'anémie. La leucémie à plasmocytes est une variante agressive des MM qui se définit par la circulation dans le sang d'au moins 20% de plasmocytes parmi les leucocytes.

III. Biologie du MM

A. Instabilité génomique du MM

La technique de FISH (« interphase fluorescence *in situ* hybridization ») a permis de déterminer que plus de 80% des patients atteints de MM montraient des anomalies chromosomiques (Drach et al. 1995) (Flactif et al. 1995) (Avet-Loiseau et al. 2007). Les caryotypes des plasmocytes myélomateux de ces patients sont complexes, leurs anomalies peuvent toucher la structure (translocation) et/ou le nombre (perte et gain) des chromosomes. L'instabilité chromosomique est donc une caractéristique importante du MM, à l'origine de son hétérogénéité génétique (Magrangeas et al. 2005).

1. Les translocations

De nombreuses anomalies génétiques ont été décrites dans le MM. Les plus fréquentes sont des translocations qui impliquent la région 14q32 du gène des chaînes lourdes des Ig (locus IGH), elles sont retrouvées dans 60 à 70% des patients (Avet-Loiseau et al. 2002) et presque 100% des lignées de MM (Bergsagel et al. 1996). Les partenaires chromosomiques de ces translocations sont variés puisque que plus de 30 régions chromosomiques ont été observées jusqu'à ce jour. Les translocations récurrentes sont les suivantes : t(11 ;14) (20% des patients), t(4 ;14) (15%), t(14 ;16) (5%), t(14,20) (<3%), et t(6 ;14) (<2%). Ces translocations entraînent la dérégulation de gènes spécifiques. Ainsi, la translocation t(11 ;14) conduit à la dérégulation du gène *CCND1*, ce qui induit l'expression aberrante de la CyclineD1. Cependant, ces MM ne montrent pas de prolifération plasmocytaire plus élevée (Fonseca et al. 2002). Quant à la translocation t(4 ;14), elle entraîne la dérégulation de deux gènes situés de part et d'autre du point de cassure du chromosome 4 : les gènes *FGFR3* et *MMSET*. 25% de ces MM ne montrent pas la surexpression de *FGFR3*, évoquant un rôle majeur pour le gène *MMSET* (Santra et al. 2003). Récemment, *MMSET* a été identifié comme ayant une activité méthyltransférase sur certaines histones et pourrait être impliquée dans la répression transcriptionnelle (Marango et al. 2007). La translocation t(14 ;16) provoque la dérégulation du gène *c-maf*. Cet oncogène est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes comme ceux codant la CyclineD2, l'intégrine $\beta 7$ et un récepteur de chimiokine (Hurt et al. 2004). Enfin, la translocation t(14 ;20) est associée à la dérégulation du gène *mafB*, tandis que la t(6 ;14) est associé à la dérégulation du gène *CCND3*.

2. L'hyperdiploïdie

L'hyperdiploïdie représente la seconde anomalie en terme de fréquence. En effet, la moitié des patients atteints de MM montre des plasmocytes malins hyperdiploïdes. La nature des chromosomes en excès n'est pas aléatoire car ce sont spécialement les chromosomes impairs (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21) qui sont touchés. À ce jour, aucune explication plausible n'explique cette observation. Néanmoins, il est fortement probable que l'hyperdiploïdie soit une voie oncogénique distincte des translocations du locus IGH dans le MM, puisque ces deux types d'anomalies sont majoritairement exclusifs. De plus, comme pour les translocations impliquant la région 14q32, l'hyperdiploïdie constitue une anomalie précoce au cours de l'oncogenèse du MM étant observée dès le stade MGUS (Zandecki et al. 1997).

(Kyle and Rajkumar 2006). Notons que les caractéristiques biologiques liées à l'hyperdiploïdie sont difficiles à étudier *in vitro* car aucune lignée cellulaire de MM appartenant à cette classe cytogénétique n'était disponible jusqu'à maintenant. Très récemment, une procédure a été mise au point pour établir de telles lignées. Elle nécessite un passage des cellules primaires chez la souris SCID-Hu (souris immunodéficiente greffée avec un os humain fœtal) puis une culture *in vitro* sur cellules stromales (Li et al. 2007).

Il y aurait donc deux groupes de MM en nombre à peu près équivalent : les MM hyperdiploïdes et les MM non-hyperdiploïdes (Magrangeas et al. 2005) (Avet-Loiseau et al. 2007). Les MM hyperdiploïdes n'ont qu'une très faible incidence (environ 10%) de translocations impliquant le locus IGH ou de délétions touchant leurs chromosomes 13 et 17, contrairement aux MM non-hyperdiploïdes. Ces derniers correspondent aux MM pseudodiploïdes et hypodiploïdes, ils sont surtout caractérisés par une forte incidence (plus de 70%) de translocations impliquant le locus IGH et de fréquentes pertes de chromosomes (entiers ou seulement des parties de chromosomes).

3. Les délétions du chromosome 13

La délétion du chromosome 13 est également retrouvée au stade MGUS avec une incidence similaire à celle des MM (40-50%) (Avet-Loiseau et al. 1999). Cette délétion n'est certainement pas un événement aléatoire. En effet, la délétion du chromosome 13 n'est quasiment jamais associée à l'hyperdiploïdie, mais plutôt avec les translocations t(4 ;14), t(14 ;16) et la délétion du bras court du chromosome 17 (Avet-Loiseau et al. 2002). Tout comme les deux précédentes anomalies, la délétion du chromosome 13 est un événement qui survient lors des premiers stades de l'oncogenèse.

4. Gain du chromosome 1q

Le gain de plusieurs copies du bras long du chromosome 1 (1q), observé chez un tiers des patients, semble associé à la surexpression du gène *CKS1B* dont le rôle oncogénique impliquerait en partie la déstabilisation d'un régulateur du cycle cellulaire p27^{Kip1} (Shaughnessy 2005) (Zhan et al. 2007). Cette amplification est associée à la transformation des MGUS en MM puis à l'aggravation de la maladie (Chang et al. 2006b). Le gain de 1q n'est pas spécifique au MM, cette anomalie étant décrite dans de nombreux cancers.

5. Perte du chromosome 17p

Détectée par FISH chez environ 10% des patients de MM, la perte du bras court du chromosome 17 constitue une anomalie importante dans l'évolution de la maladie (Avet-Loiseau et al. 2007). La cible principale de cette délétion n'est pas connue à ce jour. Toutes les études se sont focalisées sur le gène *TP53* situé en 17p13. Cependant, les mutations de p53 sont rares et plutôt retrouvées chez les MM extramédullaires (Elnenaei et al. 2003). Les résultats actuels ne permettent pas de relier une éventuelle perte d'expression de la protéine p53 à la délétion 17p.

B. Dérégulation de l'homéostasie cellulaire

Le MM est une maladie peu proliférative avec un index de prolifération cellulaire faible : <0,5% dans les MGUS, 1% dans le MM précoce, et rarement 5 à 10% aux stades avancés de la maladie (phase extramédullaire). Cependant, il semble que la tumeur soit composée de deux populations aux caractéristiques distinctes. En fait, il existe une fraction minoritaire de cellules malignes qui seraient certainement plus immatures que le reste de la tumeur et qui conserveraient leur capacité de prolifération à l'origine du renouvellement cellulaire de la tumeur. Une seconde fraction, très majoritaire, serait composée de plasmocytes malins différenciés n'ayant pas ou très peu la capacité de proliférer et dont l'accumulation dans la moelle osseuse serait à l'origine de la masse tumorale. Dans le MM, la dérégulation de l'homéostasie est certainement la conséquence de la persistance d'une prolifération résiduelle couplée à un défaut de mort cellulaire. Ainsi, plusieurs processus cellulaires sont incontrôlés dans le MM, mais leur prépondérance semble différente selon la sous-population tumorale prise en compte. La tumeur myélomateuse présente une hétérogénéité cellulaire et phénotypique.

1. Dérégulation du cycle cellulaire

L'index de prolifération

L'index de prolifération globale prend en compte la totalité de la tumeur alors que la population proliférante ne représente qu'un faible pourcentage. En effet, une étude utilisant

la thymidine tritiée de façon prolongée chez des patients atteints de MM a évalué la fraction proliférante de la tumeur à moins de 4%, généralement inférieure à 1% au diagnostic ou en rémission. Puis, cette fraction augmente au moment de la rechute, allant de 14% à 83%, notamment dans les cas de rechutes extramédullaires qui, par ailleurs, sont les seuls MM à montrer une réduction du temps de génération de leurs cellules myélomateuses proliférantes. Globalement, cette étude montre que la majorité des cellules de MM ne prolifèrent pas (ou très peu) et que le taux de croissance de la tumeur myélomateuse est affecté principalement par la taille de son compartiment proliférant ainsi que la quantité de sa perte cellulaire (apoptose), et n'est que très partiellement touché par le temps de génération de ses cellules proliférantes (Drewinko et al. 1981).

Malgré la taille restreinte du compartiment proliférant de la tumeur myélomateuse, l'index de prolifération montre une corrélation inverse avec la survie des patients et constitue un des plus puissants facteurs pronostiques. Ceci a été démontré en utilisant plusieurs techniques de mesure de l'index de prolifération: thymidine tritiée (Drewinko et al. 1981), BrdU (Greipp et al. 1988) ou encore Ki67 (Alexandrakis et al. 2004) (Gastinne et al. 2007). En fait, les plasmocytes normaux sont des cellules différenciées qui ne cyclent plus au contraire des cellules myélomateuses proliférantes qui, même en faible pourcentage, sont à l'origine d'une prolifération résiduelle anormale assurant l'auto-renouvellement de la tumeur.

Les molécules du cycle cellulaire

Dans le MM, la dérégulation des cyclines de type D est observée dans plus de 95% des cas, constituant un événement oncogénique précoce et universel (Figure 17) (Bergsagel and Kuehl 2005). Certaines translocations peuvent déréguler soit directement les gènes *CCND1* et *CCND3*, comme c'est le cas des translocations t(11 ;14) et t(6 ;14) respectivement, soit indirectement le gène *CCND2*, comme c'est le cas des translocations t(14 ;16) et t(14 ;20). La translocation t(4 ;14) est également associée à une expression anormale de la CyclineD2. Enfin, une expression élevée en CyclineD1 est retrouvée chez plus de 30% des patients hyperdiploïdes sans la présence d'une translocation t(11 ;14). Cependant, les conséquences fonctionnelles de l'expression aberrante des cyclines de type D ne sont pas claires étant donné le manque de corrélation avec la prolifération ou la progression de la maladie. Il est possible que la surexpression des cyclines de type D sans celle des Cdk4/6 n'est pas de conséquence sur le cycle cellulaire (Chen-Kiang 2003). De plus, une étude a révélé que seule la CyclineD2, avec Cdk4/6, entraînait le cycle via la phosphorylation de Rb et était associée aux stades avancés de la maladie (Ely et al. 2005).

Enfin, dans des lignées et cellules primaires de MM, l'expression de la CyclineD2, même dérégulée, reste sous la dépendance de mitogènes (IGF1, sérum) contrairement à celle de la CyclineD1 (Glassford et al. 2007).

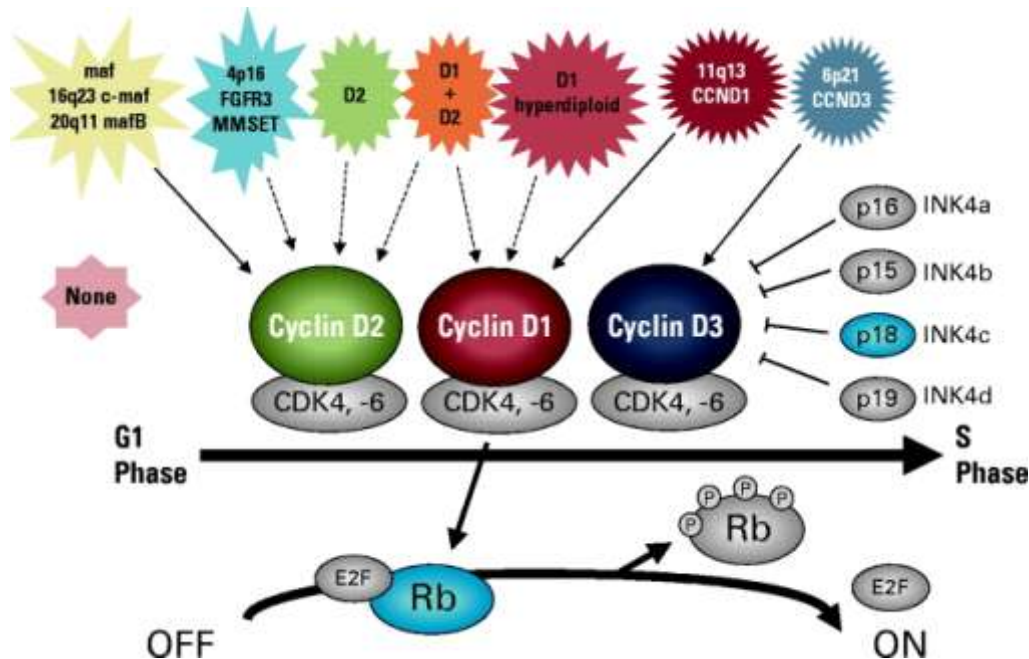


Figure 17 : Modèle de dérégulation des cyclines de type D dans le MM.

D'après Bergsagel PL et Kuehl WM, J Clin Oncol. 2005 Sep 10;23(26):6333-8.

Des anomalies touchant les inhibiteurs des Cdk ont également été observées dans le MM (Figure 17). En effet, la méthylation de p15^{INKb} est fréquente dès le stade MGUS avec la même incidence chez les MM, au contraire de la méthylation de p16^{INKa} qui semble associée à la progression vers un MM (Chim et al. 2003). Leur expression semble corrélérer avec le taux de cellules en phase S (Sarasquete et al. 2006). En ce qui concerne p18^{INKc}, sa délétion a surtout été observée dans les lignées de MM, mais ne semble pas constituer une anomalie prépondérante dans l'oncogenèse du MM puisque très peu représentée chez les patients (Kulkarni et al. 2002). Une faible expression de p27^{Kip1} a été observée chez 30% des patients sans corrélation avec une augmentation de prolifération (Filipits et al. 2003).

Enfin, certaines translocations ou anomalies retrouvées plus tardivement au cours de la maladie entraînent la dérégulation de gènes impliqués dans la prolifération comme c-Myc, K-Ras et N-Ras. Par FISH, les réarrangements du locus de c-Myc sont retrouvés chez environ 15% des patients avec un MM symptomatique et semble associés à un mauvais pronostic. Seulement un quart de ces réarrangements est dû aux translocations t(8 ;14) et t(8 ;22) qui sont dites secondaires car plus tardives au cours de la maladie (Avet-Loiseau et

al. 2001). L'étude des réarrangements du locus *c-Myc* sous-estime probablement la proportion de MM ayant une expression aberrante de cet oncogène. En effet, une étude par immunohistochimie sur 180 cas de MM démontre une incidence plus élevée de la dérégulation de l'expression de *c-Myc* (Skopelitou et al. 1993). Par ailleurs, une mutation dans la séquence IRES du gène *c-Myc* (lui permettant une transcription active en cas de stress cellulaire) est aussi observée dans le MM (Chappell et al. 2000). Quant aux mutations activatrices de K-Ras et N-Ras, elles distinguent les MGUS des MM (Liu et al. 1996) (Bezieau et al. 2001) et les formes intramedullaires des formes extramedullaires (Rasmussen et al. 2005). De plus, leur surexpression réduit la dépendance à l'IL6 d'une lignée de MM pour sa croissance et sa survie (Billadeau et al. 1995). Moins d'études concernent H-Ras. Son expression pourrait être corrélée au caractère aneuploïde des cellules de MM (Tsuchiya et al. 1988).

Le rôle des centrosomes

Les centrosomes sont essentiels dans la ségrégation correcte des chromosomes et la cytotdiérèse au cours de la mitose. Leur amplification entraîne des erreurs lors de ces processus mitotiques et conduit à la perte du caractère diploïde des cellules et donc, participe à l'augmentation de l'instabilité génétique (Pihan et al. 1998). L'amplification des centrosomes a été détectée dans de nombreux cancers, et plus récemment dans le MM et les MGUS, suggérant un rôle précoce dans la myélomagenèse (Maxwell et al. 2005) (Chng et al. 2006). De plus, une corrélation entre le niveau d'amplification des centrosomes, l'index de prolifération et la survie des patients a été mise en évidence (Chng et al. 2006). Enfin, une étude des profils d'expression génique de tumeurs myélomateuses révèle que celles qui possèdent une forte amplification de leurs centrosomes portent une signature génique caractéristique de l'instabilité chromosomique et une expression anormale des kinases Aurora-A et -B, d'ailleurs ces patients ont un mauvais pronostic (Chng et al. 2008). Depuis peu, les kinases de la famille Aurora ont attiré l'attention dans le MM ainsi que son rationnel dans le traitement du MM (Shi et al. 2007) (Evans et al. 2008).

2. Dérégulation de l'apoptose

La famille Bcl-2

Le MM se caractérise par un faible index apoptotique en relation avec la progression de la maladie (Witzig et al. 1999). L'expression des membres de la famille Bcl-2 a fait l'objet de nombreuses études et certains semblent impliqués dans la croissance et la chimiorésistance observées dans le MM. En effet, l'expression de Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 est augmentée, au contraire de celle de Bax qui est diminuée dans le MM, ces anomalies étant associées à la survie cellulaire et la chimiorésistance (Oancea et al. 2004). Ces protéines sont exprimées dans les plasmocytes primaires qu'ils soient normaux ou myélomateux ainsi que les lignées de MM (Hamilton et al. 1991), mais leur niveau d'expression est anormal dans le MM. Les souris possédant leurs cellules lymphoïdes B transgéniques pour Bcl-x_L et c-Myc développent des syndromes lymphoprolifératifs et des plasmocytoses malignes (Linden et al. 2004). Cependant, l'efficacité d'oligonucléotides antisens ciblant Mcl-1, plutôt que Bcl-2 ou Bcl-x_L, souligne le rôle essentiel de Mcl-1 dans la survie des cellules myélomateuses (Derenne et al. 2002). De plus, l'expression aberrante de Mcl-1 corrèle avec la progression de la maladie et le pronostic des patients de MM (Wuilleme-Toumi et al. 2005). D'ailleurs, son accumulation prévient l'apoptose et son élimination est requise au déclenchement de l'apoptose chimio-induite (Gomez-Bougie et al. 2005) (Menoret et al. 2006) en partie par la libération de Bim (Gomez-Bougie et al. 2004) (Gomez-Bougie et al. 2007).

La famille des IAP

Quelques études descriptives se sont intéressées à l'expression des membres de la famille des IAP dans le MM. Par immunohistochimie, une première étude a analysé l'expression de trois de ces membres, c-IAP1, c-IAP2 et XIAP, dans des cellules primaires de patients atteints de divers types de lymphomes B dont 53 cas de MM. Ainsi, c-IAP1/2 sont exprimés dans 65% et 50% des cas de MM respectivement, contrairement à XIAP qui, de façon surprenante, est rarement observé dans cette étude (Akyurek et al. 2006). Plus récemment, l'étude de leur expression par PCR quantitative en temps réel à partir de biopsies de patients réalisées avant et après leur traitement, a montré une augmentation significative des IAP (c-IAP1, c-IAP2, XIAP et survivine) après la chimiothérapie dans le

groupe des patients de mauvais pronostic (Nakagawa et al. 2006). Ces IAP sont également plus fortement exprimés dans la lignée cellulaire de MM résistante à la doxorubicine par rapport à la lignée parentale RPMI-8226 (Nakagawa et al. 2006) (Abe et al. 2007).

Néanmoins, les IAP ont rarement fait l'objet d'études fonctionnelles dans les lignées cellulaires de MM. Seule une étude a analysé le rôle de XIAP dans la résistance à la dexaméthasone. Ainsi, Chauhan et al. ont montré que la libération de Smac/DIABLO dans le cytosol était nécessaire à l'activation de la Caspase-9 en libérant cette dernière de son inhibition directe par XIAP (Chauhan et al. 2001). Depuis cette étude, la diminution de l'expression des IAP est souvent observée comme le résultat d'une sensibilité à un traitement, mais sans analyse plus poussée. En effet, la sensibilisation à la dexaméthasone par la rapamycine (inhibiteur de la voie mTOR) (Stromberg et al. 2004) (Yan et al. 2006), l'effet anti-tumoral du resveratrol (par l'inhibition de la voie NF- κ B et STAT3) (Bhardwaj et al. 2007) ou encore de la fludarabine (analogue de nucléoside) (Meng et al. 2007) s'accompagnent d'une diminution de l'expression de c-IAP1, c-IAP2, XIAP et survivine.

Réponse UPR et protéines HSP

Les plasmocytes produisent et sécrètent des milliers de molécules d'anticorps par seconde. Ils ont donc besoin d'un réticulum endoplasmique (RE) hautement développé et de protéines chaperones en grande quantité afin d'assurer la traduction et le repliement correct des Ig. Les protéines mal repliées sont reconnues par le système de contrôle du RE et y sont séquestrées. La voie de stress connue sous le nom de réponse UPR (« unfolded protein response ») est alors activée, ce qui permet d'augmenter la transcription des protéines chaperones, pour prévenir l'agrégation des protéines mal repliées qui s'accumulent au sein du RE. Dans le cas où les protéines incorrectes ne peuvent être repliées convenablement, ces protéines sont dirigées vers le protéasome 26S pour être détruites. La réponse UPR peut donc aider la cellule à surpasser un stress environnemental. Cependant, si le stress est intense ou persiste, la réponse UPR conduit éventuellement à un arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose.

Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs du protéasome, en bloquant la dégradation des protéines mal repliées, sensibilisaient les plasmocytes malins à leur réponse UPR (Lee et al. 2003) (Obeng et al. 2006). Par leur spécialisation dans la production d'anticorps, ces cellules sont naturellement plus sensibles à l'apoptose induite par un stress du RE que d'autres types cellulaires. Ceci expliquerait en partie l'efficacité

importante du bortézomib dans le traitement du MM et le rationnel grandissant de l'utilisation des inhibiteurs des protéines chaperones Hsp (« heat shock protein ») pour leur capacité à bouleverser la conformation des protéines. Récemment, il a été montré qu'un inhibiteur de la chaperone Hsp90 (le 17-AAG) induisait la mort des cellules de MM en partie via le stress du RE et l'induction de la réponse UPR, de la même façon que le bortézomib (Davenport et al. 2007). D'ailleurs, la chaperone Hsp90, surexprimée dans le MM au contraire des MGUS, pourrait être plus largement impliquée dans la pathogenèse du MM (Chatterjee et al. 2007). D'une façon générale, les protéines Hsp semblent impliquées dans l'installation d'un environnement permissive oncogénique (Nimmanapalli et al. 2003) (Mitsiades et al. 2006a).

3. L'expression du CD45

Le CD45 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine phosphatase nécessaire au développement et à l'activation lymphocytaire. Durant le processus normal de différenciation plasmocytaire, la prolifération est associée à une forte expression du CD45 et la différenciation à sa diminution (Hermiston et al. 2003). Les plasmocytes immatures expriment donc fortement le CD45 alors que les plasmocytes matures l'expriment moins. Dans le cas d'une plasmocytose réactionnelle, qui correspond à une prolifération bénigne de plasmocytes polyclonaux, l'expression du CD45 est forte puisque tous les plasmocytes sont en cycle (Jego et al. 1999).

Comme les plasmocytes normaux, les cellules myélomateuses peuvent être distinguées en deux populations selon l'expression du CD45 (Figure 18) (Bataille et al. 2003). Une petite population (environ 12% de la tumeur en moyenne) de plasmocytes plus immatures que le reste de la tumeur et exprimant fortement le CD45 (CD45⁺) correspond au compartiment le plus proliférant du MM. Une seconde population de plasmocytes peu proliférants et exprimant plus faiblement le CD45 (CD45^{faible/neg}) forme la fraction majoritaire de la tumeur. Deux différences majeures peuvent être observées entre une moelle saine et une moelle de MM. Premièrement, les proportions entre les deux populations évoquées ci-dessus sont inversées dans le MM par rapport à une moelle normale. Deuxièmement, le compartiment majoritaire de la tumeur myélomateuse peut perdre l'expression du CD45 (CD45^{neg}). Ces MM sont caractérisés par une moyenne de prolifération élevée dans chacun de ces deux compartiments et sont de mauvais pronostic (Pellat-Deceunynck and Bataille 2004). Ainsi, dans le MM, le niveau d'expression du CD45 se dissocie de la prolifération. Les cellules de MM CD45⁺ sont toujours plus proliférantes que celles qui sont CD45^{faible/neg}, mais les cellules CD45^{neg} sont anormalement plus proliférantes que celles CD45^{faible}.

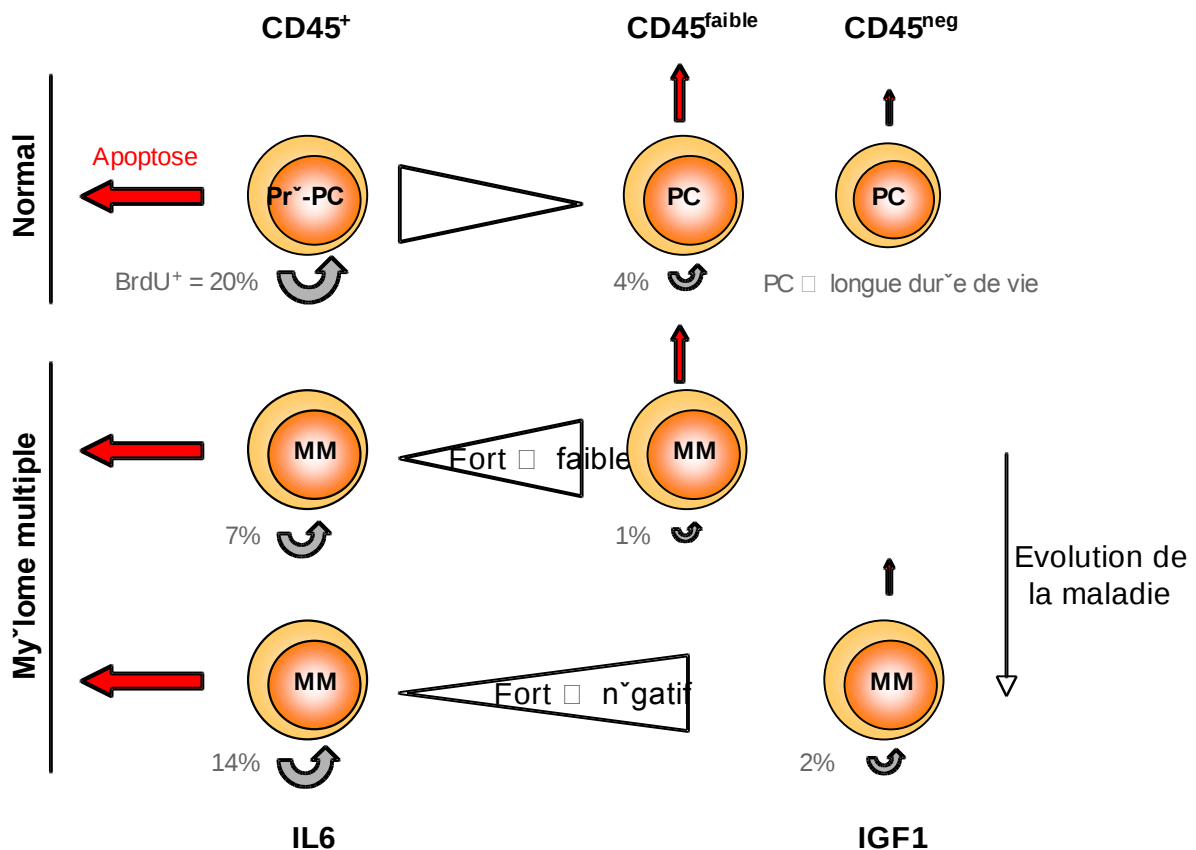


Figure 18 : Modèle cellulaire pour la croissance et la maturation du MM sur la base de l'hétérogénéité de l'expression du CD45.

Partie haute : situation normale, Pré-PC = pré-plasmocyte, PC = plasmocyte. Partie du milieu et du bas : deux types de tumeurs myélomateuses selon le niveau d'expression du CD45 (fort à faible ou fort à négatif). Apoptose (en rouge), prolifération (BrdU⁺ en gris). Le compartiment CD45⁺ est plus sensible à l'IL6, tandis que le compartiment CD45^{neg} est plus sensible à l'IGF1. D'après Pellat-Deceunynck C et Bataille R, *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Mar-Apr;32(2):293-301.

L'IL6 induit l'expression du CD45 et stimule la prolifération et la survie des cellules CD45⁺ uniquement (Mahmoud et al. 1998) (Ishikawa et al. 2000). En effet, l'IL6 est impliquée dans la relocalisation du CD45 au sein des radeaux lipidiques ce qui permet l'activation des kinases Src, nécessaire à l'induction de la prolifération cellulaire (Ishikawa et al. 2002) (Li et al. 2005b). Les cellules de MM CD45^{neg} ne semblent pas pouvoir proliférer sous l'effet de l'IL6 malgré l'activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MAPK puisqu'il leur manque l'activation de Src. Par contre, en absence de CD45, les cellules de MM peuvent répondre à l'effet de l'IGF1 (Bataille et al. 2003). Récemment, il a été montré que l'expression du CD45 détermine le type de signalisation à l'origine de la prolifération des cellules de MM. En effet, si les lignées CD45⁺ fonctionnent principalement sur un mode IL6, les lignées CD45^{neg} ont la capacité de tirer l'avantage de plusieurs facteurs de croissance

dont l'IGF1 est le plus puissant (Collette et al. 2007). Enfin, les cellules de MM CD45⁺ sont plus sensibles aux stimuli apoptotiques que les cellules CD45^{neg} (Liu et al. 2006) (Ishikawa et al. 2006).

C. Le rôle de l'environnement médullaire

Les plasmocytes malins s'accumulent dans la moelle osseuse où ils tissent un réseau complexe d'interactions avec leur environnement (Figure 19) qui est majeur dans la progression tumorale. Les cellules du microenvironnement communiquent entre-elles via des contacts cellulaires, des cytokines et des facteurs de croissance, et ainsi favorisent le recrutement des plasmocytes. En retour, les cellules myélomateuses influencent l'environnement en leur faveur afin d'optimiser leur survie et leur prolifération (Uchiyama et al. 1993). Sur un plan clinique, les lésions ostéolytiques en sont la manifestation.

Différentes études ont déterminé les mécanismes par lesquels les plasmocytes adhèrent au stroma médullaire et leur implication dans de nombreux phénomènes : établissement de la tumeur au sein de la moelle osseuse, angiogenèse et propagation de la tumeur en dehors de la moelle osseuse, installation d'une communication paracrine essentielle à la croissance, résistance de la tumeur aux traitements (Mitsiades et al. 2006b). L'adhésion des plasmocytes au stroma entraîne la sécrétion de multiples cytokines et facteurs de croissance par les deux partenaires cellulaires. Les plasmocytes malins favorisent par exemple la sécrétion d'IL6 par les ostéoblastes et perturbent le système OPG/OPGL (ostéoprotégérine et son ligand) à travers des contacts cellulaires avec le stroma (Barille et al. 1995) (Giuliani et al. 2001). Plus que la qualité, c'est la quantité des facteurs sécrétés qui semble perturbée dans le MM, mais pas exclusivement (Kuehl and Bergsagel 2002).

Ainsi, les cellules stromales médullaires peuvent sécréter de l'IL6 (interleukine 6), de l'IGF1 (« insuline growth factor 1 »), du VEGF (« vascular endothelial growth factor») et du SDF1 α (« stromal cell derived growth factor »), qui conduisent à l'activation de diverses voies de signalisation cellulaires comme NF- κ B, Ras/MAPK, JAK2/STAT3 et PI3K/Akt.

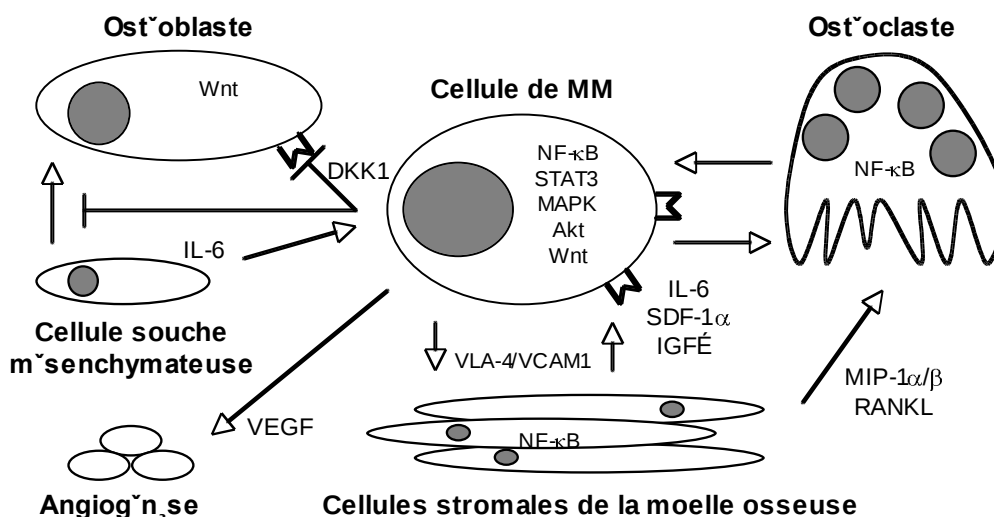


Figure 19 : Interactions entre les cellules de MM et le microenvironnement médullaire.

D'après Bommert K et al. Eur J Cancer. 2006 Jul;42(11):1574-80.

D. Le rôle des cytokines et voies de signalisation

Les voies de survie et de prolifération sont fortement dérégulées dans le MM : activation constitutive des voies JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B ou encore Wnt/ β Cat et Notch (Figure 20) (Bommert et al. 2006). Les causes ne sont pas toutes élucidées. Les délétions de PTEN sont peu fréquentes et n'expliquent pas tous les cas d'activation constitutive d'Akt (Chang et al. 2006a). Au sein de la moelle osseuse, la grande quantité de facteurs de croissance dans laquelle baigne la tumeur myélomateuse constitue un élément de réponse.

1. L'IL6

L'IL6 a d'abord été décrite comme facteur dans la différenciation des lymphocytes B normaux en cellules productrices d'anticorps. Ensuite, il a été montré que l'IL6 constituait le facteur de croissance essentiel des cellules myélomateuses. L'IL6 est sécrétée principalement par les cellules stromales de la moelle (paracrine) et dans une moindre mesure par les cellules myélomateuses elles-mêmes (autocrine) (Kawano et al. 1988) (Klein et al. 1989). La production autocrine en IL6 est associée à un phénomène malin sévère. La synthèse d'IL6 est stimulée par des contacts directs entre le microenvironnement et les plasmocytes malins et aussi par des facteurs solubles comme le TNF α , l'IL1 β , le bEGF et le VEGF.

plasmocytome murin, les souris « knock-out » IL6^{-/-} ne développent pas de tumeur plasmocytaire (Hilbert et al. 1995).

2. L'IGF1

L'IGF1 est produite par le foie et de nombreuses cellules de l'environnement comme les cellules stromales de la moelle osseuse, les ostéoblastes et les cellules endothéliales. L'IGF1 est un facteur de survie et de croissance pour les lignées de MM dépendantes ou non de l'IL6 pour leur croissance (Jelinek et al. 1997) (Ferlin et al. 2000). Comme l'IL6, l'IGF1 a un rôle protecteur des cellules contre l'apoptose induite par la dexaméthasone (Xu et al. 1997). La liaison de l'IGF1 à la chaîne α extracytoplasmique du récepteur induit l'auto-phosphorylation du domaine tyrosine kinase de la chaîne β intracytoplasmique. Cette activation entraîne la phosphorylation de différents substrats et l'activation des voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K/Akt. Il a été montré que l'activation de cette dernière voie pouvait conduire à l'induction de la voie NF- κ B (Mitsiades et al. 2002a). La voie PI3K/Akt stimulée par l'IGF1 est également impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules de MM (Tai et al. 2003) (Qiang et al. 2004). Les cellules myélomateuses peuvent exprimer le récepteur à l'IGF1 (CD221) de façon aberrante (Bataille et al. 2005) et les taux sériques en IGF1 sont un facteur de mauvais pronostic (Standal et al. 2002). Un anticorps antagoniste du récepteur à l'IGF1 entraîne un blocage du cycle cellulaire des cellules myélomateuses CD45^{neg} qui deviennent alors sensibles à des stimuli apoptotiques (Descamps et al. 2006). Cet anticorps est actuellement en essai clinique dans le MM.

3. La voie NF- κ B

Les voies NF- κ B classique et alternative

NF- κ B définit une famille de dimères de facteurs de transcription assemblés à travers la combinaison des protéines de type Rel : p50, p52, c-Rel, p65/RelA et RelB (Moynagh 2005). De tels dimères sont inactifs dans le cytoplasme, séquestrés par leurs inhibiteurs I κ B qui masquent la séquence d'adressage au noyau présente dans NF- κ B. De nombreux stimuli, souvent des signaux extracellulaires transmis par des récepteurs membranaires et une série d'adaptateurs et de protéines modulatrices, activent la voie NF- κ B liée à sa

translocation nucléaire suite à la dégradation de I κ B. Les kinases IKK assurent la phosphorylation de I κ B qui est alors conduit vers le protéasome pour être dégradé. Deux voies majeures sont liées à l'activation de NF- κ B : la voie classique encore appelée canonique, et la voie alternative dite non-canonique (Figure 21). Parfois, ces deux voies interagissent et se chevauchent car elles peuvent être stimulées par les mêmes signaux. De façon simple, la voie classique est définie par l'activation du dimère p50-p65 suivant la dégradation de I κ B, tandis que la voie alternative est caractérisée par la transformation du dimère inactif p100-RelB en dimère actif p52-RelB au moyen de la dégradation de la partie C-terminale de p100 qui contient des séquences dites « I κ B-like ». Ces deux voies peuvent être bloquées par des inhibiteurs du protéasome puisqu'ils empêchent la dégradation de I κ B et donc suspendent le signaling NF- κ B.

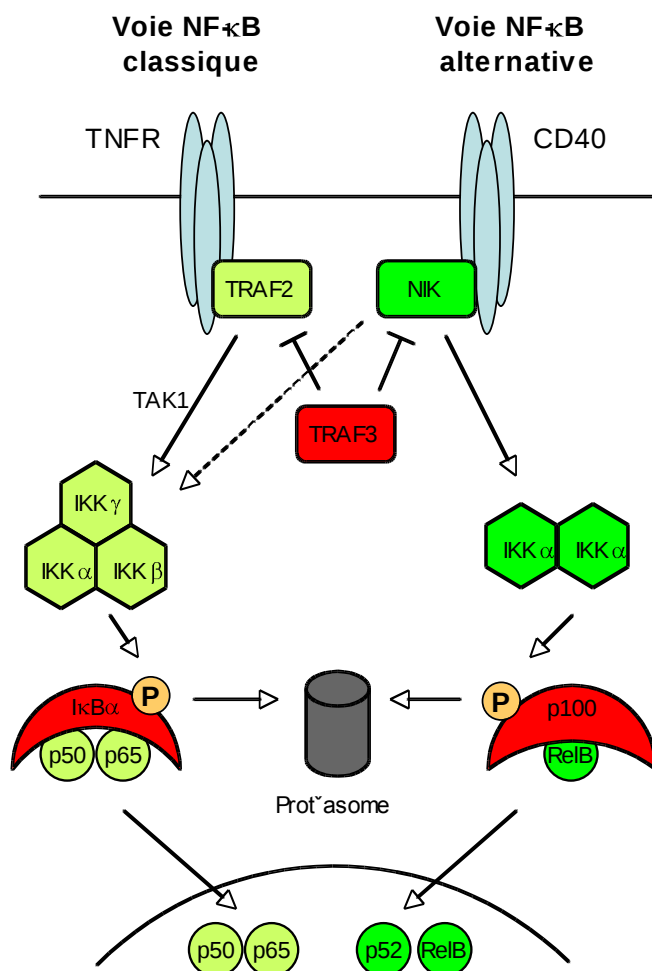


Figure 21 : Voies NF- κ B classique et alternative.

D'après Annunziata CM et al., Cancer Cell. 2007 Aug;12(2):115-30.

L'intérêt de l'extinction de la voie NF- κ B dans le traitement du MM

L'activation constitutive de la voie NF- κ B a été reportée pour la plupart des cancers (Karin et al. 2002). NF- κ B régule l'expression de protéines impliquées dans la prévention de l'apoptose (c-FLIP, familles Bcl-2 et IAP) et la promotion de la prolifération (c-Myc, IL6, BAFF, APRIL). Dans le MM, plusieurs études révèlent l'activation constitutive de cette voie dans les plasmocytes myélomateux de patients (Ni et al. 2001) (Hideshima et al. 2002) (Bharti et al. 2003). De plus, cette voie est activée de manière paracrine et autocrine par de nombreux facteurs solubles (comme le TNF α par exemple), ainsi que par les contacts avec le stroma médullaire (Chauhan et al. 1996). Des inhibiteurs de NF- κ B ont alors été testés et ont montré leur efficacité en bloquant la croissance *in vitro*, en induisant l'apoptose, en cassant le lien entre l'environnement médullaire et la tumeur, ainsi qu'en inhibant la tumorigenèse chez des modèles murins de MM (Hideshima et al. 2006) (Sanda et al. 2005) (Jourdan et al. 2007). Nous-même avons expertisé l'effet *in vitro* et *in vivo* d'un inhibiteur pharmacologique de la kinase IKK β et révélé son efficacité en association avec TRAIL dans l'induction de l'apoptose des lignées et cellules primaires de MM (voir en annexe 1 : (Romagnoli et al. 2007)). D'autres études ont souligné l'importance du blocage de la voie NF- κ B dans l'efficacité du bortezomib, un inhibiteur du protéasome qui a largement contribué à l'amélioration du traitement des patients atteints de MM (Richardson et al. 2007).

Le MM est caractérisé par sa forte chimiorésistance innée et acquise suite à certains traitements anti-tumoraux. TRAIL émerge comme un ligand apoptotique très attractif pour le traitement du MM (Gazitt 1999), notamment à travers le clivage de la protéine Mcl-1 (Menoret et al. 2006), une protéine cruciale dans la survie des cellules de MM (Gomez-Bougie et al. 2005). Cependant, des phénomènes de résistance à TRAIL ont été observés dans les cellules de MM. Une efficacité plus importante peut être obtenue par l'association de TRAIL avec le bortezomib, le SN50 (un peptide inhibiteur de la voie NF- κ B) (Mitsiades et al. 2001) ou même des antisens ciblant c-FLIP (Mitsiades et al. 2002b). La voie NF- κ B pourrait donc participer à la résistance à TRAIL. Nous-même avons expertisé cette hypothèse (voir en annexe 1 : (Romagnoli et al. 2007)).

Anomalies génétiques de la voie NF- κ B dans le MM

Jusqu'à présent, d'éventuelles anomalies génétiques touchant les acteurs de la voie NF- κ B (Courtois and Gilmore 2006) n'avaient pas été mises en cause dans l'activation constitutive de cette voie dans le MM. Récemment, une étude des profils d'expression génique a révélé la fréquence inattendue de la présence d'une signature NF- κ B chez des patients de MM dès le diagnostic (85% des cas). Dans la majorité des cas, l'impact du microenvironnement sur la tumeur serait à l'origine de l'activation de la voie NF- κ B. Cependant, dans 15 à 20% des cas, des anomalies génétiques touchant certains acteurs de cette voie ont également été mises en évidence, notamment la surexpression de NIK (translocation, délétion), la diminution de TRAF3 (mutations, délétion, régulation épigénétique) et de c-IAP1/2 (délétion) (Annunziata et al. 2007). Une seconde étude combinant les techniques de profils d'expression génique et de puces CGH (« comparative genomic hybridization ») montre une proportion similaire d'anomalies génétiques affectant un même groupe de gènes (Keats et al. 2007). Cette étude révèle également que les patients ayant des anomalies de TRAF3 répondent plus efficacement au bortézomib que ceux qui en sont dépourvus. Par contre, aucune différence d'efficacité à la dexaméthasone n'est rapportée entre ses deux cohortes de patients. Ces deux études soulignent la contribution des voies classique et alternative de NF- κ B dans le MM et spécialement dans la réponse aux traitements (Gilmore 2007).

IV. Les facteurs pronostiques

La survie médiane des patients de MM est environ de 3 ans. Néanmoins, leur survie peut varier de quelques mois à 5 voire 10 ans selon les patients. Cette hétérogénéité dans la survie des patients est de mieux en mieux appréciée par l'identification des facteurs pronostiques dont le but est de prédire la survie individuelle des patients et d'adapter la thérapeutique. Depuis les données de Carbone *et al.* en 1967 (Carbone et al. 1967), de nombreuses publications ont rapporté et identifié des anomalies impliquées dans le pronostic du MM. En plus de l'âge et de l'état général du patient au moment du diagnostic, qui sont des éléments importants, d'autres facteurs sont maintenant disponibles pour établir le pronostic : les facteurs intrinsèques au clone plasmocytaire, ceux liés à la masse tumorale et à la résorption osseuse, ainsi que les facteurs génétiques (San Miguel and Garcia-Sanz 2005).

A. Les facteurs intrinsèques au clone plasmocytaire

Différents facteurs liés à la cellule tumorale en elle-même interviennent dans l'évaluation du pronostic. Un des premier paramètre mis en évidence concerne le statut prolifératif des plasmocytes malins. En effet, qu'il soit évalué sur le pourcentage de phase S par un marquage à l'iodure de propidium (San Miguel et al. 1995) ou l'incorporation de BrdU (Greipp et al. 1988), ou sur le pourcentage de cellules en cycle par l'expression du Ki67 (Alexandrakis et al. 2004), le statut prolifératif des plasmocytes myélomateux est inversement corrélé à la survie des patients (Greipp and Kumar 2005). Cependant, il reste encore difficile à réaliser car son analyse doit être immédiate après le prélèvement, les capacités prolifératives plasmocytaires s'éteignant rapidement *ex vivo*.

Plusieurs études ont évalué l'impact de la morphologie plasmocytaire sur la survie des patients. Les résultats sont discordants, essentiellement en raison de la faible reproductibilité inter-observateurs. L'aspect immature « plasmablastique » est relié à une survie significativement plus courte. Ce paramètre est sans doute à mettre en relation avec d'autres facteurs comme la prolifération (Greipp et al. 1988).

Les variations immunophénotypiques ont également été analysées en cytométrie en flux. Des antigènes comme le CD45, le CD56, le CD221 et le CD27 ont été étudiés et semblent corrélés au pronostic (San Miguel et al. 2002) (Moreau et al. 2004) (Bataille et al. 2005) (Moreau et al. 2006) (Bataille et al. 2006). D'autres facteurs plus difficilement classables reflètent les interactions existantes entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Parmi eux, deux paramètres sont fréquemment utilisés : le taux sérique de protéine C-réactive (CRP) et l'albuminémie. L'augmentation du taux de CRP reflète l'action de l'IL6 et semble corrélée à une survie plus courte (Bataille et al. 1992), mais ce paramètre peut être perturbé lors d'infections. Le taux sérique d'albumine est aussi corrélé à la survie des patients, des taux très bas étant de mauvais pronostic (Bataille et al. 1986).

B. Facteurs liés à la masse tumorale

L'importance de la masse tumorale a été un des premiers facteurs pronostiques identifiés. En 1975, Durie et Salmon proposent une classification en 3 stades et basée sur la masse tumorale (Durie and Salmon 1975). Différents paramètres étaient pris en compte

incluant l'isotype de la chaîne lourde de l'Ig, le taux d'hémoglobine, l'étendue des lésions osseuses ou encore la calcémie. Cette classification reste encore utilisée aujourd'hui, même si son intérêt pronostique est extrêmement limité. Dans les années 1980, d'autres paramètres liés à la masse tumorale sont identifiés, au premier rang se trouve le taux de β 2-microglobuline sérique (β 2m) (Bataille et al. 1983). Ce taux est d'autant plus élevé que la masse tumorale est importante. Son élimination se faisant par voie rénale, la β 2m est augmentée en cas d'insuffisance rénale, symptôme fréquent du MM. L'insuffisance rénale étant elle-même un facteur pronostique péjoratif dans le MM, le taux de β 2m est donc un facteur pronostique primordial dans le MM qui sert d'ailleurs souvent d'élément de comparaison lors d'analyse de nouveaux facteurs pronostiques potentiels. Malgré son poids pronostique, le rôle de la β 2m dans le MM n'est pas élucidé. Néanmoins, deux études récentes utilisant un anticorps anti- β 2m rapportent un effet anti-apoptotique remarquable sur les cellules de MM *in vitro* et *in vivo* (Yang et al. 2006; Yang et al. 2007).

Plus récemment, d'autres facteurs sériques ont été décrits, reflétant principalement la masse tumorale. Le plus fréquemment cité est le taux sérique de CD138 soluble (Seidel et al. 2000). Le CD138 est exprimé sélectivement à la surface des plasmocytes dans la moelle osseuse, qu'ils soient normaux ou tumoraux, et peut être clivé par diverses protéases conduisant à sa libération sous forme soluble dans le plasma. Comme la β 2m, des taux sériques élevés corrélerent avec une survie significativement plus courte, sans apporter une plus grande significativité.

C. Facteurs liés à la résorption osseuse

Très rapidement, l'étendue des lésions osseuses est apparue comme un facteur pronostique prépondérant (Durie and Salmon 1975). Ce facteur est néanmoins difficile à analyser lors d'études multicentriques, son évaluation reposant en définition sur une analyse radiographique appréciant idéalement l'ensemble du squelette. Il serait donc plus facile de mesurer l'hypercalcémie qui reflète en partie l'activation ostéoclastique, mais d'autres paramètres influençant ce facteur, l'hypercalcémie n'occupe pas une place majeure dans la prédiction de la survie des patients de MM. D'autres paramètres reflétant la résorption osseuse ont été cherchés. Récemment, des données contradictoires ont été rapportées concernant les dosages sériques d'ostéoprotégérine (OPG) (Seidel et al. 2001). Ce facteur a pour rôle physiologique essentiel d'inhiber l'activation ostéoclastique induite par le système RANK/RANKL. Une première étude a montré un effet protecteur de taux élevés d'OPG, tant

sur les manifestations osseuses de la maladie que sur la survie des patients. Des données non publiées de l'intergroupe français du myélome (IFM) ne confirment pas ces résultats. Globalement, si les lésions ostéolytiques occupent une place majeure dans la symptomatique clinique du MM, il est difficile de les utiliser dans la prédiction de la survie.

D. Facteurs génétiques

Alors que le poids pronostique des anomalies chromosomiques est clairement démontré dans la plupart des hémopathies malignes aiguës, leur impact dans le MM est de démonstration récente. En effet, l'analyse des anomalies chromosomiques a probablement été la principale avancée de ces dernières années dans l'évaluation du pronostic des patients. Les premières données dans ce domaine émanent du groupe de Little Rock et reposent sur l'analyse de caryotypes plasmocytaires (Tricot et al. 1997). Ces analyses cytogénétiques sont de réalisation difficile dans le MM pour diverses raisons : faible index de prolifération, faible infiltrat plasmocytaire des prélèvements ou encore complexité des anomalies chromosomiques. Ainsi, seulement moins de 30% des caryotypes sont détectés comme anormaux au diagnostic. Indépendamment de toute anomalie chromosomique spécifique, le simple fait d'obtenir un caryotype anormal est péjoratif pour la survie des patients, rejoignant probablement la valeur pronostique de la prolifération. Grâce aux techniques actuelles comme la technique de FISH sur plasmocytes en interphase, on sait maintenant que ce chiffre sous-estimait nettement le nombre de cas présentant des anomalies chromosomiques puisqu'en fait, il est virtuellement de 100%. Ainsi, cette technique est de plus en plus utilisée dans les laboratoires, devenant une technique de référence. Au préalable, les plasmocytes sont immuno-marqués et/ou triés à partir de l'infiltrat médullaire.

Par la technique de FISH, il semble que les translocations t(4 ;14), t(14 ;16), t(14 ;20), ainsi que la délétion du chromosome 17p soient les anomalies chromosomiques les plus prédictives d'une survie courte (Avet-Loiseau et al. 2007). En fait, la délétion du chromosome 13, longtemps incluse dans les facteurs les plus prédictifs, semble ne valoir son pouvoir pronostique que de son association préférentielle avec les translocations t(4 ;14), t(14 ;16), et la délétion du 17p. En effet, les patients ayant uniquement une délétion du chromosome 13 sans ces 3 autres événements, n'ont pas de mauvais pronostic. Par ailleurs, le gain de chromosome 1q conduisant à la surexpression du gène *CKS1B* corrèle également avec une survie écourtée (Shaughnessy et al. 2007). Au contraire, les MM ayant une translocation t(11 ;14) ou présentant une hyperdiploïdie sont maintenant considérés de pronostic neutre

ou favorable, respectivement (Decaux et al. 2007). Cependant, les MM hyperdiploïdes peuvent encore être stratifiés de manière à affiner leurs pronostics (Chng et al. 2007). Une étude récente révèle que le nombre d'anomalies caryotypiques avant et après le traitement influence de façon importante la réponse du patient à la thérapeutique et une éventuelle rechute (Arzoumanian et al. 2008).

V. Les traitements

Le traitement du MM a connu ces dernières années de grands progrès, notamment grâce à l'évolution des connaissances sur la biologie du MM et ses facteurs pronostiques, ainsi que la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le traitement du MM a longtemps reposé sur le classique MP (melphalan-prednisone) (Facon 1999). Ce traitement conduit à des réponses partielles chez la plupart des patients, mais ne permet pas l'éradication du clone tumoral. La maladie réapparaît inéluctablement, avec une médiane de survie de l'ordre de 30 à 36 mois et des rémissions complètes de moins de 5%. Jusqu'à la fin des années 1990, il n'y eut aucun progrès significatif avant l'avènement de l'intensification thérapeutique correspondant au VAD (vincristine-adriamycine-dexaméthasone), suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Attal et al. 1996). Ceci permet d'améliorer significativement le taux de rémission complète à 25% et la médiane de survie supérieure à 50 mois. Cependant, ces progrès concernent presque exclusivement les patients jeunes (moins de 60 ans). Depuis 1998, le paysage thérapeutique s'est enrichi de plusieurs nouveaux principes actifs participant au net allongement de l'espérance de vie des patients. Ces molécules sont la thalidomide, le lénalidomide et le bortézomib.

La thalidomide a été développée dans les années 1950 pour ses propriétés sédatives et retirée du marché en 1962 après la constatation de ses effets tératogènes. Cependant, la mise en évidence de son activité anti-angiogénique constitua le rationnel de son utilisation dans le traitement du MM. Ces activités sont multiples : effet direct sur la cellule myélomateuse, inhibition des interactions entre stroma médullaire et cellule myélomateuse, diminution de la sécrétion de différents facteurs solubles (VEGF, IL6, $TNF\alpha$, $IL1\beta$) ou encore stimulation de l'immunité cellulaire résiduelle (Hideshima et al. 2001a). La thalidomide donne des résultats positifs dans 30 à 60% des MM en rechute ou en progression (Barlogie et al.

2001). Néanmoins, son utilisation doit être de courte durée du fait de ses effets secondaires (notamment les neuropathies).

Le lénalidomide est un analogue structural de la thalidomide de troisième génération avec un profil d'action similaire, actuellement développé dans le traitement du MM et des syndromes myélodysplasiques. Par contre, le profil de toxicité de la lénalidomide est lui bien différent de celui de la thalidomide. Il n'est pas tératogène chez l'animal et ne provoque pas de forte toxicité neurologique. Les essais cliniques de phase III chez les patients en rechute montrent une nette efficacité en association avec la dexaméthasone (Hulin 2007). Comme le bortézomib, son utilisation en première ligne de traitement est en cours d'étude.

Le bortézomib, premier représentant d'une nouvelle classe thérapeutique, celle des inhibiteurs du protéasome, réduit la prolifération ainsi que la survie des cellules malignes en bloquant leur progression dans le cycle et en régulant négativement l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose. Il entraîne également un blocage des capacités d'adhésion des cellules myélomateuses, une diminution des possibilités de réparation de l'ADN accompagnée d'une éventuelle restauration de la sensibilité aux agents endommageant l'ADN, ainsi que des effets anti-angiogéniques et favorables pour la biologie osseuse (Hideshima et al. 2001a). Son efficacité impressionnante dans le MM lui a valu en 2003 une autorisation accélérée par la FDA (« food and drug administration) dans le traitement de patients atteints de MM dès leur première rechute. De nombreuses études ont ensuite montré le bénéfice de l'association du bortézomib avec des traitements plus conventionnels du MM (San Miguel et al. 2006). Enfin, le bortézomib donne des résultats intéressants pour le traitement des patients au delà de 60 ans (Mateos et al. 2006). Son utilisation en première ligne de traitement est en cours d'étude.

Évidemment, bien d'autres molécules et stratégies thérapeutiques sont à l'étude dans le traitement du MM. Des progrès sont encore nécessaires pour prolonger la survie des patients et leur guérison, mais également pour améliorer leur qualité de vie. Afin d'éviter les résistances et diminuer les toxicités, des associations pertinentes entre des agents de chimiothérapie et/ou des nouvelles molécules semblent incontournables.

LA PROTEINE SURVIVINE

I. Introduction

Découverte il y a 10 ans (Ambrosini et al. 1997), la survivine a rapidement attiré l'attention de la communauté scientifique par sa biologie fascinante et son potentiel thérapeutique notamment en cancérologie. Conservée au cours de l'évolution, la survivine appartient à la famille des IAP (« inhibitors of apoptosis proteins »), définie par le domaine structurel BIR (« baculovirus IAP repeat ») caractérisé à l'origine chez le baculovirus pour son rôle dans la protection vis-à-vis de l'apoptose (Miller 1999). Initialement décrite comme acteur de la survie des cellules cancéreuses, ce qui lui valut son nom, la survivine se place en fait au carrefour de la régulation de processus cellulaires essentiels: cycle et mort cellulaires. Si ses mécanismes moléculaires participant au cycle cellulaire sont maintenant mieux appréhendés, ceux impliqués dans la résistance à l'apoptose sont encore en cours d'exploration. La majorité des tumeurs, solides ou hématopoïétiques, l'exprime de façon aberrante et des études génomiques l'identifient comme le 4^e gène spécifique de tumeur (Velculescu et al. 1999). La survivine possède également un rôle physiologique majeur lors du développement embryonnaire et fœtal, les souris « knock-out » pour cette protéine ne survivant pas au delà du 5^e jour embryonnaire (Uren et al. 2000). En revanche, la survivine n'est pas ou peu exprimée dans les tissus différenciés adultes. Les causes et les conséquences de l'expression aberrante de la survivine dans les cellules tumorales font l'objet d'une multitude d'études. D'ailleurs, l'intérêt pronostique de la survivine semble validé pour plusieurs cancers et son utilisation en tant que cible thérapeutique est actuellement en cours d'évaluation clinique.

Par conséquent, les multiples fonctions de la survivine la projettent au coeur d'un réseau fonctionnel pro-tumoral et la désignent comme cible thérapeutique particulièrement pertinente dans le cancer (Altieri 2008) (voir en Annexe 2 : Romagnoli et al., Médecine Sciences, sous presse). La survivine est maintenant évoquée comme un antigène de tumeur au caractère universel et pourrait constituer un candidat de choix en immunothérapie (Andersen et al. 2007).

II. Découverte et expression tissulaire

Le gène *survivine* est localisé sur le bras long du chromosome 17 en q25 chez l'Homme. La survivine fut découverte lors du criblage d'une banque génomique humaine avec une sonde correspondant à l'ADNc du gène *EPR-1* (« effector cell protease receptor-1 ») (Ambrosini et al. 1997). En fait, les ORF (« open reading frame » ou cadre ouvert de lecture) des gènes *survivine* et *EPR-1* sont en orientation inverse et leurs séquences codantes sont complémentaires, ce qui est unique pour des gènes humains. Le rôle de la relation entre les gènes *survivine* et *EPR-1* n'est pas encore élucidé. Il a été proposé que ces deux gènes puissent se réguler entre eux en tant qu'antisens naturels l'un de l'autre (Ambrosini et al. 1998), mais peu d'études ont été menées à ce sujet.

La survivine présente une expression tissulaire particulière (Ambrosini et al. 1997). En effet, elle est abondamment exprimée au cours du développement embryonnaire et fœtal, puis exclue des tissus quiescents et différenciés chez l'adulte à l'exception de certains types cellulaires conservant un potentiel de renouvellement cellulaire (thymocytes, cellules CD34⁺, cellules basales du colon...). Dans les cellules proliférantes, l'expression de la survivine est finement régulée de façon dépendante du cycle cellulaire : indétectable au cours de la phase G1, très faible pendant la phase S et montrant un pic d'expression en G2/M (Li et al. 1998). Au contraire, la survivine est exprimée de façon aberrante dans tous les cancers testés à ce jour. L'analyse du transcriptome humain l'a d'ailleurs identifié comme le 4^e gène spécifique de tumeur (Velculescu et al. 1999).

III. Structure protéique

La survivine est une petite protéine de 16,5 kDa (142 acides aminés) qui est composée de trois domaines principaux : un seul domaine BIR en N-terminal (résidus 18-88), une extrémité C-terminale en hélice α (résidus 100-142) et entre les deux, une séquence NES (« nuclear export sequence ») d'exportation hors du noyau, séquence identifiée récemment (Colnaghi et al. 2006) (Figure 22). Comme la moitié des protéines IAP, la survivine ne possède qu'un seul domaine BIR. En revanche, elle ne porte aucun domaine fréquemment retrouvé chez cette famille, comme les domaines RING ou CARD impliqués dans la dégradation protéosomale et les interactions protéiques, respectivement. Comme les

autres IAP, la survivine ne contient pas de séquence d'insertion membranaire (Ambrosini et al. 1997).

L'analyse par cristallographie de la structure de la survivine murine (Muchmore et al. 2000) et humaine (Verdecia et al. 2000) (Chantalat et al. 2000) est publiée en 2000. Ces études indiquent que son unique domaine BIR ressemble à celui qui est impliqué dans l'inhibition directe de la Caspase-3 par XIAP, c'est-à-dire son domaine BIR2 (Sun et al. 1999). Néanmoins, la survivine ne porte pas les quelques acides aminés précédant le domaine BIR qui semblent essentiels à XIAP pour cette inhibition directe. Par ailleurs, ces études révèlent un arrangement dimérique en forme de « nœud papillon » de la survivine en solution au moyen de la surface acide du domaine BIR de chacun des monomères. La chélation d'un atome de Zn au sein du BIR est essentielle dans ces interactions. Un site de phosphorylation par Cdk1-CyclineB1 en thréonine 34 dans ce domaine semble moduler la capacité de celui-ci à interagir avec d'autres protéines. La structure et la charge ionique de son extrémité C-terminale en hélice α évoquent une longue bobine enroulée formant également un domaine d'interaction protéique, mais celui-ci n'est pas impliqué dans la formation du dimère de survivine en solution. En revanche, son hélice α est requise pour sa localisation aux microtubules. En effet, une étude fonctionnelle antérieure avait montré que, dépourvue de son hélice α , la survivine perdait sa localisation au niveau des microtubules de l'appareil mitotique de la cellule (Li et al. 1998). Avec son hélice α et son domaine BIR, la survivine pourrait servir de protéine adaptatrice.

IV. Régulation de l'expression

A. Régulation transcriptionnelle

1. Le promoteur du gène *survivine*

Régulation dépendante du cycle cellulaire

L'étude du promoteur du gène *survivine* a fourni de nombreuses informations sur la régulation de ce gène, notamment sur son expression restreinte aux cellules en cycle (Figure 22). Tout d'abord, son promoteur comporte de multiples sites Sp1 (« specificity protein-1 ») dont deux semblent essentiels pour sa transcription basale, trois régions CDE (« cell cycle-dependent element ») et une région CHR (« cell cycle homology region ») (Li and Altieri 1999). La présence de ces régions évoque fortement un gène actif durant la mitose. D'ailleurs, l'expression de la survivine est sous la dépendance du cycle cellulaire qui peut être abolie par la mutation de ses régions CDE (Li et al. 1998). Les voies p53 et Rb/E2F contribuent également à la régulation transcriptionnelle de la survivine de façon dépendante du cycle. La protéine p53 peut se fixer sur le promoteur du gène *survivine* et bloquer sa transcription (Hoffman et al. 2002). Son effet peut également être indirect via l'induction de p21 qui pourrait inhiber certaines Cdk et donc empêcher la phosphorylation de Rb (Lohr et al. 2003). En effet, la protéine Rb hypophosphorylée bloque la transcription du gène *survivine* dans des fibroblastes murins en se fixant sur le promoteur avec ses co-répresseurs E2F5 et E2F6 et en séquestrant les activateurs E2F1, E2F2, E2F3 (Jiang et al. 2004). Cependant, E2F2 semble plutôt jouer un rôle de répresseur de l'expression de la survivine dans des mélanocytes humains (Raj et al. 2008).

Enfin, le promoteur du gène *survivine* ne présente pas de domaine TATA, mais une région riche en CG typique des îlots CpG, cible d'une régulation par méthylation (Li and Altieri 1999). Son statut de méthylation a été mis en cause pour expliquer son « silence transcriptionnel » dans les cellules différenciées adultes puis sa réactivation dans certains cancers (Hattori et al. 2001), bien que cela ne soit pas le cas pour tous les types cellulaires (Li and Altieri 1999) (Wagner et al. 2008).

Etapes de la régulation de la survivine

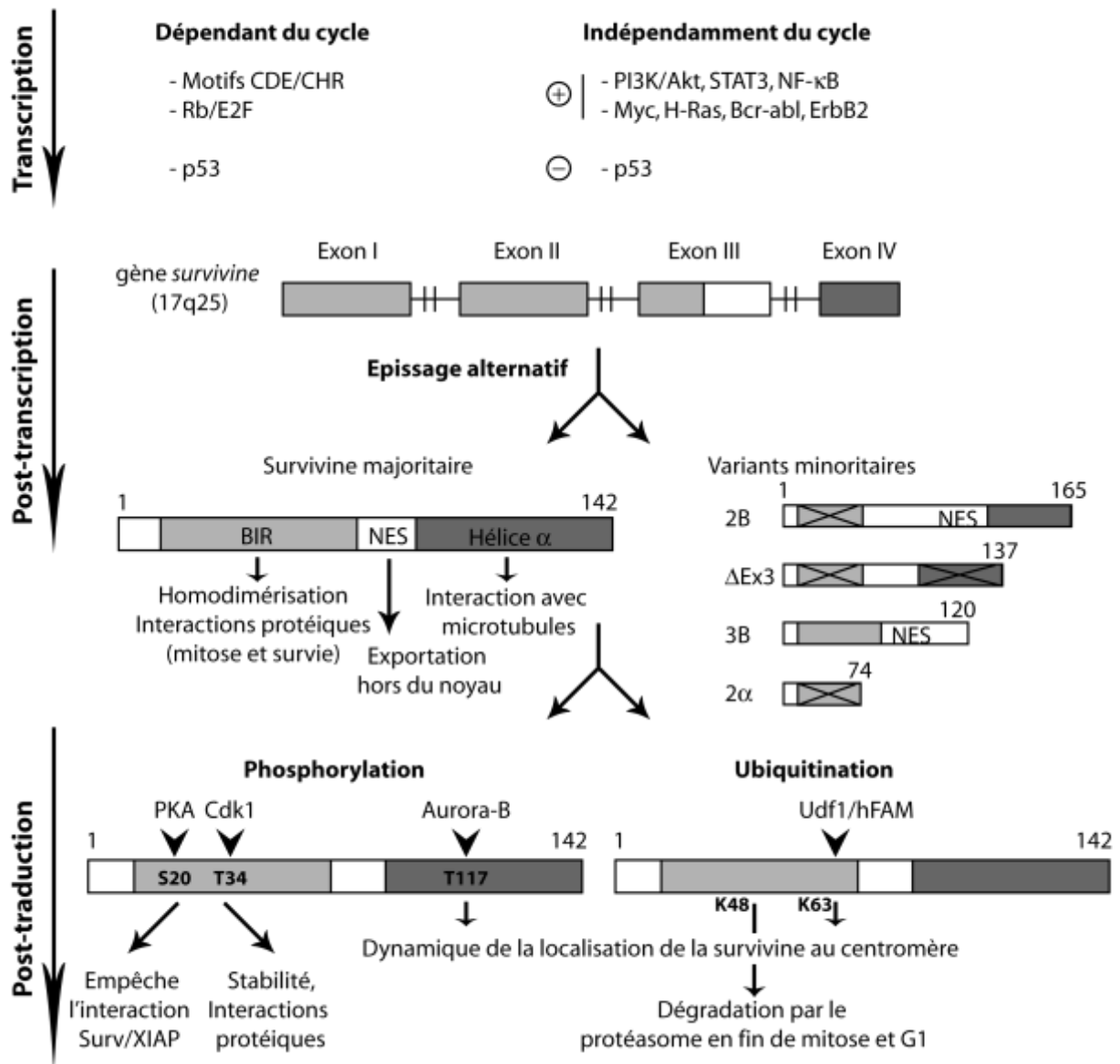


Figure 22 : Différents niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la survivine.

D'après Romagnoli et al., *Revue Médecine Sciences*, sous presse.

Régulation indépendante du cycle cellulaire

Son expression anormale dans les cancers a motivé un grand nombre de travaux afin d'en identifier les causes. Une des principales certitudes est que la survivine est exprimée de manière aberrante indépendamment du cycle cellulaire dans les cellules tumorales. Ceci a été démontré par l'utilisation de souris transgéniques « knock-in » qui expriment le gène de la GFP (« green fluorescent protein ») sous le contrôle du promoteur proximal *survivine* permettant son expression uniquement dans les cellules en mitose (Xia and Altieri 2006).

Dans cette expérience, on peut donc faire la différence entre les cellules qui expriment la survivine endogène sous la dépendance du cycle cellulaire (cellule GFP⁺/survivine⁺), et celles qui l'expriment indépendamment de celui-ci (cellule GFP⁻/survivine⁺). Au cours du développement embryonnaire, la survivine est fortement exprimée sans la détection de la GFP, puis dans les tissus murins adultes, la survivine comme la GFP semblent indétectables à l'exception du cerveau. Lorsque ces souris développent un adénome intestinal, la tumeur exprime uniformément la survivine tandis que seules des cellules isolées expriment la GFP. L'expression de la survivine est donc majoritairement indépendante du cycle cellulaire au cours de l'embryogenèse et de la carcinogenèse. Cette étude et bien d'autres soulignent l'augmentation aberrante (jusqu'à 400 fois) de la transcription du gène *survivine* dans les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Bao et al. 2002) (Yang et al. 2004) (Xia and Altieri 2006). Dans les tumeurs, la perte de fonctionnalité des protéines p53 et Rb a été mise en cause dans l'augmentation de la transcription du gène *survivine* (Hoffman et al. 2002) (Mirza et al. 2002) (Jiang et al. 2004) (Xia and Altieri 2006) (Vegran et al. 2007). D'ailleurs, les techniques de ChIP (« chromatine immunoprecipitation ») et de mutagenèse dirigée ont révélé que les sites de liaison pour p53 et E2F1 dans le promoteur *survivine* se chevauchaient, ainsi p53 pourrait prévenir l'expression de la survivine en empêchant la fixation de E2F1 (Hoffman et al. 2002). La situation se complique par une boucle de régulation entre la survivine et p53. En effet, la survivine peut réprimer la transcription de p53 (indirectement car la survivine n'est pas un facteur de transcription) et accélérer sa dégradation par le protéasome (Wang et al. 2004).

Dans les cancers, l'activation de nombreuses voies de signalisation et l'expression anormale de certains oncogènes ont été impliquées dans la dérégulation de l'expression de la survivine (Figure 22). En effet, sa transcription peut être induite directement par différents facteurs : STAT3 (Gritsko et al. 2006), HIF-1 α (Peng et al. 2006b), c-Myc (Cosgrave et al. 2006), E2F1 (Dasgupta et al. 2006), DEC1 (Li et al. 2006), KLF5 (Zhu et al. 2006), sous l'effet de l'activation des voies de signalisation : JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B. De plus, les oncogènes Bcr/Abl (Wang et al. 2005), H-Ras (Sommer et al. 2007), K-Ras (Sarthy et al. 2007) et ErbB2 (Xia et al. 2006a) ont été impliqués dans la chimiorésistance en partie via la dérégulation de l'expression de la survivine.

Par conséquent, d'un côté l'expression de la survivine est induite par de nombreuses voies de signalisation et oncogènes fréquemment dérégulés dans les cancers et d'un autre côté, son expression n'est plus réprimée par des suppresseurs de tumeur souvent non fonctionnels dans ces mêmes cellules. Des anomalies génétiques (amplification (Islam et al.

2000) et mutation (Xu et al.)) et épigénétiques (hypométhylation (Hattori et al. 2001)) du gène *survivine* peuvent également participer à sa surexpression dans les cancers.

2. Les variants d'épissage de la survivine

Le gène *survivine* est composé de 4 exons et de 3 introns (Ambrosini et al. 1997). En plus de la survivine originellement décrite (survivine majoritaire), quatre variants (2B, Δ Ex3, 3B et 2α) de la survivine sont obtenus par épissage alternatif : survivine-2B (165 acides aminés), survivine- Δ Ex3 (137 acides aminés), survivine-3B (120 acides aminés) et survivine- 2α (74 acides aminés) (Figure 22). Cependant, ces variants sont exprimés à des niveaux nettement inférieurs à ceux de la survivine majoritaire.

La survivine-2B montre l'insertion d'un exon cryptique (exon 2B) entre ses exons 2 et 3. Cette insertion entraîne la perturbation du domaine BIR qui n'est alors plus fonctionnel. La survivine-2B conserve sa séquence NES et son extrémité C-terminale en hélice α , elle est donc principalement localisée dans le cytoplasme et semble pouvoir se fixer aux microtubules. Ainsi, en ayant la même localisation que la survivine majoritaire sans ses fonctions, la survivine-2B pourrait constituer un dominant négatif naturel de la survivine (Mahotka et al. 2002) (Li 2005). Récemment, ce variant a été montré comme ayant des propriétés pro-apoptotique et anti-mitotique (Ling et al. 2007).

La survivine- Δ Ex3 perd son exon 3 au cours de l'épissage alternatif, ce qui entraîne la perturbation du domaine BIR qui n'est alors plus fonctionnel et le décalage de l'ORF qui altère la séquence NES et l'hélice α . La survivine- Δ Ex3 est donc localisée dans le noyau. Les propriétés anti-apoptotiques de ce variant (Mahotka et al. 2002) (Li 2005) sont actuellement controversées (Knauer et al. 2007a).

La survivine-3B montre l'insertion d'un nouvel exon (exon 3B) entre ses exons 3 et 4, qui introduit un codon stop et entraîne la traduction d'une protéine tronquée dépourvue de son extrémité C-terminale en hélice α . Cependant, la survivine-3B conserve son domaine BIR et sa séquence NES, tous deux fonctionnels. La survivine-3B est donc principalement localisée dans le cytoplasme et conserve les mêmes fonctionnalités que la survivine majoritaire par son domaine BIR (Knauer et al. 2007a).

La survivine- 2α possède les deux premiers exons ainsi qu'une partie de l'intron 2 qui introduit un codon stop et entraîne la traduction d'une protéine tronquée. La survivine- 2α , localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, ne possède ni domaine BIR fonctionnel, ni séquence NES et extrémité C-terminale en hélice α . Pourtant, une étude a montré son

interaction avec la survivine majoritaire entraînant ainsi la diminution de l'activité de cette dernière (Caldas et al. 2005).

La plupart des données concernant la localisation et la fonction des variants de la survivine proviennent d'analyses de l'expression ectopique à des niveaux non physiologiques de leur version portant un « tag ». De plus, les anticorps utilisés pour détecter les variants sont souvent à l'origine de réactions croisées avec la survivine majoritaire. Une étude fonctionnelle comparative récente a elle aussi utilisé l'expression ectopique de ces variants, mais en prenant soin de ne sélectionner que les clones les exprimant à des niveaux physiologiques (Knauer et al. 2007a). Cette étude montre que seul le variant 3B possède des propriétés biologiques, à la fois mitotique et anti-apoptotique, proches de celles de la survivine. Ceci est expliqué par le fait que seul la survivine-3B conserve à la fois une localisation (NES fonctionnel) et une fonction (BIR fonctionnel) similaires à la survivine majoritaire.

B. Régulations post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles de la survivine ont des répercussions diverses sur sa fonction cellulaire : stabilité de la survivine, modulation de sa capacité d'interaction protéique, et modification de sa localisation (Figure 22). L'impact fonctionnel de ses modifications sera évoqué plus en détail dans un prochain chapitre.

1. Phosphorylation

La survivine est phosphorylée sur son résidu thréonine 34 (T34) dans son domaine BIR par Cdk1 (« cyclin dependent kinase 1 »), avec laquelle elle est co-immunoprécipitée (O'Connor et al. 2000a). Le complexe survivine-Cdk1-CyclineB1 est localisé au niveau des microtubules. L'activité Cdk1 et la phosphorylation du résidu T34 sont restreintes aux phases G2/M, permettant ainsi la stabilité de la survivine uniquement pendant la mitose. Par cristallographie, ce résidu avait déjà été évoqué comme affectant probablement les interactions protéiques assurées par le domaine BIR (Verdecia et al. 2000). D'ailleurs, l'introduction d'un mutant survivine T34A (non phosphorylable en T34) induit l'apoptose des cellules tumorales (O'Connor et al. 2000a).

La survivine peut également être phosphorylée pendant la mitose sur son résidu thréonine 117 (T117), cette fois-ci au sein de son extrémité C-terminale, par la kinase Aurora-B (Wheatley et al. 2004). Cette phosphorylation affecte la dynamique de la localisation de la survivine au niveau des centromères des chromosomes (Wheatley et al. 2007) (Delacour-Larose et al. 2007). En effet, l'utilisation de mutants survivine T117A (non phosphorylable en T117) et survivine T117E (mimant la phosphorylation en T117) a permis de montrer que cette phosphorylation est indispensable au décrochage de la survivine du centromère en métaphase.

Enfin, plus récemment, un troisième site de phosphorylation a été identifié dans le domaine BIR de la survivine. Son résidu sérine en position 20 (S20) est phosphorylé par la PKA (« cyclic AMP-dependent protein kinase A ») dans le cytosol ce qui module sa capacité d'interaction protéique à travers son domaine BIR. En effet, la survivine phosphorylée en S20 n'est pas capable de former un complexe avec XIAP, un autre membre de la famille des IAP (Dohi et al. 2007).

2. Ubiquitination

Bien que l'ubiquitination soit un événement post-traductionnel important dans la régulation de la $\frac{1}{2}$ vie des protéines en les ciblant pour leur dégradation par le protéasome, ce n'est pas son unique rôle. Certains types d'ubiquitination peuvent aussi intervenir dans la modulation de l'activité des protéines. Généralement, les mono-ubiquitinations et les multi mono-ubiquitinations (une ubiquitine sur plusieurs résidus lysines dans la même protéine) n'induisent pas la dégradation de la protéine. Comme l'ubiquitine possède plusieurs résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63), les chaînes de poly-ubiquitines peuvent être assemblées par un de ces résidus. Ainsi, les poly-ubiquitinations (chaîne de plus de 4 résidus ubiquitines) assemblées à travers des liaisons K48 sur la protéine sont de puissants signaux de recrutement par le protéasome. Au contraire, les poly-ubiquitinations assemblées à travers des liaisons K63 sont impliquées dans une variété de processus comme l'endocytose ou la réparation de l'ADN par exemple (Aguilar and Wendland 2003).

Des cellules exprimant la survivine de façon exogène sous le contrôle d'un promoteur constitutivement actif (donc aucune influence transcriptionnelle), et traitées avec des inhibiteurs de protéasome, montrent une accumulation de la survivine. La survivine possède une $\frac{1}{2}$ vie courte (30 minutes) et le protéasome intervient dans sa dégradation protéique en phase G1 du cycle cellulaire. La survivine semble poly-ubiquitinylée sur plusieurs de ses

résidus lysines (elle en possède 16) à travers des liaisons K48 (Zhao et al. 2000). Par son domaine BIR, la survivine peut interagir avec Hsp90 qui la protège de sa dégradation par le protéasome (Fortugno et al. 2003). Au contraire, l'interaction de la survivine avec Smac/DIABLO favorise son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (McNeish et al. 2005).

La poly-ubiquitination de la survivine à travers des liaisons K63 des protéines d'ubiquitine a également été observée et impliquée dans les processus d'alignement des chromosomes et de leur ségrégation au cours de la mitose (Vong et al. 2005). En effet, la poly-ubiquitination de type K63 de la survivine par Ufd1 est nécessaire pour son association aux centromères tandis que sa dé-ubiquitination par hFAM est requise pour sa dissociation de ces structures. Ce type d'ubiquitination n'affecte pas le rôle de la survivine dans le processus de cytodierèse. Enfin, au contraire de son ubiquitination de type K48, la stabilité de la survivine n'est pas modifiée par son ubiquitination de type K63 qui touche plutôt sa capacité d'interaction et de localisation pendant la mitose.

VI. Fonctions cellulaires

A. Une double fonction

La première analyse fonctionnelle de la survivine correspond à sa transfection dans BaF3, une lignée pré-B dépendante de l'IL3 pour sa croissance *in vitro*. La survivine prolonge significativement la croissance et la viabilité des transfectants stables BaF3 privés en IL3, bien que moins efficace que Bcl-2 (Ambrosini et al. 1997). Depuis de nombreuses études ont expertisé les fonctions de la survivine. Les études fonctionnelles ciblant la survivine par des antisens ou des mutants dominants négatifs aboutissent à un double phénotype. En plus de l'apoptose, les cellules montrent une progression mitotique aberrante avec des centrosomes surnuméraires, un fuseau mitotique multipolaire, un défaut de cytodierèse et une multinucléation (Li et al. 1999). D'ailleurs, des expériences similaires ciblant les homologues de la survivine chez les levures (Uren et al. 1999) ou *C.elegans* (Fraser et al. 1999) montrent également un défaut mitotique. Enfin, le phénotype des souris « knock-out » pour la survivine révèle un défaut catastrophique de l'assemblage des

microtubules au cours de la mitose (Uren et al. 2000). La fonction de la survivine dans la division cellulaire est donc essentielle et conservée au cours de l'évolution.

La question suivante s'est rapidement posée : le rôle de la survivine est-il uniquement limitée à la division cellulaire ou est-il également impliqué dans l'inhibition de l'apoptose ? Des résultats de centaines de publications utilisant différentes approches expérimentales montrent que l'expression de la survivine protège les cellules normales et transformées de l'apoptose (Altieri 2006b). En effet, en plus des défauts mitotiques, les antagonistes moléculaires de la survivine (antisens, ribozymes, petits ARN interférents...) induisent la mort cellulaire *in vitro*, favorise l'effet des stimuli apoptotiques et l'activité anti-tumorale de certains traitements *in vivo* (Wheatley and McNeish 2005). Au contraire, l'expression transgénique de la survivine est associée à inhibition de l'apoptose *in vivo* (Conway et al. 2002). Enfin, l'homologue de la survivine chez la drosophile, la détérine, fonctionne de façon interchangeable avec la survivine dans le blocage de l'apoptose au sein de cellules de mammifères et d'insectes (Jones et al. 2000) (Jiang et al. 2001). L'élucidation de la relation étroite qui existe entre la structure, les localisations et les fonctions de la survivine ont permis de réaliser de grands progrès dans la compréhension du rôle complexe et multiple de cette protéine.

B. Cycle cellulaire

1. Membre du complexe CPC

Par immunofluorescence et des expériences d'expression exogène de la survivine fusionnée à une molécule fluorescente, la localisation particulière de la survivine au cours de la mitose l'identifie comme une protéine CPP (« chromosomal passenger protein ») (Uren et al. 2000) (Fortugno et al. 2002) (Temme et al. 2003). En effet, la survivine est localisée au niveau des chromosomes en prophase, des centromères en métaphase, des cortex et fuseau équatoriaux en anaphase et du sillon de clivage en télophase. De plus, chez le xénope (Bolton et al. 2002) puis dans les cellules de mammifères (Chen et al. 2003), des expériences révèlent que la survivine est physiquement associée à INCENP et Aurora-B. En fait, INCENP (« inner centromere protein »), survivine et boréaline sont les trois protéines régulatrices de l'activité et de la localisation du composant enzymatique du complexe CPC : la protéine kinase Aurora-B. Le CPC intervient à la fois sur le cytosquelette et sur les chromosomes durant la mitose en régulant la structure des chromosomes et du fuseau

mitotique et en assurant la ségrégation correcte des chromatides sœurs et l'achèvement de la cytodierèse (Sampath et al. 2004). Lors du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique en métaphase, le CPC contrôle la tension de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique (Ruchaud et al. 2007a).

La dynamique de ce complexe multi-protéique est absolument primordiale dans le déroulement correct de la mitose. Le domaine BIR de la survivine et son extrémité C-terminale sont plus précisément impliqués dans la localisation du CPC au niveau des kinétochores à travers ses cycles d'ubiquitination et de dé-ubiquitination par hFAM (Vong et al. 2005) et sa phosphorylation (T117) par Aurora-B (Wheatley et al. 2007) (Delacour-Larose et al. 2007) (Figures 22 et 23). L'extrémité C-terminale de la survivine est indispensable à la localisation du CPC au niveau des microtubules pendant la mitose (Lens et al. 2006). Cependant, INCENP et boréaline interviennent eux aussi dans la localisation du CPC puisque l'extinction par ARN interférence d'un des membres du CPC (Honda et al. 2003) ou l'utilisation de mutants de chacun des membres (Jeyaprakash et al. 2007) entraîne la délocalisation des autres membres et l'arrêt en mitose. La récente résolution cristalline du corps régulateur du complexe CPC révèle que INCENP et boréaline s'associent à l'extrémité C-terminale en hélice α de la survivine pour former un hétérotrimère étroitement lié (Jeyaprakash et al. 2007). Ces interactions masquent le domaine de dimérisation du BIR de la survivine (Jeyaprakash et al. 2007). Ceci expliquerait que, dans une cellule en interphase, la survivine ne puisse former un homodimère que dans le cytoplasme, INCENP et boréaline étant confinés dans le noyau (Ruchaud et al. 2007b).

2. Protéine associée aux microtubules

La localisation de la survivine au cours de la mitose a longtemps fait l'objet d'une controverse, étant décrite à l'origine comme une protéine de type MAP (« microtubule-associating protein ») localisée au niveau du fuseau tout au long de la mitose (Li et al. 1999) (O'Connor et al. 2000a). En fait, il existerait deux fractions de survivine aux localisations subcellulaires distinctes dans une cellule en mitose : une fraction associée aux microtubules et une fraction associée au CPC (Fortugno et al. 2002), deux fractions qui sont probablement le reflet de modifications post-traductionnelles distinctes, comme la phosphorylation en T34 qui ne touche que la fraction microtubulaire (Fortugno et al. 2002). Grâce à son extrémité C-terminale en hélice α , une partie de la survivine est directement associée aux microtubules polymérisés où elle contribuerait aussi à la formation du fuseau, mais selon un mécanisme différent de celui du complexe CPC (Li et al. 1998) (Giodini et al. 2002) (Fortugno et al.

2002) (Figure 23). En fait, la survivine participerait à un mécanisme plus global dans la régulation des microtubules à la fois dans les cellules en mitose et en interphase. La survivine semble favoriser la stabilité des microtubules en bloquant leur dynamique, la réduction de leur nucléation à partir des centrosomes et leur enrichissement en tubuline acétylée. Ce mécanisme est indépendant de la kinase Aurora-B et augmente la résistance des microtubules à leur dépolymérisation par le nocodazole (Rosa et al. 2006). Grâce à son association avec Cdk1, la survivine liée aux microtubules est phosphorylée en T34 pendant la mitose (O'Connor et al. 2000a), ce qui lui permet de contrecarrer efficacement l'apoptose au cours de cette étape du cycle cellulaire.

3. Promotion de la transition G1/S

En plus de son rôle mitotique bien défini, la survivine posséderait un rôle lors de l'entrée dans le cycle cellulaire et dans la transition G1/S des cellules normales telles que les précurseurs hématopoïétiques soumis aux cytokines ou les lymphocytes T lors de leur activation antigénique (Song et al. 2005). Par exemple, dans les cellules CD34⁺ adultes, l'expression de la survivine est induite très précocement (G0) sous l'effet de facteurs de croissance et requise pour la progression en G1. L'expression de la survivine est donc un événement qui précède l'entrée dans le cycle (Fukuda et al. 2002). Dans les cellules tumorales, l'expression aberrante de la survivine forcerait la transition G1/S malgré l'absence de facteurs de croissance. C'est le cas de la croissance des cellules pré-B murines qui est affranchie de l'IL3 grâce à la surexpression de la survivine (Ambrosini et al. 1997). Une équipe a montré que la survivine induisait l'entrée dans le cycle via la translocation nucléaire du complexe survivine-Cdk4 par compétition avec p16^{INK4a}, permettant ainsi l'activation du complexe CyclineE-Cdk2 et la phosphorylation de Rb (Suzuki et al. 2000) (Figure 23).

C. Apoptose

1. Une protéine de la famille des IAP

Le mécanisme moléculaire d'inhibition de l'apoptose par la survivine est sujet à débat, différents travaux se contredisant quant à l'inhibition directe des caspases-9, -7 et -3 (Altieri 2006b). Cependant, la résolution de sa structure cristalline ainsi que des approches acellulaires semblent définitivement éliminer la capacité de l'unique domaine BIR de la

survivine à se lier de façon stable aux caspases et à en inhiber leur activation et/ou activité (Verdecia et al. 2000). En fait, le domaine BIR de la survivine n'est pas précédé des quelques acides aminés absolument nécessaires à la liaison directe de XIAP avec les caspases. Les récents progrès sur les mécanismes moléculaires des IAP soulignent le fait que la survivine n'est pas un cas isolé au sein de cette famille, XIAP étant probablement le seul véritable inhibiteur direct des caspases (Eckelman et al. 2006). Néanmoins, la survivine inhiberait les caspases de façon indirecte avec l'aide d'autres partenaires.

De plus, la survivine bloquerait la mort cellulaire indépendante des caspases notamment en inhibant la libération du facteur mitochondrial pro-apoptotique AIF (« Apoptosis Inducing Factor ») (Liu et al. 2004). Enfin, la survivine participerait aussi à la survie en régulant les processus de réparation de l'ADN et le métabolisme cellulaire en réponse à un stress (Chakravarti et al. 2004). La survivine recèlerait donc de multiples stratagèmes pour protéger la cellule de l'apoptose dont la compilation en un modèle fédérateur paraît parfois difficile. Il est maintenant clair que ses modifications post-traductionnelles, sa localisation subcellulaire, ainsi que ses interactions moléculaires avec d'autres acteurs de l'apoptose interviennent dans la régulation de la survie cellulaire par la survivine.

2. Blocage de l'apoptose dans les cellules en interphase

Compartimentation de la survivine

Alors que la survivine n'est pas détectable dans les cellules saines quiescentes, elle est anormalement exprimée dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire des mitochondries dans les cellules tumorales, et ceci indépendamment du cycle cellulaire (Figure 23). Une fois traduite, la survivine étant une petite molécule de 16,5 kDa, elle semble pouvoir diffuser de façon passive du cytosol vers le noyau de la cellule, puis elle est exportée hors du noyau de façon active grâce notamment au transporteur Crm1 (Rodriguez et al. 2002). Récemment, une étude a révélé la présence d'un NES dans la protéine survivine à l'origine de son exportation hors du noyau (Colnaghi et al. 2006). L'invalidation de cette séquence NES par mutation dirigée induit l'accumulation de la survivine dans le noyau des cellules qui deviennent alors sensibles à TRAIL et aux radiations X. Par contre, la perte de son NES ne semble pas affecter sa localisation mitotique et son rôle dans le cycle cellulaire (Colnaghi et al. 2006). Cependant, une autre étude a montré que le NES pourrait participer à

la localisation d'une partie de la survivine au niveau des centromères au cours de la mitose (Knauer et al. 2006). Néanmoins, une conclusion fait l'unanimité : la localisation cytoplasmique de la survivine est indispensable à son activité anti-apoptotique dans les cellules tumorales en interphase (Colnaghi et al. 2006) (Knauer et al. 2007b) (Connell et al. 2008). Quelques données peuvent l'expliquer. Tout d'abord, dans le noyau, la survivine est beaucoup moins stable que dans le cytoplasme (Connell et al. 2008). De plus, seule la survivine cytoplasmique pourrait constituer un homodimère, alors que la survivine nucléaire formerait un hétérotrimère avec les protéines INCENP et boréoline (Ruchaud et al. 2007b). L'homodimérisation de la survivine et son domaine BIR sont requis pour son interaction avec ces partenaires moléculaires cytosoliques comme Smac/DIABLO et XIAP. Cette compartimentation n'est possible que dans une cellule interphasique grâce à la membrane nucléaire puisque celle-ci disparaît en début de mitose.

Quant à la localisation mitochondriale de la survivine, elle formerait une réserve protégée et rapidement disponible pour bloquer l'apoptose (Dohi et al. 2004a). La mitochondrie constitue également un passage important pour la modification post-traductionnelle de la survivine, renforçant sa capacité à bloquer l'apoptose (Dohi et al. 2007). Bien que la survivine ne possède pas de séquence d'import mitochondrial, son association avec Hsp90 et/ou AIP (« aryl hydrocarbon receptor-interacting protein ») pourrait lui permettre d'entrer dans la mitochondrie (Fortugno et al. 2003) (Kang and Altieri 2006). Jusqu'à ce jour, la survivine mitochondriale n'a été observée que dans des cellules tumorales.

Coopération moléculaire

L'étude de « l'interactome » de la survivine ouvre un champ riche d'investigations. Le domaine BIR de la survivine n'est pas capable d'interagir directement avec les caspases, ce qui explique pourquoi la survivine ne montre pas d'effet anti-apoptotique dans certains modèles acellulaires (Banks et al. 2000) (Verdecia et al. 2000). Par contre la survivine peut bloquer indirectement les caspases en favorisant l'activité anti-apoptotique de XIAP par deux mécanismes (Figure 23).

Premièrement, sous l'effet d'un signal apoptotique, la fraction mitochondriale de la survivine est libérée dans le cytosol (Dohi et al. 2004a) et peut former un complexe avec XIAP afin de le protéger de sa dégradation protéasomale (Dohi et al. 2004b). Ce mécanisme peut être reconstitué *in vitro* avec des protéines recombinantes, l'activité des Caspases-9 et -

3 sont inhibées plus efficacement en présence de la survivine. L'assemblage de ce complexe est régulé par la compartimentation subcellulaire de la survivine. En effet, au contraire de la survivine mitochondriale, la survivine cytoplasmique est phosphorylée en S20 par la PKA et ne peut former un complexe avec XIAP (Dohi et al. 2007). Par ailleurs, il semble que la kinase Chk2, activée lors d'un dommage à l'ADN, puisse stimuler la libération de la survivine à partir de la mitochondrie, produisant ainsi un message de survie probablement nécessaire au temps de la réparation de l'ADN (Ghosh et al. 2006). Enfin, la formation d'un trimère entre le complexe survivine-XIAP et XAF-1, un inhibiteur de XIAP, entraînerait la dégradation de la survivine (Arora et al. 2007). Cette étude souligne le rôle de XAF-1 en tant que suppresseur de tumeur.

Deuxièmement, la survivine peut neutraliser Smac/DIABLO, un autre inhibiteur de XIAP libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose. La survivine peut former un complexe avec Smac/DIABLO dans le cytoplasme afin de libérer XIAP (Song et al. 2003) (Song et al. 2004) ou alors directement le séquestrer dans la mitochondrie (Ceballos-Cancino et al. 2007).

Ces mécanismes anti-apoptotiques ont lieu dans les cellules indépendamment du cycle cellulaire. D'autres semblent plus spécialisés dans le blocage de la catastrophe mitotique qui correspond à l'apoptose au cours de la mitose.

3. Blocage de la catastrophe mitotique

Phosphorylation par Cdk1

Au cours des phases G2/M, la survivine forme un complexe avec Cdk1 au niveau des microtubules (Figure 23). La survivine subit la phosphorylation de son domaine BIR en T34 par Cdk1 et peut alors séquestrer la Caspase-9 sur le cytosquelette et bloquer l'apoptose pendant la mitose (Li et al. 1998) (O'Connor et al. 2000a). L'interaction de la survivine avec la Caspase-9 est probablement indirecte, mais ceci n'est pas encore élucidé. Néanmoins, il a été montré que seule la survivine phosphorylée en T34 s'associait à la protéine HBXIP du virus de l'hépatite B et que ce complexe pouvait lier la Caspase-9 et inhiber la voie mitochondriale de l'apoptose (Marusawa et al. 2003). La phosphorylation en T34 stabilise l'expression de la survivine (O'Connor et al. 2000a) et semble aussi favoriser la capacité de son domaine BIR à interagir avec ses partenaires moléculaires (Verdecia et al. 2000). Par

conséquent, Cdk1 soutiendrait l'activité anti-apoptotique de la survivine au cours de la mitose. C'est pourquoi, l'introduction d'un mutant non phosphorylable de la survivine en T34 (survivine T34A) induit l'apoptose des cellules en mitose *in vitro* (O'Connor et al. 2000a) et l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Grossman et al. 2001). L'environnement anti-apoptotique créé par Cdk1 n'est pas limité à ses effets sur la survivine. La phosphorylation de la Caspase-9 par Cdk1 permet le blocage de la mort cellulaire induite par des agents anti-mitotiques (Allan and Clarke 2007). Inversement, l'inhibition pharmacologique de Cdk1 entraîne l'apoptose des cellules tumorales soit par une combinaison séquentielle avec des taxanes (O'Connor et al. 2002), soit sélectivement des tumeurs dépendantes de l'oncogène c-Myc (Goga et al. 2007).

Coopération avec Aurora-B

De plus, dans les cellules tumorales, il existerait une relation d'interdépendance entre la survivine et la kinase Aurora-B dans le blocage de la catastrophe mitotique. Lors de l'activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique en métaphase, le complexe survivine-Aurora-B pourrait être impliqué dans la phosphorylation stabilisatrice de Bcl-2 et l'inactivation de Bax contrebalançant ainsi le message de mort induit par la protéine Mad2 (Vogel et al. 2007). De plus, dans des fibroblastes humains, la surexpression de Aurora-B entraîne un état de sénescence par l'activation de p53. Par contre, si Aurora-B et la survivine sont co-exprimées, la croissance de ces mêmes fibroblastes est augmentée. La sensibilité à l'apoptose induite par l'expression anormale de Aurora-B est inhibée par la survivine via la diminution de l'expression de p53 (Jung et al. 2005).

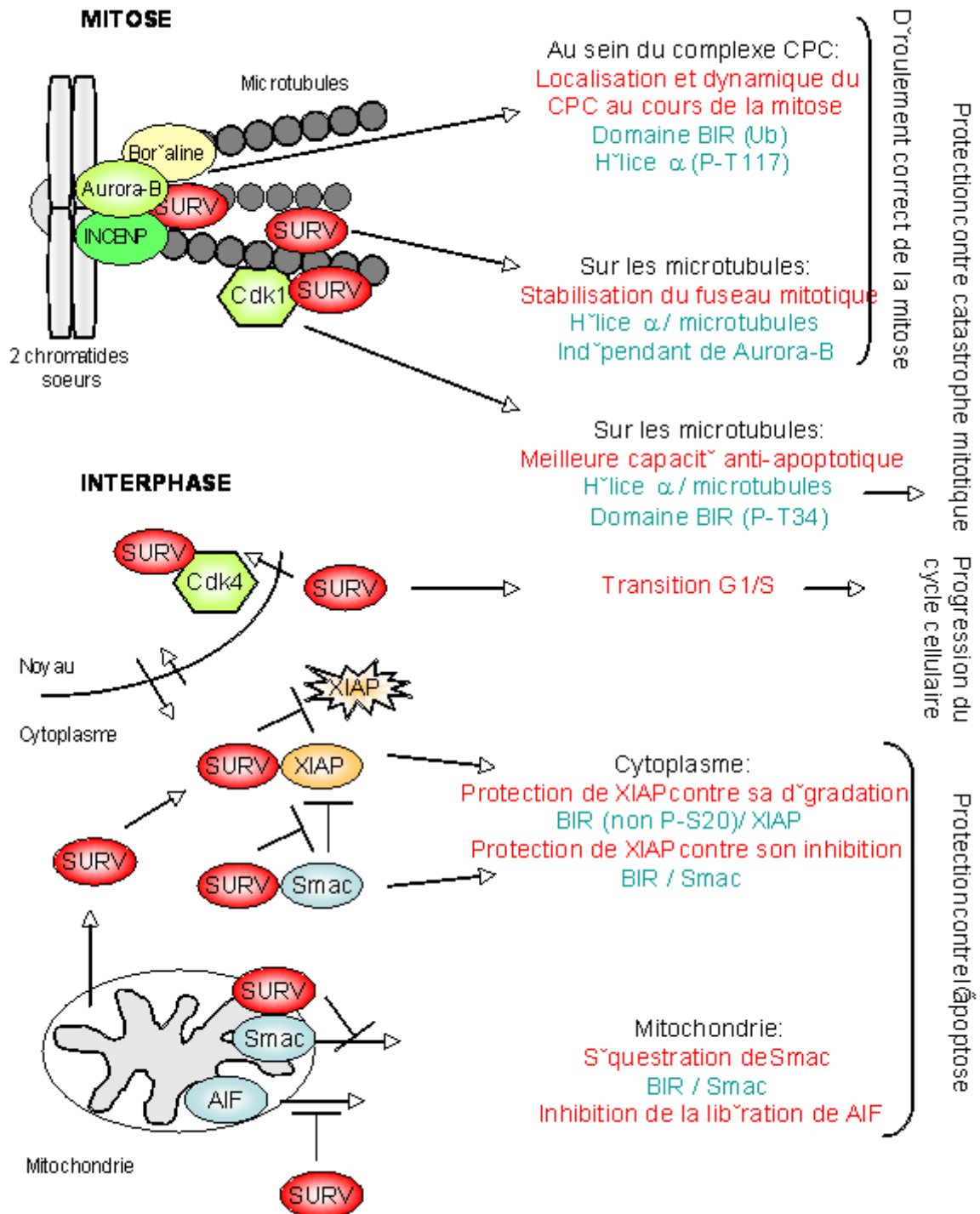


Figure 23 : Modèle d'activité de la survivine selon sa localisation et le cycle cellulaire.

A gauche : localisations subcellulaires et interactions moléculaires de la survivine (SURV). A droite : activités de la survivine (en rouge), domaines moléculaires et modifications post-traductionnelles nécessaires (en bleu). En mitose : la survivine fait partie du complexe CPC (chromosomal passenger complex) ou constitue une MAP (microtubule-associated protein). En interphase : la survivine est localisée dans le cytoplasme et la mitochondrie où elle inhibe l'apoptose, la survivine pourrait aussi participer à la transition G1/S via la translocation nucléaire de Cdk4. La survivine est exportée hors du noyau par un mécanisme actif et est libérée à partir de la mitochondrie lors d'un stimulus apoptotique.

VII. Implications physiologiques et pathologiques

A. Développement de l'embryon

La survivine est exprimée au cours du développement embryonnaire et fœtal chez l'humain (Ambrosini et al. 1997) (Adida et al. 1998). Elle semble exprimée très tôt dans les oocytes et les embryons murins avant leur implantation au stade blastocyste, et principalement localisée dans le cytoplasme de leurs cellules (Kawamura et al. 2003). Son expression est prédominante et presque ubiquitaire au jour E11.5, alors qu'elle est restreinte à l'épithélium bronchiolaire des poumons et aux cellules de la crête neurale entre les jours E12.5 et E21 (Adida et al. 1998). L'expression de la survivine ne chevauche pas celle de Bcl-2 indiquant un rôle unique de la survivine dans la formation des organes au cours du développement (Adida et al. 1998).

Alors que les embryons de souris hétérozygotes survivine^{+/-} se développent normalement, les embryons homozygotes survivine^{-/-} montrent un défaut de formation de leurs microtubules, deviennent polyploïdes et ne survivent pas au-delà du jour E4.5 (Uren et al. 2000). Ceci évoque fortement un défaut de mitose à la fois dans la formation du fuseau mitotique et dans la cytodierèse. D'ailleurs ce phénotype est très proche de celui des embryons de souris « knock-out » pour INCENP (Cutts et al. 1999). Cependant, une seconde étude révèle que l'extinction de l'expression de la survivine entraîne une activation de la Caspase-3 chez plus de 30% des embryons à l'étape « deux cellules » et 85% de ces mêmes embryons exposés à une dose minimale de staurosporine n'ayant aucun effet sur la viabilité des embryons non modifiés (Kawamura et al. 2003). Des inhibiteurs des Caspase-3 et -9 restaurent la viabilité des embryons dépourvus de survivine. La survivine aurait donc aussi un rôle dans la protection des embryons contre l'apoptose avant leur implantation.

L'extinction de l'expression de la survivine spécifiquement dans les progéniteurs neuronaux au moyen d'un système Cre-loxP chez des souris, induit la formation d'un cerveau anormalement petit caractérisé par une destruction massive des progéniteurs neuronaux (Jiang et al. 2005). L'étude des tissus nerveux au cours du développement montre un rôle prépondérant de la survivine dans la survie des cellules nerveuses plus que dans leur prolifération.

Quant aux souris hétérozygotes survivine^{+/-}, malgré leur développement embryonnaire normal, une fois adulte, leur foie révèle un état basal pro-apoptotique et montre une sensibilité plus importante à l'effet d'un anticorps antagoniste de Fas par l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Conway et al. 2002).

B. Cellules normales chez l'adulte

Chez l'adulte, l'expression de la survivine semble restreinte aux cellules conservant la capacité de proliférer, par exemple les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes T activés et les cellules endothéliales.

L'expression de la survivine est observée dans les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ du sang de cordon et de la moelle osseuse adulte. L'induction de son expression est induite par l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK/Erk1/2 sous l'effet de facteurs de croissance (Fukuda et al. 2002), et nécessaire à leur entrée dans le cycle (Fukuda and Pelus 2001). De plus, son expression exogène protégerait les progéniteurs hématopoïétiques de l'apoptose (Fukuda et al. 2004). Puis au cours de la maturation cellulaire, la survivine est différenciellement exprimée. Les cellules érythrocytaires expriment la survivine tout au long de leur maturation tandis qu'elle est indétectable dans les mégacaryocytes (Gurbuxani et al. 2005). Cependant, les souris transgéniques exprimant spécifiquement la survivine dans ces deux types cellulaires ne montrent pas d'anomalie du lignage érythroïde/mégacaryocytaire (McCrann et al. 2008).

La survivine est plus fortement exprimée suite à l'activation des lymphocytes T mémoire qu'après celle des lymphocytes T naïfs (Kornacker et al. 2001). La survivine est induite dans les cellules T périphériques par la co-signalisation de OX40 via la voie PI3K/Akt, et est nécessaire pour leur prolifération (Song et al. 2005). La délétion conditionnelle de la survivine dans les cellules T révèle son rôle dans leur maturation et leur prolifération sans affecter de façon majeure leur survie (Xing et al. 2004) (Okada et al. 2004).

Plusieurs cytokines angiogéniques comme l'angiopoïétine-I et le VEGF régulent la survie des cellules endothéliales normales en modulant l'expression de la survivine via la voie PI3K/Akt (Papapetropoulos et al. 2000) (Tran et al. 2002), tandis que l'IL11 induit son expression à travers la voie JAK2/STAT3 (Mahboubi et al. 2001). L'angiogenèse étant un facteur important dans la tumorigenèse, l'identification des voies de survie des cellules endothéliales est essentielle. L'induction de l'expression de la survivine par le VEGF est

impliquée dans la chimiorésistance des cellules endothéliales *in vitro* (Tran et al. 2002). De plus, une étude a révélé son rôle majeur dans la survie des cellules endothéliales par l'inhibition de l'activation de la Caspase-3 *in vitro* et souligné son expression massive au sein des néo-vaisseaux *in vivo*. (O'Connor et al. 2000b).

C. Pathologies

La dérégulation de l'expression de la survivine semble participer à de nombreuses situations physiopathologiques comme la sclérose multiple, la récupération du cerveau après un traumatisme, la régénération du foie, le renouvellement de l'épithélium intestinal ou encore l'infertilité (Li and Brattain 2006).

Cependant, son implication majoritaire reste dans le cancer (Fukuda and Pelus 2006). Tout d'abord, la survivine est exprimée indépendamment du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses qui possèdent alors un niveau aberrant de survivine quelle que soit la phase de leur cycle cellulaire (Xia and Altieri 2006). Les fonctions de la survivine ne sont plus restreintes à des étapes précises comme c'est le cas dans la vie d'une cellule saine. Ensuite, la survivine fait partie d'un réseau très complexe de régulateurs en connexion avec de multiples circuits de signalisation, des circuits qui sont souvent dérégulés dans le cancer. Le concept d'addiction des tumeurs à un oncogène (Jonkers and Berns 2004) semble adéquat à la survivine. Son inhibition constituerait alors un véritable « talon d'Achille » pour les cellules cancéreuses (Altieri 2008). Enfin, la survivine est maintenant considérée en tant qu'antigène de tumeur au caractère universel (Andersen et al. 2007). Ainsi, la survivine pourrait représenter un outil majeur en clinique humaine.

VI. Outils en cancérologie

A. Pronostic

Plusieurs modèles animaux transgéniques comme celui du cancer de la vessie (Salz et al. 2005) et celui du mélanome (Thomas et al. 2007) soulignent l'importance de la survivine dans la prédisposition à l'apparition de cancers. En clinique humaine, l'expression

aberrante de la survivine dans les tumeurs a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré sa corrélation avec la progression de la maladie et un pronostic défavorable (Fukuda and Pelus 2006). Néanmoins, la localisation cytoplasmique ou nucléaire associée à ce pronostic diffère (Stauber et al. 2007), des protocoles standardisés devront être réalisés pour conclure sur ce sujet (Li et al. 2005a). Aucune donnée n'est encore disponible sur la valeur prédictive de la survivine mitochondriale.

Le rôle de la survivine en tant que marqueur prédictif de l'efficacité des thérapies anti-tumorales a également été étudié (Pennati et al. 2007). Des études *in vitro* montrent que la survivine est fortement exprimée dans des lignées cellulaires radio ou chimio-résistantes. Chez les patients, l'expression aberrante de la survivine est ainsi corrélée à une chimiorésistance : résistance au taxol pour les carcinomes ovariens, au cisplatine pour les cancers de l'estomac et de la vessie, et aux traitements hormonaux pour les cancers du sein et de la prostate. De plus, l'expression de la survivine est induite par certains traitements anti-cancéreux comme c'est le cas du cisplatine. La survivine jouerait donc un rôle dans la résistance aux traitements à la fois *de novo* et acquise.

En plus de son intérêt pronostique, la survivine semble également utilisable en clinique en tant que biomarqueur urinaire dans le cancer de la vessie (Kenney et al. 2007) et indicateur de rechute dans le cancer du sein (Yie et al. 2006).

B. Cible thérapeutique

L'expression préférentielle de la survivine dans les tissus tumoraux en fait une cible thérapeutique potentielle particulièrement pertinente. De plus, la survivine étant également exprimée par les cellules endothéliales lors de l'angiogénèse (Mesri et al. 2001), son inhibition permettrait de cibler aussi bien la tumeur que les néo-vaisseaux associés.

Plusieurs antagonistes de la survivine ciblant sa transcription (YM155), sa traduction (ASO c'est-à-dire oligonucléotide antisens), ses fonctions (T34A) ou même ses interactions (avec Hsp90 comme la shepherdine) sont actuellement en cours de développement clinique (Altieri 2006a). L'association d'inhibiteurs de la survivine à des traitements anti-cancéreux conventionnels et leur administration éventuellement séquentielle pourraient améliorer les protocoles thérapeutiques anti-anticancéreux existants. La survivine est également la cible de thérapies géniques et cellulaires innovantes (Pennati et al. 2007). Les premiers résultats sont encourageants puisque les essais pré-cliniques et cliniques la ciblant montrent une

efficacité significative sans effet secondaire majeur. Néanmoins, le rôle physiologique de la survivine dans l'hématopoïèse et le système immunitaire suggère qu'une utilisation prolongée des inhibiteurs de la survivine pourrait s'avérer délétère. Un suivi sera donc nécessaire pour conclure définitivement sur l'innocuité de l'inhibition de la survivine en cancérologie.

RESULTATS

IMPLICATION DE LA SURVIVINE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU MM

Le MM est défini par l'expansion monoclonale de plasmocytes malins dans la moelle osseuse et par leur possible dissémination vers des sites extramédullaires dans les formes les plus agressives. Les plasmocytes myélomateux se caractérisent par une forte instabilité chromosomique et une prolifération résiduelle aberrante qui suggèrent une dérégulation du cycle cellulaire. De plus, l'accumulation des plasmocytes malins dans la moelle osseuse et la fréquente chimiorésistance observée évoquent aussi un défaut d'apoptose. Enfin, malgré les progrès thérapeutiques récents dans cette hémopathie maligne, la rechute semble inexorable. Une meilleure compréhension des mécanismes d'oncogenèse et de chimiorésistance est donc indispensable pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est pourquoi, nous avons choisi d'expertiser l'implication de la survivine dans la physiopathologie du MM. En effet, la survivine est une protéine de la famille des IAP qui possède des particularités uniques au sein de cette famille impliquée dans le blocage de l'apoptose. Tout d'abord, la survivine est exprimée dans la plupart des tumeurs au contraire des tissus différenciés chez l'adulte. Ensuite, elle se place au carrefour des processus de prolifération et de survie dont les mécanismes sont dérégulés dans les cancers. Enfin, elle est la cible de nombreuses voies de signalisations anormalement activées dans les tumeurs. Lorsque j'ai commencé mon travail de thèse, aucune étude n'avait analysé l'expression ou le rôle de la survivine dans le MM. Seules quelques études avaient montré l'augmentation de son expression lors de l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et NF- κ B (Mitsiades et al. 2002a; Mitsiades et al. 2002b). Dans un premier temps, nous avons comme objectif d'évaluer l'expression de la survivine dans les cellules de MM. Si cette étude descriptive démontrait son expression aberrante, nous voulions développer des outils fonctionnels afin de déterminer son implication ainsi que ses mécanismes moléculaires dans les processus de survie, prolifération, tumorigenèse et chimiorésistance des cellules de MM.

ARTICLE 1 :

L'impact significatif de la survivine dans la croissance myélomateuse

Expression de la protéine survivine dans le MM

Les plasmocytes malins expriment fortement la survivine

Nous avons tout d'abord évalué l'expression de la survivine par western blot dans une collection de lignées plasmocytaires humaines de MM. Nous avons également comparé les niveaux d'expression de la survivine entre deux couples autologues de lignées B non tumorales (transformées *in vitro* par le virus EBV) et de lignées plasmocytaires myélomateuses issues d'un même patient et disponibles au laboratoire.

Nos résultats montrent que toutes les lignées de MM testées expriment la protéine survivine à des niveaux au moins dix fois supérieurs à ceux trouvés dans les lignées lymphocytaires B. De plus, les niveaux d'expression de la survivine dans les lignées de MM sont comparables à ceux observés dans des lignées cellulaires humaines de cancers connus pour leur expression anormale de la survivine : carcinome du col de utérus (HeLa), leucémie T aigue (Jurkat) et lymphome de Burkitt (Raji). Les lignées de MM présentent tout de même des niveaux variables de l'expression de la survivine, il existe un facteur 2 entre les lignées XG6 et XG1.

L'expression de la survivine corrèle avec la progression de la maladie

Pour la première fois, nous avons expertisé le niveau d'expression de la survivine dans des plasmocytes primaires obtenus à partir de prélèvements de patients atteints de MM. L'étude est réalisée par western blot car aucun anticorps fiable pour l'étude de la survivine en cytométrie de flux n'est commercialisé. L'utilisation de la technique de western blot nous oblige à purifier les plasmocytes au préalable, réduisant ainsi notre expertise aux prélèvements riches en plasmocytes. La purification est réalisée au moyen de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD138 (syndécan-1) spécifique des plasmocytes dans la moelle osseuse. Les prélèvements médullaires de 9 patients au diagnostic et 11 patients en rechute, ainsi que deux prélèvements extramédullaires sont utilisés. Les

prélèvements de moelle osseuse de patients sains étant extrêmement rares et contenant très peu de plasmocytes (<0,5%), les lymphocytes B périphériques du sang de donneurs sains et des plasmocytes polyclonaux obtenus à partir d'un cas de plasmocytose réactionnelle (PR) et par génération *in vitro* ont été évalués et comparés aux plasmocytes myélomateux.

Nous avons observé des niveaux variables de l'expression de la survivine dans les plasmocytes primaires de patients atteints de MM. De façon importante, l'expression de la survivine corrèle avec la progression de la maladie. En effet, les plasmocytes de la plupart des patients en rechute expriment plus fortement la survivine que ceux des patients au diagnostic. D'ailleurs, les prélèvements au moment du diagnostic puis de la rechute chez un même patient l'illustrent bien. Aussi, les plasmocytes extramédullaires de patients révèlent des niveaux de survivine similaires à ceux trouvés précédemment pour les lignées cellulaires de MM qui sont presque exclusivement obtenus à partir de prélèvements extramédullaires de patients atteints de MM.

L'expression de la survivine est liée à la malignité du MM

L'expression de la survivine est dépendante du cycle cellulaire (Li and Altieri 1999). Pourtant, les lignées de MM et les lignées B non tumorales possèdent un taux de prolifération similaire malgré la différence importante dans leur expression de la survivine. De même, les plasmocytes polyclonaux de plasmocytose réactionnelle sont très proliférants et expriment la survivine à un niveau plus faible que la plupart des plasmocytes malins de patients de MM en rechute ou en phase extramédullaire. Par conséquent, l'expression de la survivine n'est pas uniquement le reflet d'un niveau de prolifération, mais également liée à la malignité intrinsèque du MM.

Diminution de l'expression de la survivine dans les lignées de MM

L'ARN interférence par méthode lentivirale

La survivine étant fortement exprimée dans le MM et son expression montrant une corrélation avec la progression de la maladie, nous avons décidé d'éteindre son expression afin de déterminer la fonction qu'elle occupe dans la cellule myélomateuse et d'évaluer son utilité en tant que cible thérapeutique potentielle dans le traitement du MM. Il est difficile de

transfecter les lignées de MM par les méthodes classiques (électroporation, lipides cationiques). Nous avons donc eu recours à l'utilisation de particules lentivirales. L'avantage des lentivirus réside dans leur capacité à s'intégrer efficacement au génome de la cellule cible infectée et de ce fait conférer une expression stable du transgène. Afin d'inhiber l'expression de la survivine, nous avons développé des lentivirus permettant une production stable de petits ARN d'interférence (siRNA). Les ARN « tige-boucle » (shRNA pour « short hairpin RNA ») synthétisé à partir d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase III, sont reconnus et clivés par une ribonucléase de type III appelée Dicer, générant ainsi des siRNA « double-brin ». Ces siRNA sont dessinés de telle sorte qu'ils portent un brin complémentaire à une séquence de 19 nucléotides de l'ARN messager codant pour la protéine dont on souhaite diminuer l'expression. Le brin du siRNA et l'ARNm s'apparient et sont pris en charge par le complexe multi-protéique RISC qui dirige le clivage de l'ARN messager ciblé. Les cassettes d'expression comprenant le promoteur et la séquence d'intérêt sont clonés dans des vecteurs lentiviraux qui permettent leur intégration stable dans le génome des cellules hôtes. Ces cellules synthétiseront alors en permanence des shRNA qui, modifiés en siRNA, entraîneront la dégradation de l'ARN messager ciblé. Les cassettes d'expression porte également un gène marqueur, celui de la GFP dans notre cas, qui permet de suivre l'efficacité de l'infection lentivirale. Au laboratoire, nous avons donc réalisé les constructions nécessaires à l'expression de shRNA *survivine* et les productions lentivirales pour l'infection de plusieurs lignées de MM.

Notre objectif a été de diminuer partiellement l'expression de la survivine. En effet, son extinction complète ne permet pas d'établir une lignée cellulaire stable du fait des anomalies létales de la division cellulaire.

Résultats

Nous avons testé l'effet des shRNA *survivine* sur deux lignées de MM (XG1 et XG6) en comparaison avec des siRNA contrôle ciblant le gène bactérien *LacZ* absent des cellules humaines. Les lignées XG1 et XG6 expriment des niveaux différents de survivine, XG1 l'exprimant plus fortement que XG6. Sept jours après l'infection lentivirale, les deux lignées de MM révèlent une efficacité presque totale de l'infection, les cellules transduites par les shRNA *survivine* montrent une diminution de moitié de leur expression de survivine stable durant les trois semaines de l'expérience. Aucune compensation par l'augmentation de l'expression d'un autre membre de la famille des IAP (cIAP1, cIAP2 et XIAP) n'est observée par western blot.

La diminution de l'expression de la survivine dans ces différentes lignées entraîne une réduction progressive de leur croissance cellulaire associée à une induction d'apoptose spontanée (marquage Apo2.7 en cytométrie de flux et clivage des protéines Caspase-3 et PARP-1 par western blot) et un blocage du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium en cytométrie de flux). Cependant, le profil du cycle cellulaire est différent entre les deux lignées. La diminution de l'expression de la survivine dans la lignée XG1 induit un blocage des cellules en mitose et une polyploïdie tandis que pour la lignée XG6, seul un blocage des cellules en phase G0/G1 est observé. Les cellules XG1 sont plus précisément bloquées en prométaphase de la mitose (coloration MGG). La polyploïdie observée pour la lignée XG1 est associée à des noyaux de taille anormale révélant des cas d'endomitose (marquage Hoechst 33342 en microscopie).

Enfin, nous avons testé les répercussions éventuelles des shRNA *survivine* sur les effets cytotoxiques de différents agents utilisés dans le traitement du MM (test MTT). Nous avons alors observé que la diminution de l'expression de la survivine permettait d'augmenter de façon significative la sensibilité des deux lignées de MM à plusieurs drogues comme la doxorubicine, la dexaméthasone et le melphalan. En effet, 48 heures après l'incubation avec ces drogues, les lignées XG1 et XG6 montrent une viabilité diminuée d'un facteur 2 ou 3 avec les shRNA *survivine*.

ORIGINAL ARTICLE

Significant impact of survivin on myeloma cell growth

M Romagnoli¹, V Trichet², C David¹, M Clément¹, P Moreau¹, R Bataille¹ and S Barillé-Nion¹

¹INSERM, UMR 601, 9 quai Moncousu, Nantes, F-44093, France and ²INSERM, ERI 7, Nantes, F-44035, France

Survivin is a fascinating member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family with its dual roles in mitosis and apoptosis, and emerges as an attractive target for cancer therapy. Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy, characterized by deregulated proliferation, cell-death processes and fatal outcome. We thus investigated survivin expression in myeloma cells and its role in MM biology to evaluate its potential interest as a target in MM treatment. Our results describe the cancer-specific overexpression of survivin in myeloma cells and show a significant correlation between survivin expression at protein level and clinical course of MM. Moreover, survivin knockdown by RNA interference led to growth rate inhibition of myeloma cells related to apoptosis induction and deep cell-cycle disruption. Finally, survivin knockdown sensitized myeloma cells to conventional anti-myeloma agents. Altogether, these data argue for the interest to evaluate survivin antagonists in MM treatment.

Leukemia advance online publication, 22 February 2007;
doi:10.1038/sj.leu.2404602

Keywords: myeloma; survivin; apoptosis; cell cycle

Introduction

Accumulating evidence suggests that lack of balance between proliferation and cell death may lead to clonal expansion and cancer emergence.¹ In this field, the protein survivin has recently attracted great attention because of its involvement in major cell processes that are often deregulated in cancer, i.e. cell division and apoptosis (reviewed in² and Li³). Survivin is a bifunctional member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, which has been localized to various components of the mitotic apparatus, reflecting its important function in cell division. It participates in chromosomal passenger complex with Aurora-B kinase, INCENP and Borealin necessary to anchor chromosomes on mitotic spindle and to ensure the right chromosome segregation during mitosis. Survivin also allows complete cytokinesis at the end of mitosis. Functional evidence implicates a broader role for survivin in the regulation of microtubule dynamics.⁴ In addition, the presence of one Baculoviral IAP Repeats (BIR) domain that characterizes the IAP family in survivin has suggested that survivin might be involved in the protection against cell death by direct caspase inhibition, as accurately described for the other IAP molecule X-linked IAP (XIAP).⁵ However, increasing evidence indicates that the role of survivin in apoptosis is more complex and that it may protect from apoptosis by both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.³ Interestingly, increased

survivin expression is described in several cancers, including solid tumors and hematological malignancies. Moreover, survivin expression appears to be associated with unfavorable clinicopathological parameters such as poor prognosis with progressive diseases and shorter patient survival rates in different cancers (reviewed in^{2,3}). Altogether, these observations have led to propose survivin as a potential target in cancer therapy.⁶

Multiple myeloma (MM) is a B-cell malignancy characterized by the accumulation in the bone marrow of malignant plasma cells that retain their self-renewing potential in contrast to normal plasma cells. Indeed, although myeloma cells display a low rate growth *in vivo* during stable phase of the disease, cell cycle dysregulation underlies unrestrained proliferation of myeloma cells in aggressive MM and during relapse from treatment.⁷ Overexpression of cyclins D^{8,9} and deletion or inactivation of cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) genes (reviewed by Chen Kiang⁷) have been reported in myeloma cells and might promote cell cycle re-entry and MM pathogenesis. But there has been no functional evidence to support this concept and the mechanisms that underlie cell-cycle dysregulation in MM remain undefined. Moreover, aneuploidy (gain of odd chromosomes or loss of chromosome 13) and chromosomal abnormalities (especially translocations involving the 14q32 region) are pervasive in MM.¹⁰ Centrosome amplification has been implicated as a possible cause of chromosomal instability in MM, but the mechanisms leading to aneuploidy are at present unclear.¹¹ Finally, impaired apoptosis accounts for the accumulation of myeloma cells in the bone marrow during the stable stage of the disease and contributes to chemoresistance observed in MM. However, even though the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1 seems to play a major role in myeloma cell survival,¹² death regulation is not well understood in MM.

Previous data have suggested that survivin may play a role in MM biology. Indeed, pharmacological inhibitors of major intracellular signalling pathways involved in MM, for example, STAT-3, PI3-kinase/AKT or NF- κ B, that decreased myeloma cell growth also reduced survivin expression in MM cells.^{13–15} However, no functional data rely myeloma cell growth on survivin expression; further experiments are needed to elucidate survivin role in MM.

Finally, the treatment of patients with MM is far from successful, as patients frequently develop drug resistance and ultimately succumb to death. Thus, validation of new potential targets is a major challenge to define new therapeutic treatments in MM. Therefore, to gain insight into the roles of survivin in MM, we investigated its expression and the consequences of its knockdown into myeloma cells. Our findings indicate that (i) survivin protein levels correlated with disease progression and (ii) survivin took part in myeloma cell growth by regulating cell cycle, apoptosis and drug sensitivity. Therefore, these results argue for the therapeutic interest in targeting survivin in MM.

Correspondence: Dr S Barillé-Nion, UMR 601, 9 quai Moncousu, Nantes F-44093, France.

E-mail: sbarille@nantes.inserm.fr

Received 21 September 2006; revised 14 December 2006; accepted 21 December 2007

Material and methods

Cell lines and culture conditions

The XG1, XG2, XG6, NAN1, NAN2, NAN3, NAN4, MDN, SBN, BCN human myeloma cell lines (HMCLs) have been previously established in our laboratory, and are cultured in the presence of 3 ng/ml of recombinant human IL6 (rhIL6) (Novartis, Basel, Switzerland).¹⁶ U266, LP1, L363, JIN3, OPM2, RPMI-8226 and NCI-H929 HMCLs were commercially available. MM1S was a gift from Dr Rosen ST (Chicago, IL, USA). The autologous Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cell lines (SBN-EBV or BCN-EBV) were obtained in our laboratory after *in vitro* EBV infection of peripheral blood mononuclear cells from patients with MM, for whom a myeloma cell line (SBN or BCN) had already been established. Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FCS, 2 mM glutamine and 5×10^{-5} M 2- β mercapto ethanol.

Primary cells

Primary myeloma cells were purified from bone marrow, blood or from pleural effusion samples of patients with MM using CD138 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), as described previously.¹⁷ Nine newly diagnosed patients, 11 at the time of medullary relapse, and 2 extramedullary samples at diagnosis (pleural effusion and plasma cell leukemia) were evaluated. All the patients at diagnosis had symptomatic disease and fulfilled the diagnostic criteria of the Southwest Oncology Group of United States of America. Relapse was defined by the occurrence of any new symptom relevant to MM. Polyclonal plasma cell precursors were either generated *in vitro* in our laboratory as described previously by Jago *et al.*¹⁸ or obtained from blood sample of patient with reactive plasmacytosis. B lymphocytes were purified using CD19 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec) from peripheral blood samples of healthy donors. Informed consent was provided according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association and the University Hospital of Nantes Review Board approved these studies.

RNA interference by lentiviral transduction

For knockdown experiments, oligonucleotides were designed and cloned into pSUPER, following the guidelines of Brummelkamp *et al.*¹⁹ to produce the short hairpin RNA shSurv and shCont, directed against the human survivin or bacterial lacZ mRNA, respectively. The targeted sequence of survivin mRNA was GGACCACGCATCTCTACA, as previously chosen by Carvalho *et al.*²⁰ and the lacZ mRNA was targeted as done by Qin *et al.*²¹ The cloned oligonucleotides were controlled by sequencing (Genome Express, France) before subcloning them with the upstream H1 promoter into the vector pFG12.²¹ The resulting constructs allowed to express both green fluorescent protein (GFP) and target-specific short hairpin RNA (shRNA). They were used for lentivirus production, following the protocols provided with the ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen). Virus-containing supernatants were concentrated 100- to 1000-fold by ultracentrifugation before titering. A multiplicity of infection of 4–10 was currently used to transduce XG1 and XG6 HMCLs, which were next analyzed for GFP expression by using flow cytometry and for survivin expression by immunoblot.

Immunoblot analysis

A total of 5×10^6 cells were resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1%

Triton X100 and 2 μ g/ml aprotinin). After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 12 000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA protein assay, Pierce, Rockford, IL, USA). Fifty micrograms of proteins were loaded for each lane. The proteins were separated by 7.5 or 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), then electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Western blot analysis was performed by standard techniques, with ECL detection (Pierce) for cIAP2, XIAP, caspase-3, PARP-1 and actin, or with SuperSignal detection (West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) for survivin and cIAP1. Protein loading was checked with anti-actin monoclonal antibody (mAb). Survivin and actin levels were quantified by densitometry, and then the survivin/actin ratios were expressed in arbitrary units (a.u.) related to (i) the MDN HMCL, considered as a reference because of its low survivin level among HMCLs in experiments evaluating survivin levels in cell lines or primary myeloma cells, and (ii) the reference shCont-cells in RNA interference experiments.

Antibodies

Anti-survivin polyclonal antibody (pAb) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), anti-cIAP1 pAb (H83), anti-cIAP2 pAb (H85), anti-caspase-3 mAb (E-8) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), anti-XIAP mAb from BD Biosciences Transduction Laboratories™ (San Jose, CA, USA), anti-PARP-1 mAb (Ab-2) from Calbiochem (Darmstadt, Germany) and anti-actin mAb from Chemicon International (Temecula, CA, USA).

Cell growth evaluation

XG1 or XG6 cells were seeded in 48-well plate at 5×10^4 cells per well on day 5 and grown until day 28 post-transduction. Growth curves were plotted based on the number of viable cells as determined by eosin exclusion.

Apoptosis experiments

XG1 or XG6 cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and the percentages of apoptosis were assessed by flow cytometry analysis after Apo2.7-PE staining (Beckman Coulter, Marseilles, France). Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the CellQuest program (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Cell cycle distribution

A total of 2×10^5 shCont and shSurv-XG1 and -XG6 cells were fixed in 70% cold ethanol for 30 min at 4°C, washed twice in PBS, stained with propidium iodide (PI) at 10 μ g/ml for 15 min at room temperature. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the CellQuest program. Data were gated on viable cells and on the FL2-area versus FL2-width cytogram to exclude doublets and aggregates, and a minimum of 2×10^4 gated cells were collected per sample. Analysis of the cell cycle was performed using the MODFIT software.

May-Grünwald-Giemsa staining

XG1 cells were collected in a cytospin and colored by May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining. Mitotic cells were analyzed using microscopy (Leica GMBH, Germany).

Hoechst 33342 staining

XG1 cells were washed in PBS and stained with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) at 4 µg/ml for 5 min at room temperature and washed in PBS. Microcopy analysis was performed on a fluorescence microscope (Leica GMBH, Germany) and nuclear size of cells was measured by Perfect-Image software.

Cell viability analysis

Cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After 48 h of incubation with doxorubicine (250 nM for XG1 and 125 nM for XG6), dexamethasone (1 µM) or melphalan (5 µM for XG1 and 2.5 µM for XG6) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), cells were incubated with 50 µl of 2.5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) for 3.5 h. Absorption at 570 nm wavelength was measured after total solubilization of formazan crystals by 100 µl of lysis solution. The inhibition of cell viability induced by drugs was expressed as a percentage compared with corresponding untreated cells.

Statistics analysis

We used the non-parametric Wilcoxon rank sum test for comparing survivin levels in myeloma cells and cell viabilities in MTT assays. We used the Student's *t*-test for comparing nuclear sizes of transduced cells.

Results

Survivin is highly expressed in myeloma cells but at variable levels

We first evaluated the survivin expression of protein level in a series of human myeloma cell lines (HMCLs) by immunoblot

analysis. As shown in Figure 1a, survivin was detected in all HMCLs tested in a range of 1–2.5 a.u., compared to survivin level of the reference MDN chosen for its lowest survivin levels (with NAN2, NAN3 and SBN) among HMCLs. Interestingly, the HMCLs SBN and BCN expressed much higher levels of survivin compared to their autologous EBV-infected B cell lines (Figure 1b). Finally, survivin levels detected in HMCLs are comparable to those of other human cancer cells lines, already described as survivin-overexpressing human cell lines, that is, the epithelioid carcinoma cell line HeLa, the acute T cell leukemia Jurkat and the Burkitt lymphoma cell line Raji (Figure 1c). We further assessed the levels of survivin expression in primary cells. First, survivin was not detectable in B lymphocytes obtained from the peripheral blood of healthy donors, as shown for one patient in Figure 2a (lane 1). In contrast, survivin could be detected in non-tumoral polyclonal plasma cell precursors, obtained from reactive plasmacytosis or by *in vitro* generation (Figure 2a, lanes 5–6). However, these cells displayed significant lower survivin levels than HMCLs or most of MM in relapse (Figure 2a, lanes 3–4). Moreover, CD138-purified myeloma cells from patients with MM presented a large range of survivin expression levels (0.12–1.5), as assessed by immunoblot analysis (Figure 2a, lanes 2–3) and shown in Figure 2b. Importantly, a strong correlation was observed between the levels of survivin expression in myeloma cells and the stage of the disease. Indeed, myeloma cells from patients at diagnosis (*n*=9, median value=0.2, range 0.12–0.35) expressed significant lower survivin levels than those from patients with medullary relapse (*n*=11, median value=0.85, range 0.28–1.5, *P*<0.01) (Figure 2b). Interestingly, survivin level detected in primary MM cells from a patient at diagnosis (0.35 a.u.) increased when the patient relapsed (1 a.u.) (Figure 2c). Moreover, primary myeloma cells from extramedullary locations presented high levels of survivin (0.9 and 1) close to those detected in most HMCLs (*n*=21, median value=1.5, range 1–2.5), which were frequently generated

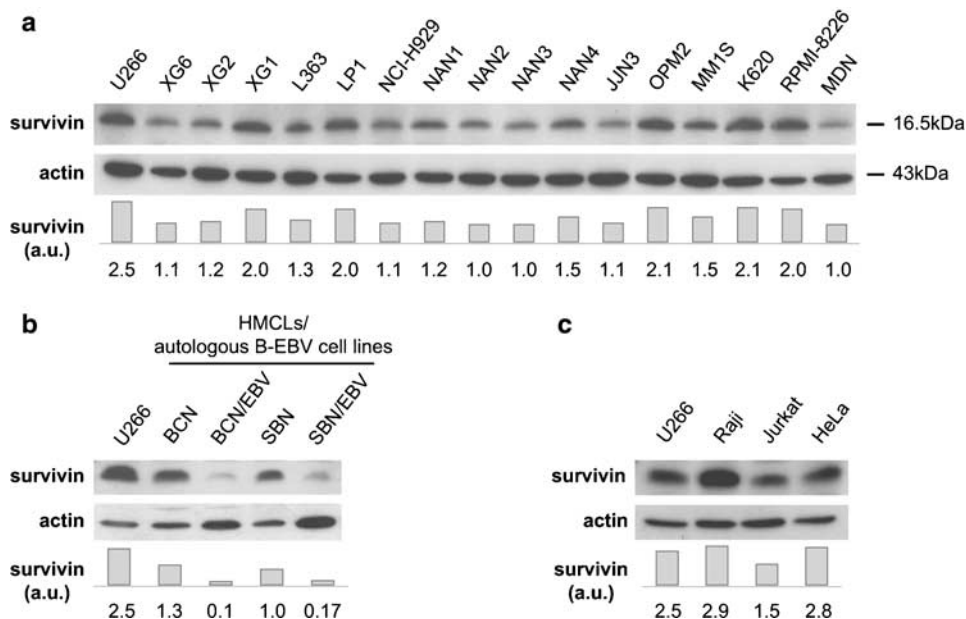


Figure 1 Survivin overexpression in HMCLs. Survivin expression was evaluated by western blotting analysis in (a) HMCLs, (b) autologous HMCLs and EBV infected B cell lines (BCN and BCNEBV, SBN and SBN/EBV), and (c) human cancer cell lines. Protein loading was controlled with anti-actin mAb. Survivin and actin levels were quantified by densitometry. The survivin/actin ratio is expressed in a.u. related to the reference MDN and illustrated in histograms.

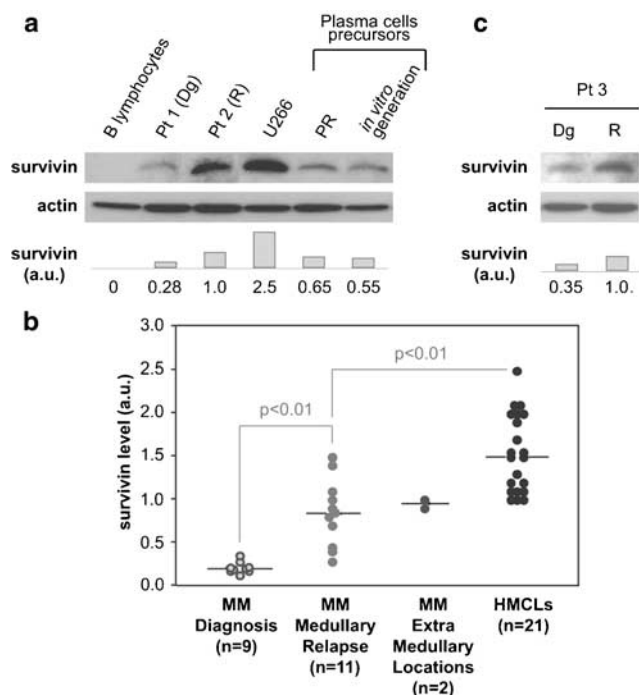


Figure 2 Correlation of survivin expression with MM progression. (a) Survivin expression in myeloma cells from patients with MM at diagnosis (Pt 1 (Dg)) or on relapse (Pt 2 (R)), in HMCL U266 (lanes 2–4), and in non-tumoral B cells: B lymphocytes (lane 1), plasma cells precursors from reactive plasmacytosis (RP) or obtained by *in vitro* generation (lanes 5–6) by western blotting analysis. (b) Survivin expression was evaluated in HMCLs and in purified primary myeloma cells of patients at diagnosis, on medullary relapse or with extramedullary myeloma by western blotting analysis. Protein loading was controlled with anti-actin mAb. Survivin and actin levels were quantified by densitometry. The survivin/actin ratio is expressed in a.u. related to the reference MDN. (c) Survivin expression was assessed in myeloma cells of the same patient (Pt 3) at diagnosis (Dg) and in relapse (R).

from myeloma cells of patients with extramedullary disease. Finally, survivin levels in HMCLs were significantly higher than in MM relapses ($P<0.01$).

Stable downregulation of survivin by RNA interference-induced myeloma cell growth inhibition

To antagonize survivin protein, we developed lentiviral short-hairpin RNA (shRNA) vectors, targeting either survivin mRNA (shSurv) or the bacterial lacZ mRNA that was used as control for unspecific effects of RNA interference (shCont). XG1 and XG6 HMCLs, presenting opposite levels of survivin, were transduced with shSurv or shCont producing lentivirus, and efficiency of their transduction was monitored by GFP expression using FACS analysis from day 7 up to day 28 post-infection. As shown in Figure 3a, ~100% of XG1 or XG6 cells expressed high levels of GFP at day 7 when transduced either by shSurv or shCont vectors. The percentages of GFP+ cells remained constant during the experiments conducted with XG1 and XG6 cells (data not shown). Moreover, transduction of both XG1 and XG6 cell lines with lentiviral vectors containing shRNA targeting survivin resulted in stable marked downregulation of survivin proteins, compared with corresponding shCont or non-transduced cells. Survivin levels were decreased by a mean factor of 50% over day 7 to day 28 post-infection for shSurv-XG1 as well

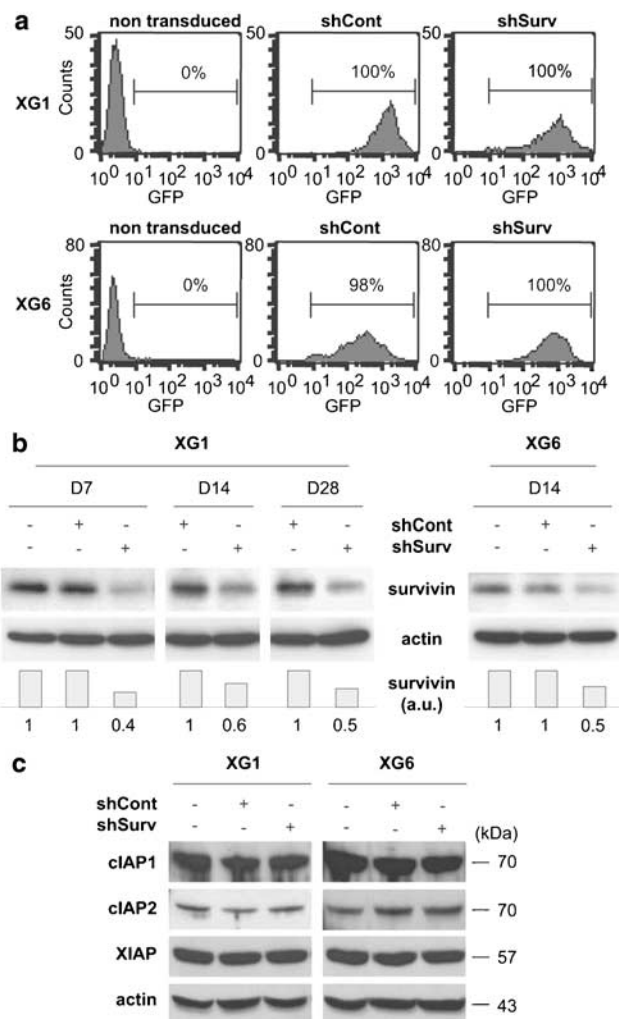


Figure 3 Efficiency of RNAi targeting survivin by lentiviral-mediated delivery of shRNA. (a) Transduction efficiency was evaluated by the % of GFP+ cells measured by flow cytometry. A representative experiment is shown at day 7 after transduction of both HMCLs XG1 and XG6. (b) Survivin stable downregulation was monitored by western blotting analysis from day 7 to day 28 after transduction in XG1 and XG6 cells as shown at day 14. Histograms show the compared survivin level in a.u. in non-transduced cells, shRNA control (shCont) and shRNA targeting survivin (shSurv) XG1 and XG6 cells. (c) Expression of cIAP1, cIAP2 and XIAP was evaluated by western blotting analysis in shCont and shSurv-XG1 or -XG6 cells.

as shSurv-XG6 shown on day 14 (Figure 3b). No detectable increase of cIAP1, cIAP2 or XIAP was observed in shSurv-cells compared with shCont-cells, demonstrating that stable suppression of survivin levels did not result in compensatory upregulation of other IAP members (Figure 3c). These experiments were carried out three times and a representative one is presented in figures.

Stable knockdown of survivin levels reproducibly correlated with significant reduction of XG1 and XG6 cell growth rates assessed by cell viability assay. Cell growth of shSurv-XG1 decreased over day 7 to day 28 in comparison to shCont-XG1, in all experiments ($n=3$) with a mean factor of inhibition of $40.5 \pm 7\%$ at day 14. A representative experiment is shown in Figure 4. Similarly, knocking down survivin in XG6 led to cell growth inhibition compared with shCont-XG6 ($43 \pm 4\%$ at day 14, $n=3$) (data not shown).

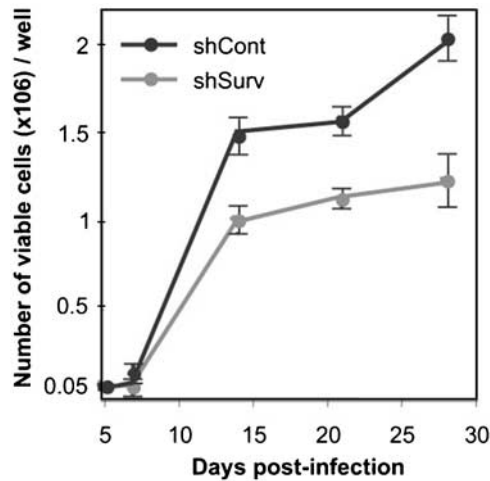


Figure 4 Decreased cell growth in shSurv-transduced XG1 cells. Growth curve of viable XG1 cells transduced with shCont (black circle) or shSurv (gray circle) was established from day 5 to day 28. A representative experiment is shown ($n=3$).

We then investigated survivin knockdown effects on cell death and cell cycle in these cell lines. We observed that survivin downregulation induced specific apoptosis detected by Apo2.7 staining in shSurv-XG1 and shSurv-XG6 cells compared with corresponding shCont-transduced cells. For example, specific apoptosis at day 14 was evaluated to $21.7 \pm 2.4\%$ ($n=3$) in shSurv-XG1 and to $22.2 \pm 3.1\%$ ($n=3$) in shSurv-XG6 cells, compared with the corresponding shCont-transduced cells. Representative experiments are shown in Figure 5a. Of note, shRNA transduction of these HMCLs *per se* induced a significant non-specific apoptosis as detected in shCont-XG1 and -XG6 cells (Figure 5a). This effect may explain the plateau observed in the shCont-XG1 growth curve (Figure 4). We then analyzed cleavage of caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1), a prototype substrate of effector caspases. As shown in Figure 5b, partial cleavage of both proteins was detected by immunoblot in shSurv-cells compared with shCont-cells, arguing for the activation of caspase cascade in these cells. Similarly, Hoechst 33342 staining detected $33 \pm 4\%$ of fragmented nuclei in shSurv-XG1 versus $9.5 \pm 1.5\%$ in shCont-XG1, as illustrated in Figure 6d.

Moreover, we evidenced that survivin knockdown dramatically modified cell cycle in transduced cells. First, PI staining and cytometry flow analysis demonstrated a blockade of cell cycle in the mitotic phases G2/M in shSurv-XG1, compared with shCont-XG1 (53.5% versus 13.6% respectively) as shown in Figure 6a and b at day 14 in a representative experiment. A decrease of cells in G1 and S phases was concomitantly observed (37.4% in shCont-XG1 versus 26.5% in shSurv-XG1 for phase S and 49% versus 20% for phase G1). This G2/M blockade was further observed on cytopun XG1 cells stained by MGG that showed $90.3 \pm 3.5\%$ of mitotic cells in prometaphase in shSurv-XG1 cells versus $47 \pm 2\%$ in shCont-XG1 cells. Figure 6c illustrates the excessive number of prometaphase cells among mitotic cells observed in shSurv-XG1 cells compared with shCont-XG1 cells, because other mitosis steps such as anaphase could be easily detected. Second, survivin downregulation in XG1 led to the strong increase in polyploid cells ($7.7 \pm 0.8\%$ in shCont-XG1 versus $25 \pm 1.8\%$ in shSurv-XG1 cells), as detected and quantified by PI staining and flow cytometry analysis (Figure 6a). This polyploidy was confirmed

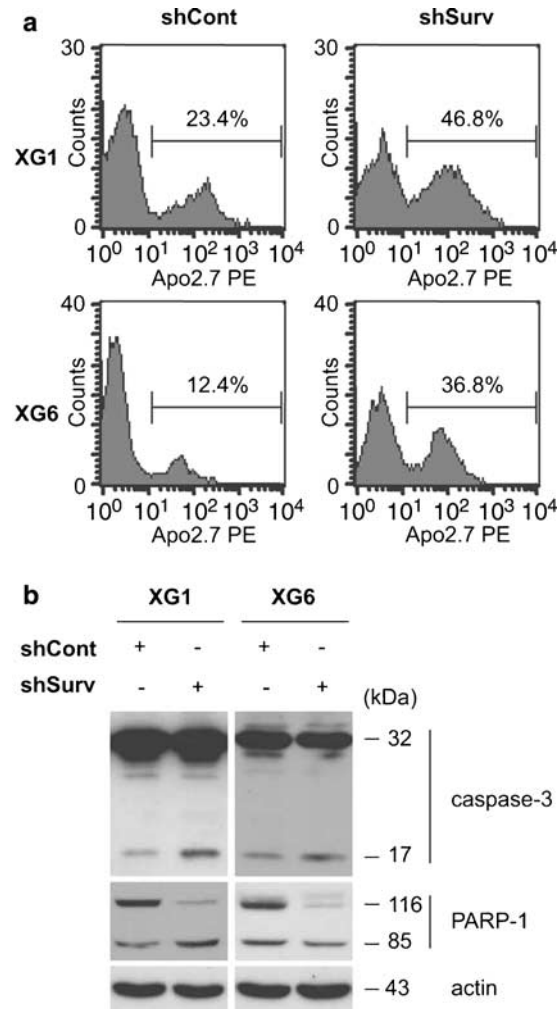


Figure 5 Induction of apoptosis in shSurv-transduced HMCLs. **(a)** The % of apoptosis in shCont and shSurv-cells was measured by Apo2.7-PE staining using flow cytometry. A representative experiment is shown ($n=3$). **(b)** Caspase-3 and PARP-1 cleavage was detected by Western blotting analysis in shSurv-XG1 or -XG6 cells.

by the significant increased nuclear size in survivin-depleted cells ($10.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in shSurv-XG1 versus $8.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in shCont-XG1, $P<0.001$), as detected by Hoechst 33342 staining and depicted in Figure 6d.

Cell cycle was also disrupted in shSurv-XG6 compared with shCont-XG6 but its profile differed from shSurv-XG1. Indeed, shSurv-XG6 cells accumulated in G0/G1 phases (64 versus 47% in shCont-XG6) in the representative experiment shown in Figure 6a and b. G2/M and S phases were concomitantly decreased in shSurv-XG6 cells versus shCont-XG6 cells (7 versus 10% and 29 versus 43% for G2/M and S phases, respectively). Finally, no increase in polyploid cells was detected in shSurv-XG6.

Survivin downregulation sensitized myeloma cells to anti-MM agents

To investigate the impact of survivin on the sensitivity of myeloma cells to conventional drugs used in MM therapy, we analyzed cytotoxic effect of doxorubicin, dexamethasone and melphalan on XG1- and XG6-transduced cells. Interestingly, survivin knockdown significantly enhanced cell viability inhibi-

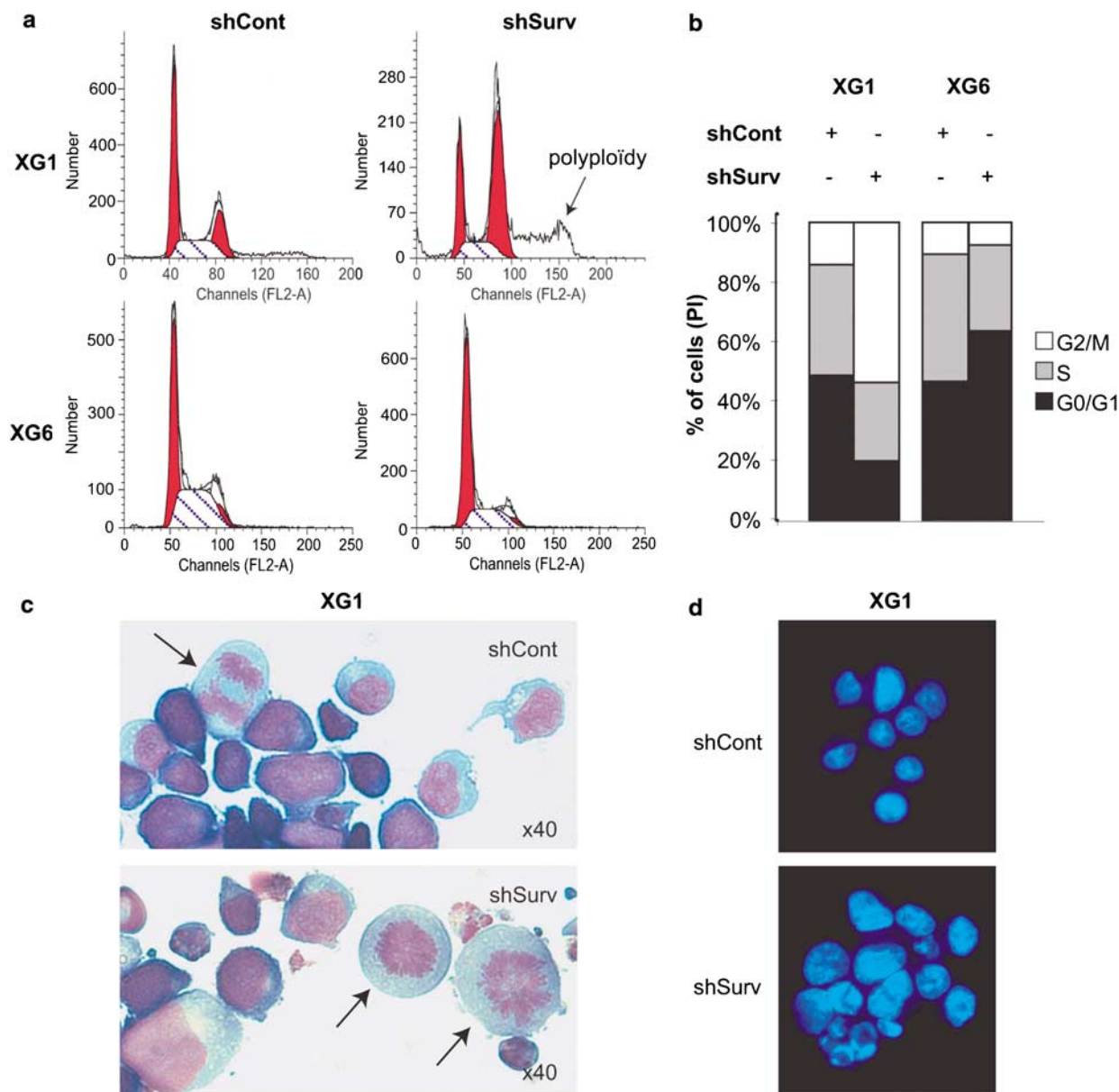


Figure 6 Cell-cycle disruption of shSurv-transduced HMCLs. Cell cycle in viable shCont and shSurv-XG1 or XG6 cells was monitored by PI staining using flow cytometry and analyzed with MODFIT software (**a**), and the % of cells in each cell-cycle phase was illustrated in histogram (**b**). Mitotic cells were evidenced by MGG staining in shCont and shSurv-XG1 cells by using microscopy. An anaphase cell was pointed on shCont-XG1 slide and two prometaphase cells on shSurv-XG1 slide (**c**). Nuclear size of shCont and shSurv-XG1 cells was evaluated by Hoechst 33342 staining using microscopy (**d**). A representative experiment is shown ($n=3$).

tion of shSurv-XG1 and -XG6 cells ($P<0.05$) upon treatment with doxorubicin, dexamethasone and melphalan compared with shCont-cells, as assessed by MTT assay (Figure 7).

Altogether, these results indicate that knocking down survivin in MM cells increased (i) their spontaneous apoptosis and deeply impaired their cell cycle distribution, leading to a marked decrease of their capacity to proliferate and (ii) their sensitivity to conventional anti-MM agents.

Discussion

This work underlines for the first time in our knowledge, the potential role of survivin in myeloma pathogenesis. Indeed, we

demonstrated that myeloma cells expressed a high level of survivin and that its depletion by RNA interference inhibited myeloma cell growth and sensitized myeloma cells towards anti-MM agents. First, we observed by immunoblot analysis that all HMCLs display detectable level of survivin comparable to other cancer cells previously described for their survivin overexpression. It was originally thought that the overexpression of survivin observed in cancer simply reflected a higher number of proliferating cells and that survivin expression was mainly cell-cycle-regulated when compared with the canonical CDE/CDH elements present in survivin gene promoter.²² But since non-tumoral, highly proliferating EBV-infected B lymphocytes generated from myeloma patients' blood samples express survivin weakly, in comparison with the myeloma cell lines

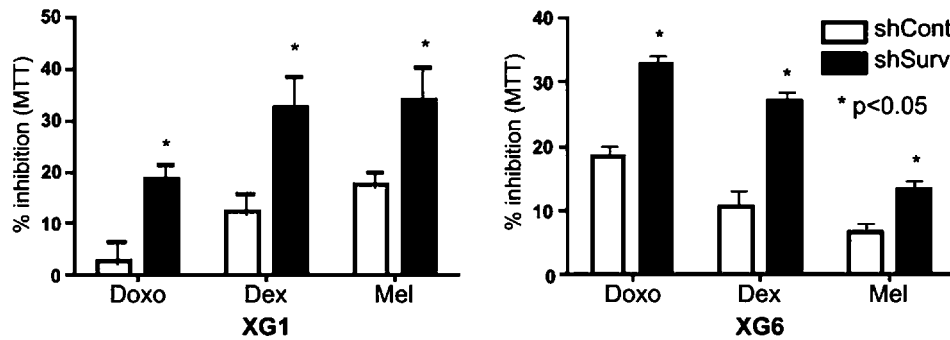


Figure 7 Increased drug sensitivity in shSurv-transduced HMCLs. Cell viability was determined by MTT assay after 48 h of incubation with doxorubicin (250 nM for XG1 and 125 nM for XG6), dexamethasone (1 μ M) or melphalan (5 μ M for XG1 and 2.5 μ M for XG6). The inhibition of cell viability induced by drugs was expressed as a percentage compared to untreated cells. Mean $\pm$ s.d. of four experiments each performed in triplicate are shown. For statistical analysis, non-parametric Wilcoxon rank sum test was performed comparing shSurv to shCont-XG1 and XG6 cells (* P < 0.05, n = 4).

established from the same patients, we propose that survivin level in HMCLs does not reflect exclusively a high proliferating rate but rather a cancer status. This notion is also supported by the observation that survivin level is also higher in HMCLs than in non-tumoral plasma cell precursors, considered as their normal proliferating counterpart. Although myeloma cells usually display a low *in vivo* proliferation rate, our results showing high levels of survivin in myeloma cells suggest a possible regulation of survivin gene expression in primary myeloma cells independent of cell-cycle progression. These results and others prompt the possibility that survivin gene may be globally deregulated in cancer, driving overexpression of the protein at all cell cycle phases, and not just mitosis.^{4,23} A diversity of events may result in constitutive activation of upstream signalling in cancer cells that may trigger the activation and transcription of appropriate transcription factors to turn on survivin expression in cancer. Of note, Gritsko *et al.* recently demonstrated that STAT-3 directly regulates the survivin promoter in breast cancer cells.²⁴ On the contrary, the p53 tumor suppressor has been described as a potent repressor of survivin gene transcription.²⁵ Further experiments are needed to unravel detailed mechanisms involved in survivin expression control in MM.

Importantly, we show that survivin expression in MM correlated significantly with disease stages. Indeed, survivin levels in patients at diagnosis were significantly lower in comparison with those detected in patients at relapse. Interestingly, we also observed the increase of survivin level in MM cells removed from the same patient at diagnosis and relapse time in his clinical course. Many data currently demonstrate that survivin expression in cancer is associated with unfavorable clinical-pathological parameters, such as poor prognosis and shorter patient survival rates (reviewed by Li²⁶). Of note, regarding hematological malignancies, a significantly shorter survival was observed in patients with high survivin expression in large B-cell lymphoma²⁷ as well as in mantle cell lymphoma.²⁸ Moreover, survivin proved to be a negative prognostic factor in patients with acute myeloid leukemia.²⁹ Our data presented here argue for an increase in survivin level during MM clinical course. In line with our results, a recent report indicates that the expression ratios for survivin were significantly higher in MM patients with poorer outcome, especially after chemotherapy.³⁰ Although a larger cohort of patients would be necessary to confirm our results (as soon as a reliable survivin mAb for flow cytometry analysis becomes available), our results strongly argue for survivin participation in myeloma progression. However, it would be

of particular interest to study survivin involvement in the first steps of oncogenesis in MM. Further experiments delineating survivin expression in normal bone marrow plasma cells and MGUS will be conducted to address this important point.

To define potential interest to inhibit survivin expression in MM cells, we performed RNA interference experiments targeting survivin in both HMCLs XG1 and XG6. The RNA target sequence used here is directed against nucleotides 45–65 of survivin that code for a region common to the three known isoforms of the protein, and was previously used to repress efficiently survivin expression in HeLa cells.²⁰ On the one hand MM cells are among hard-to-transfect cells and on the other transient RNA interference, using small interfering RNA targeting survivin, decreased the short-lived survivin expression no more than 48 h in our hands (personal data), we developed a lentiviral RNA interference approach. This approach led to efficient transduction of both HMCLs XG1 and XG6, as assessed by GFP monitoring up to 28 days post-transduction and to significant depletion of survivin in these cell lines. These experiments allowed us to demonstrate that survivin knocking down led to decreased myeloma cell growth rate related to significant increased apoptosis and deep cell cycle disruption.

First, survivin knockdown induced significant spontaneous apoptosis in HMCLs, as detected by Apo2.7 staining or nuclei fragmentation. Our results indicate that survivin knockdown in myeloma cells correlated with caspase-3 and PARP-1 cleavage, arguing for the activation of caspase cascade when survivin level was decreased in these cells. Many *in vitro* and *in vivo* experiments show that survivin expression protect cells from cell death (Conway *et al.*³¹ and reviewed by Altieri², Li³). However, elucidation of the mechanisms whereby this occurs has not been straightforward. Actually, the existence of functional survivin–caspase complexes initially described is now controversial, as survivin lacks structural motifs that in other IAPs (for example, XIAP) mediated caspase binding.³² But survivin may mediate apoptosis inhibition through interaction with proapoptotic factors such as the IAP inhibitor SMAC/Diablo,³³ the apoptosis-inducing factor AIF³⁴ or through subcellular compartmentalization in mitochondria.³⁵ Whether survivin exerts its inhibitory effect on caspase activity by direct or indirect mechanisms in myeloma cells is currently under investigation.

Second, we observed that survivin depletion caused an accumulation of prometaphase cells and a decline in anaphase and telophase cells in XG1 cell line. In addition, an increased population of shSurv-XG1 cells had a DNA content of 4N or greater compared to shCont-XG1. These observations reveal that

survivin knockdown partially blocked normal mitosis progression in MM cells and even if survivin depleted cells eventually exit mitosis, they generally fail to complete cytokinesis. Such cell cycle abnormalities have also been described in melanoma cell lines or HeLa cells.^{20,36} Of note, survivin depletion in XG6 cells also resulted in cell cycle blockade, but with a different profile of DNA content. Indeed, shSurv-XG6 cells accumulated in G1 phase and displayed normal DNA content (no polyploidy). These results support a role for survivin not only in normal mitosis progression and completion but also in early cell cycle entry. The role of survivin in G1/S transition has been proposed in different works even though mechanisms are still completely unresolved.^{37,38} The apparent discrepancy between the stage of cell cycle disruption in shSurv-XG1 and -XG6 cells may also be linked to their different p53 status (mutated p53 in XG1 and wild-type p53 in XG6) (Mazars *et al.*³⁹ and unpublished data) as observed by Beltrami *et al.*⁴⁰ in the colorectal carcinoma cell line HCT-116. Indeed, the tumor suppressor p53 maintains the genome integrity and promotes cell cycle checkpoints (both G1/S and G2/M checkpoints) when cells are unable to undergo normal mitosis. Thus, p53 pathway may be activated when XG6 cells were depleted in survivin, leading to elimination of polyploid cells and G1 phase arrest, as initially observed in normal human cells.⁴¹ But other not yet defined mechanisms may be involved and further experiments are needed to delineate the role of p53 in this system.

Finally, survivin depletion in myeloma cells enhanced cytotoxic effect of conventional drugs used in MM therapy, i.e., doxorubicin, dexamethasone and melphalan. Growing evidence has indicated that survivin expression plays an essential role in drug resistance (reviewed Li³). Our data and Nakagawa's report³⁰ underline this finding in MM and raise the hypothesis that inhibiting survivin may improve MM treatment.

Altogether, these data suggest that survivin might be a rational target for myeloma therapy, since MM expresses high level of the protein survivin and its depletion induces cell growth inhibition and drug sensitization. The use of molecular antagonists, including antisense, ribozymes, siRNA and dominant-negative survivin mutants, have generated promising results in other survivin overexpressing cancers leading to suppression of tumor growth, and provided proof of principle in preclinical testing. Our results argue for the interest in evaluating survivin antagonists in MM treatment. Moreover, our model might help to unravel the complexity of 'survivin network' that appear to intersect multiple pathway of cell division, resistance to apoptosis and surveillance checkpoints.

Acknowledgements

We thank Alexandrine Geoffroy-Luseau for providing us plasma cell precursors. This work has been supported by La Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée 2005).

References

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; **22**: 8581–8589.
- Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003; **197**: 8–29.
- Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 609–615.
- Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003; **22**: 8568–8580.
- Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 46–54.
- Chen-Kiang S. Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev* 2003; **194**: 39–47.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E *et al.* Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; **99**: 1745–1757.
- Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I *et al.* Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence *in situ* hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 2004; **104**: 1120–1126.
- Magrangeas F, Lode L, Willems S, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* 2005; **19**: 191–194.
- Chng WJ, Ahmann GJ, Henderson K, Santana-Davila R, Greipp PR, Gertz MA *et al.* Clinical implication of centrosome amplification in plasma cell neoplasm. *Blood* 2006; **107**: 3669–3675.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL *et al.* Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002; **100**: 194–199.
- Kardosh A, Soriano N, Liu YT, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM *et al.* Multitarget inhibition of drug-resistant multiple myeloma cell lines by dimethyl-celecoxib (DMC), a non-COX-2 inhibitory analog of celecoxib. *Blood* 2005; **106**: 4330–4338.
- Stromberg T, Ekman S, Girmila L, Dimberg LY, Larsson O, Axelsson M *et al.* IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood* 2006; **107**: 669–678.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T *et al.* Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002; **99**: 4079–4086.
- Bataille R, Jégou G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P *et al.* The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of 'many and multiple myelomas' and of new targets for myeloma therapy. *Hematologica* 2006; **91**: 1234–1240.
- Barille S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 1999; **163**: 5723–5728.
- Jégou G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001; **97**: 1817–1822.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; **296**: 550–553.
- Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2987–2998.
- Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 183–188.
- Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 1999; **344** (Part 2): 305–311.
- Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA *et al.* Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 522–528.
- Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M *et al.* Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 11–19.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; **277**: 3247–3257.
- Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer* 2005; **114**: 509–512.
- Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J *et al.* Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; **96**: 1921–1925.

- 28 Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, Villamor N et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004; **164**: 501–510.
- 29 Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P et al. Expression and prognostic significance of survivin in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; **111**: 196–203.
- 30 Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Haematol* 2006; **81**: 824–831.
- 31 Conway EM, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, Luo W, Devriese A, Lupu F et al. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* 2002; **123**: 619–631.
- 32 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 401–410.
- 33 Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23130–23140.
- 34 Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* 2004; **23**: 39–48.
- 35 Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1117–1127.
- 36 Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth *in vivo* by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 635–640.
- 37 Fukuda S, Pelus LM. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 2002; **1**: 322–326.
- 38 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; **19**: 3225–3234.
- 39 Mazars GR, Portier M, Zhang XG, Jourdan M, Bataille R, Theillet C et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992; **7**: 1015–1018.
- 40 Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 2077–2084.
- 41 Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15100–15105.

ARTICLE 2 :

La balance entre Survivine et Bim régule la croissance tumorale et corrèle avec le pronostic des patients atteints de MM

Expression ectopique de la survivine dans la lignée de MM XG6

Nucléofection par la méthode Amaxa

L'expression de la survivine corrélant avec la progression de la maladie dans le MM, nous avons voulu évaluer les effets cellulaires de la surexpression de la survivine dans une lignée de MM. La lignée choisie montre un des plus faibles niveaux d'expression de survivine parmi les lignées de MM testées auparavant par western blot. De plus, la croissance *in vitro* de cette lignée est dépendante de l'apport exogène en IL6, un facteur de croissance majeur pour la tumeur myélomateuse. La lignée XG6 se rapproche des plasmocytes primaires dans la moelle osseuse et *ex vivo*, elle constitue donc un bon modèle d'étude.

Comme énoncé précédemment, il est difficile de transfecter les cellules de MM par des méthodes classiques. Nous avons donc utilisé l'électroporation optimisée (développée par *Amaxa biosystems, Allemagne*) aussi appelée nucléofection. Après la mise au point des conditions de transfection, la lignée XG6 a été transfectée par cette méthode avec un plasmide pcDNA3 portant une cassette d'expression comprenant l'ADN complémentaire du gène *survivine*. La transfection avec ce même plasmide, mais dépourvue de cassette d'expression nous sert de contrôle. Cette méthode nécessite un compromis entre l'efficacité de transfection et la viabilité après la transfection. La surexpression de la survivine est visualisée par western blot et semble de niveau correct dans la lignée XG6, mais n'excède pas 72 heures. La mortalité induite par la transfection en elle-même est forte ne permettant aucun test fonctionnel dans ces conditions. Nous avons alors procédé à une double sélection : une sélection par antibiotique (généticine) puis une étape de dilution limite afin d'obtenir des clones surexprimant stablement la survivine ainsi que des clones contrôles.

Résultats

Les fonctions de la survivine étant étroitement liées à sa localisation subcellulaire, nous avons évalué ce paramètre par fractionnement des cellules XG6 surexprimant ou non la survivine. Les fractions nucléaire, mitochondriale et cytoplasmique sont obtenues et leur enrichissement est vérifié par l'expression de marqueur comme la PARP-1, la COX-IV et la tubuline, respectivement. Dans la lignée XG6, les trois fractions révèlent la présence de la survivine. Cependant, la survivine semble principalement localisée dans les fractions nucléaire et cytoplasmique. La survivine surexprimée de façon ectopique conserve un profil similaire dans les clones XG6. En effet, la surexpression de la survivine affecte de façon homogène les différents compartiments subcellulaires testés.

La croissance cellulaire des clones surexprimant ou non la survivine ne montre pas de profonde différence dans des conditions classiques de culture (5% SVF en présence d'IL6). Au contraire, en absence d'apport exogène en IL6, les clones XG6 surexprimant la survivine révèlent une croissance cellulaire avantagee et associée à une survie prolongée et une prolifération maintenue, contrairement aux clones contrôles. L'hypothèse de l'induction d'une boucle autocrine d'IL6 dans les clones surexprimant la survivine a été réfutée par PCR quantitative en temps réel spécifique des ARNm *IL6*, ne montrant pas de modulation de l'expression de ces ARN. La survivine constituerait un oncogène. De plus, seuls les clones surexprimant la survivine induisent la formation de tumeur dans un modèle de souris NOD-SCID en xénogreffe sous cutanée au contraire des clones contrôles et de la lignée parentale. Par la surexpression de la survivine, les clones XG6 échappent à la dépendance en IL6.

En absence d'IL6, la résistance à l'apoptose et l'intégrité de la membrane mitochondriale étant plus efficacement conservée dans les clones XG6 surexprimant la survivine, par rapport aux clones contrôles, nous avons établi un profil d'expression des protéines des familles Bcl-2 et IAP dans ces clones. Seule la protéine Bim est fortement diminuée lorsque la survivine est surexprimée de façon ectopique. De plus, dans les cellules XG6 qui surexpriment la survivine, l'expression de Bim est très faiblement inductible sous l'effet de la privation en IL6. L'expression des autres protéines n'est pas modifiée de façon significative. Le rôle de la protéine pro-apoptotique « BH3-only » Bim est connue pour être impliquée dans la mort des cellules B et des lignées de MM notamment au cours de la privation en IL6, comme cela a été montré par notre équipe. Nous avons donc voulu identifier le mécanisme de la régulation de l'expression de Bim par la survivine dans la lignée XG6. Par PCR quantitative en temps réel, nous avons démontré que la surexpression de la survivine entraînait une diminution de 50% de l'expression des ARNm *bim* dans les clones.

Deux hypothèses peuvent être faites : soit la survivine induit une réduction de la transcription du gène *bim*, soit elle entraîne une diminution de la stabilité des ARNm *bim*. La survivine est probablement impliquée de façon indirecte dans ce mécanisme.

Expression de la survivine et de Bim chez les patients

Profils d'expression génique et PCR quantitative

Au laboratoire, les plasmocytes primaires purifiés à partir de prélèvement de 250 patients de MM au diagnostic ont fait l'objet d'une étude de profil d'expression génique (puces ADN) (Decaux, JCO, sous presse). Cette étude a permis de montrer que moins de 10% des patients expriment la survivine dès le diagnostic. Environ deux tiers de ces patients appartiennent à un groupe de mauvais pronostic caractérisé par une signature de gènes impliqués dans la régulation de la stabilité génétique et le cycle cellulaire dont le gène *survivine*. Le pronostic des patients est déterminé par la survie globale des patients de MM. Dans ce groupe de mauvais pronostic, seulement 40% des patients survivent au delà de 3 ans.

Par PCR quantitative en temps réel spécifique des ARNm survivine, nous avons confirmé le résultat des profils d'expression génique sur le matériel de 22 de ces patients. De plus, nous avons révélé une corrélation inverse significative entre l'expression des ARNm *survivine* et *bim* chez ces mêmes patients de MM au diagnostic. Cette étude sur les cellules myélomateuses primaires appuie fortement la fiabilité de nos observations *in vitro*.

Pour la première fois, nous avons montré une relation entre la survivine et un membre de la famille Bcl-2 dans la lignée XG6 et dans des cellules myélomateuses primaires provenant d'une série de patients. L'expression de la survivine corrèle avec le pronostic des patients probablement en partie par la modulation de l'expression de Bim.

The imbalance between Survivin and Bim mediates tumor growth and correlates with poor survival in patients with multiple myeloma.

Mathilde Romagnoli^{1,2,3}, Céline Séveno^{1,2,3}, Soraya Wuillème-Toumi^{1,2,3}, Martine Amiot^{1,2,3}, Régis Bataille^{1,2,3}, Stéphane Minvielle^{1,2,3}, Sophie Barillé-Nion^{1,2,3}

¹INSERM, UMR 892, 9 quai Moncousu, Nantes F-44093, France

²Nantes Atlantique Universités, Nantes, Cedex, France

³Equipe 5 labélisée Ligue Nationale contre le Cancer 2005

Corresponding author : Sophie Barillé-Nion

UMR 892, 9 quai Moncousu, Nantes F-44093, France

Phone : 33 (0)2 40 08 41 96

Fax : 33 (0)2 40 08 40 82

Email : sbarille@nantes.inserm.fr

Running title : Survivin promotes myeloma growth through Bim repression

Key words : myeloma, Survivin, Bim, IL6-dependence, prognosis

Abstract : 250 words

Text : 4058 words

ABSTRACT

Purpose

High levels of Survivin correlate with disease progression in multiple myeloma (MM) and Survivin knock-down by RNA interference in myeloma cells decreased their growth. Biological effects of Survivin overexpression have been thus evaluated in myeloma cells.

Experimental Design

The human myeloma cell line XG6 that has low endogenous level of Survivin and that depends on exogenous IL6 for its growth, was used to define the effects of Survivin overexpression on myeloma cell growth and apoptosis. Moreover, a cohort of patients with myeloma at diagnosis has been evaluated for Survivin expression in correlation with their risk status.

Results

Survivin overexpression promoted the proliferation and survival of myeloma cell both *in vitro* and *in vivo* in the absence of their major growth factor IL6. The prosurvival effect correlated with the down-regulation of Bim, a BH3-only cell death activator critically involved in cytokine deprivation, mainly at transcriptional level. Moreover, high survivin levels in patients correlated with high-risk disease. The tight link between Survivin and Bim expression, reported for the first time here, was further confirmed in patients with MM and in other human cell lines.

Conclusion

Survivin was validated as a mediator of myeloma cell growth and a significant gene associated with short survival in patients with MM. Our findings provide evidence that Survivin directly contributes to malignant progression of MM and strongly suggest that targeting Survivin may disrupt the delicate balance controlling cell survival and proliferation, opening new avenue for the therapy of this still difficult to treat cancer.

INTRODUCTION

Accumulating evidence suggests that lack of balance between proliferation and cell death may lead to clonal expansion and cancer emergence. In this field, the protein Survivin has attracted great attention because of its involvement in two major cell processes that are often deregulated in cancer, i.e cell division and apoptosis (1). Aberrant expression of Survivin has often been observed in cancer cells and its gene appears at the fourth top tumor-specific gene (2). In one hand, Survivin appeared to be a major mitotic actor with Aurora B kinase, INCENP and Borealin in the chromosomal passenger complex that regulates the right anchorage of chromosomes on mitotic spindle and their proper segregation and it also contributes to the spindle assembly checkpoint required for mitotic progression and cell division (3). In the other hand, Survivin holds a BIR (Baculoviral IAP Repeat) domain that defines the anti-apoptotic IAP (Inhibitors of APoptosis) family, which has first suggested that it may directly inhibit the apoptosis effectors, caspases, as well established for XIAP. However many data indicate that Survivin anti-apoptotic function rather operates through indirect caspase inhibition by various mechanisms not yet completely unravelled (4). The mitochondrial pathway exhibits high importance in cell death control and might be controlled by Survivin. Indeed, recent reports have described, specifically in tumor cells, a pool of Survivin localized in mitochondria that is released in the cytosolic fraction during apoptosis activation and that potently counteracts cell death (5, 6). Moreover, Bcl-2 family proteins have been extensively shown as determinant actors of cell fate through the regulation of mitochondrial permeability that is disrupted during apoptosis (7). Of particular interest, the pivotal role of the pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, Bim in triggering apoptosis especially upon growth factor deprivation has been widely demonstrated (8). This has been particularly evidenced in myeloma cells that display a high dependency on IL6 for their growth (9). But to our knowledge, no link has been yet established between Bcl-2 family proteins and Survivin.

Despite recent progress in the management of patients, multiple myeloma (MM) remains an incurable cancer with a five-year survival rate not exceeding 40% (10). However, this cancer is characterized by an important heterogeneity in outcome following standard and high-dose therapies leading to survival periods spanning from few months to more than ten years. Interestingly, recent gene-expression profiles performed on purified myeloma cells obtained from newly diagnosed patients have defined signatures associated with short survival and were used to identify patients with high-risk MM (11) (12). Of note, overexpression of *survivin* gene was included in both high-risk gene signatures. In addition, we have previously pointed out that in MM, Survivin protein expression correlated to disease progression and that it took part in MM growth by regulating cell cycle and cell death (13). Indeed Survivin knock-down in myeloma cells led to their decreased growth rate and enhanced sensitivity to both spontaneous and drug-induced apoptosis.

In light of all these results, we focused our attention on Survivin overexpression in MM. We first studied biological consequences of forced Survivin expression in the human myeloma cell line (HMCL), XG6, that presents both a low level of endogenous Survivin and a growth-dependence on exogenous interleukin-6 (IL6) that closely mimics *in vitro* the cytokine-dependence observed in patients with MM (14, 15). We show that Survivin overexpression overcomes the *in vitro* IL6-dependence of XG6 cells and promotes tumor growth of myeloma cells in a subcutaneous xenograft model. Importantly, Survivin overexpression in XG6 cell line associated with dramatic decreased level of the pro-apoptotic protein Bim. Evaluation of *survivin* mRNA in a series of patients with MM from our cohort shows that high Survivin expression in myeloma tumors correlates with short survival in patients and reveals a significant inverse correlation between *bim* and *survivin* gene expression in this series of patients.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection and plasma cell purification

Bone marrow specimens from untreated patients were obtained during standard diagnostic procedures in IFM centers and overnight shipped to the Hematology department of University Hospital in Nantes. Plasma cells were obtained after gradient density centrifugation using Ficoll-Hypaque and purification by CD138-immuno-magnetic beads (Miltenyi, Paris, France), as previously described (16). In all cases, purity of the plasma cells was higher than 90%, as assessed by morphology.

Cell lines and culture conditions

The XG6 HMCL have been previously established in our laboratory and are cultured in the presence of 3 ng/ml of recombinant human IL6 (Novartis, Basel, Switzerland) in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FCS, 2mM glutamine and 5×10^{-5} M 2-β mercapto-ethanol. The human embryonic kidney cell line HEK-293 and the human breast cancer cell line CAL51 were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and 2mM glutamine.

Plasmid and transfection experiments

Plasmid encoding for the major isoform of survivin (pcDNA3) was kindly provided by Pr DC Altieri (University of Massachusetts Medical School, MA, USA).

5 µg of plasmid DNA was mixed with $5 \cdot 10^6$ XG6 cell suspension in buffer T, transferred to a 2mm electroporation cuvette and electropected using the electrical protocol A30 of the Amaxa Nucleofector™ apparatus (Amaxa, Cologne, Germany). Three days after transfection, cells were selected by geneticin treatment (350mg/L) and limiting dilutions were performed to obtain clones. Both HEK-293 and CAL51 cell lines were transiently transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following manufacturer's instructions.

Total RNA isolation and amplification

Total RNA extraction were done using the guanidinium thiocyanate-phenol method and purity was verified using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, Palo Alto, CA), as previously described (16). Then, RNA amplification step was performed using MessageAmp™ II aRNA Kit according to manufacturer's specifications (Ambion Inc., Austin, TX, USA) : 0.4-1.0 µg of RNA was used as template to generate cDNA bearing T7 promotor by reverse transcription from which antisens RNA (aRNA) were produced by *in vitro* transcription using MEGAscript technology.

Reverse transcription

For cDNA synthesis, 1µg of total RNA was transcribed using the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexameres (Amersham Biosciences).

Quantitative real-time PCR (quantitative RT-PCR)

Survivin mRNA quantification was performed with TaqMan^R Universal PCR Master Mix and TaqMan^R Gene Expression Assays according to manufacturer's specifications (Applied Biosystems, CA, USA) for *survivin* (Hs00153353_m1) and *RPL37A* (Hs01102345_m1) genes. Human 60S Ribosomal Protein L37A (*RPL37A*) housekeeping gene was used as endogenous control. *IL6* and *bim* mRNA quantification was performed with Sybr^R Green PCR Core Reagent according to manufacturer's specifications (Applied Biosystems). *IL6* primers used were (F): 5'-GGCGCTTGTGGAGAAGGAG-3' and (R): 5'-CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA-3'. *cyclophilin B* housekeeping gene was performed as endogenous control, using the primers (F): 5'-CCCACCGTGTTCTTCGACAT-3' and (R): 5'-CCAGTGCTCAGAGCACGAAA-3'. For *bim*, quantitative RT-PCR has been previously described (17). All samples were performed in triplicate. The relative expression ratio was calculated according to the equation of Pfaffl (18) using the patient with the lowest mRNA level as reference for *survivin* and *bim* genes or the XG6 cell line as reference for *IL6* gene. Quantitative RT-PCR analysis was performed with an Mx4000™ Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene).

Subcellular fractionation

XG6 clones were washed with ice-cold PBS, then incubated in hypotonic buffer (5mM HEPES pH 7.4, 0.025M sucrose, 2mM EDTA, 2μM aprotinin, 0.4mM pefabloc) for 30 min on ice. Cells were disrupted with a dounce homogenizer, the lysate obtained was centrifuged at 500g for 10 min to eliminate the nuclear pellet and unbroken cells. The collected supernatant was centrifuged at 10000g for 15 min to yield the mitochondrias from cytoplasmic extract. Mitochondrias were lysed in lysis buffer as previously described (9). Separation and preparation of nuclear extracts were obtained with the NE-PER^R Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents according to manufacturer's instructions (Pierce).

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as previously described (13). Revelation was performed by standard techniques either with Super Signal detection (West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) using anti-Survivin from R&D systems (Minneapolis, MN, USA) and anti-Noxa from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland) or with ECL detection (Pierce, Rockford, IL, USA) using anti-Mcl-1 (S19) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), anti-Bak, anti-Puma, anti-PARP-1 from Calbiochem (Darmstadt, Germany), anti-XIAP, anti-cIAP-1, anti-cIAP-2, anti-Bcl-x_L, anti-Bad from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), anti-Bcl-2 from Dako (Trappes, France), anti-Actin, anti-Bim from Chemicon International (Temecula, CA, USA), anti-Tubulin from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA), anti-CoxIV from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and anti-Bax from Immunotech (Marseilles, France). Protein loading was controlled with anti-Actin.

Cell growth experiments

After two washes in PBS, XG6 clones were seeded in 48-well plate at 5.10⁴ cells per well without rhIL6 for 8 days. Growth curves were plotted based on the number of viable cells as determined by eosin exclusion.

Tritiated ([³H]) thymidine incorporation assay

After two washes in PBS, XG6 clones were seeded in 96-well plate in triplicate at 10^4 cells per well without rhIL6 for 72h. Cells were pulsed with 1 μ Ci of [3 H]thymidine during the last 8h of culture, harvested onto glass filters with an automatic cell harvester (Perkin Elmer), and the uptake of [3 H]thymidine was monitored using a 1450 Microbeta Jet beta counter (Perkin Elmer). These experiments were done thrice and a mean $\pm$ SD of inhibition was presented.

Apoptosis experiments

After two washes in PBS, XG6 clones (10^6 cells/well) were cultured in 6-well plates without rhIL6 for 8 days. Viability of clones was assessed by flow cytometry analysis with AnnexinV-FITC/Propidium Iodure kit (Beckman Coulter, Marseilles, France) thrice a week. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the CELLQuest program (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Subcutaneous xenograft model in NOD/SCID mice

Four to 8-week old nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and were housed and monitored at the core facility of the INSERM UMR601. This facility is approved by the French Association for Accreditation of Laboratory Animal Care and is maintained in accordance with the regulations and standards of the INSERM institute and the French Department of Agriculture. Mice (n=22) were inoculated subcutaneously (s.c.) into the right flank with 2×10^7 cells in 100 μ l of RPMI-1640. Caliper measurements of the longest perpendicular tumor diameters were done every week to estimate the tumor volume, using the following formula: $4\pi/3 \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$, representing the three dimensional volume of an ellipse. Animals were sacrificed when their tumors reached 2cm or when the mice became moribund.

Statistical analysis

For statistical analysis, we used the non-parametric Mann-Whitney test for mice experiments and for *survivin* mRNA expression in patients. The non-parametric Spearman test was used to evaluate correlation between *survivin* and *bim* mRNA in patients.

RESULTS

Characterization of Survivin overexpression in the human myeloma cell line XG6.

We recently observed that high expression of Survivin protein in primary myeloma cells correlated with disease progression (13). In order to investigate the role of Survivin overexpression in myeloma cells, the DNA coding for the human dominant isoform of Survivin or the corresponding empty vector, were introduced in the HMCL XG6 by nucleofection. This cell line was chosen because of its low basal level of Survivin expression among HMCLs and its dependency on exogenous IL6 for its growth (19).

XG6 subclones were selected and 3 Survivin overexpressing clones (Survivin clones : S2, S4 and S15) and 3 empty vector containing clones (Control clones : C3, C6 and C7) were used for further studies. Survivin expression in clones was first assessed at protein level by immunoblot analysis as shown in figure 1. Survivin levels were highly and homogeneously increased in the 3 Survivin clones compared to Control clones and reached those observed in the highest survivin expressing HMCLs (13). As Survivin could be detected in various subcellular compartments in correlation with its function, we wondered whether the overexpressed Survivin might be preferentially located in the cell. Immunoblot analysis after subcellular fractionation showed that overexpressed Survivin localized in nuclear, mitochondrial and cytoplasmic enriched fractions in the same proportions as in Control clones, indicating that ectopic Survivin was distributed as endogenous Survivin in the cell.

Survivin overexpression promoted IL6 dependence escape in the HMCL XG6.

We then evaluated the effect of Survivin overexpression on XG6 clones growth rates in the absence of exogenous IL6. As previously described for the parental cell line XG6, Control clones could not grow in the absence of IL6 (19). In contrast, Survivin clones maintained their capacity to grow in IL6-deprived culture conditions (Figure 2A), even for longer period. Survivin acting in both cell proliferation and cell death processes, we then attempted to dissect its effect during IL6 withdrawal. We first observed that Survivin overexpression allowed a high rate of proliferation using H³-

thymidine incorporation assay, in contrast to Control clones which almost stopped proliferating (Figure 2B). This activating effect of Survivin on cell proliferation in the absence of IL6 was confirmed by immunoblot analysis of the retinoblastoma protein (Rb) that undergoes phosphorylation when cells enter in the cell cycle. Indeed phosphorylated Rb was detected in Survivin clones after 48h of IL6 withdrawal and not in Control clones (supplemental data, Figure S1). We then evaluated whether Survivin might protect clones from apoptosis triggered by IL6 withdrawal. Data presented in figure 2C clearly indicate that Control clones died over 5 days in absence of exogenous IL6, in contrast to Survivin clones which maintained their viability. The absence of caspase-3 cleavage in Survivin clones further confirmed the absence of activation of apoptotic cascade in Survivin clones cultured without IL6 in contrast to Control clones (supplemental data, Figure S2). According to these results, Survivin clones acquired the capacity to proliferate and survive *in vitro* in the absence of exogenous IL6, in the opposite to Control clones that died by apoptosis. In attempt to identify the mechanisms involved in the acquired autonomous growth of Survivin clones, we looked for a potential induction of autocrine IL6 loop in these clones. Quantitative RT-PCR analysis indicated that *IL6* mRNA levels were equivalent in Survivin and Control clones. In the opposite, the human myeloma cell line U266 already known for its autocrine IL-6 production (20), displayed a high level of IL6 mRNA (Figure 2D). Moreover, decreased sensitivity to AG490, an inhibitor of the IL6-activated JAK2/STAT-3 pathway, in Survivin clones compared to Control clones or parental cell line functionally confirmed these observations (supplemental data, Figure S3). These data definitively argue against an autocrine IL6 loop appearing in Survivin clones.

Survivin clones developed tumors in the murine myeloma xenograft model.

XG6 clones were injected into the NOD/SCID mice to study their capacity to induce tumor *in vivo*. Mice were injected subcutaneously in the right flanks either with Control clones or Survivin clones. Tumor growth was monitored every week and tumor volumes were evaluated by caliper measurement of the perpendicular longest diameters. Of major interest, only mice injected with Survivin clones (n=10)

developed a measurable tumor after a mean of 6.2 (4 to 8) weeks (Figure 3). In contrast, no tumor could be detected in mice (n=12) injected with Control clones during the experiment (20 weeks), as observed for the parental cell line XG6. The human CD138 immunostaining demonstrated that tumoral cells were indeed human myeloma cells (data not shown). Therefore, these results demonstrated that Survivin overexpression conferred tumorigenic potential to XG6 clones.

Survivin modulated the proapoptotic Bim expression.

We then focused on mechanisms involved in anti-apoptotic functions of Survivin revealed during IL6 deprivation. We first observed a significant mitochondrial depolarization using JC-1 dye in IL-6-deprived Control clones in contrast to Survivin clones (supplemental data, Figure S4). We then screened XG6 clones for their expression in pro- and anti-apoptotic proteins of both Bcl-2 and IAP families. Interestingly, we evidenced that Survivin clones displayed much lower basal level of the pro-apoptotic protein Bim in its three major isoforms (Figure 4A). In contrast, the expression of other Bcl-2 family proteins either anti-apoptotic members, i.e. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 or apoptotic effectors, i.e. Bax, Bak, or pro-apoptotic BH3-only members Bad, Puma, Noxa, remained unchanged, as well as IAP proteins i.e. XIAP, cIAP-1, cIAP-2. Importantly, we further demonstrated by quantitative RT-PCR that the strong Bim decreased expression in Survivin clones was mainly linked to transcriptional repression of its gene expression, since *bim* mRNA level was reduced by half in Survivin clones compared to Control clones (Figure 4B). We then evaluated Bim levels in IL6 withdrawn clones. As expected, in the absence of IL6, Bim protein increased in both Control clones and Survivin clones. Nevertheless, without IL6, Bim levels remained largely lower in Survivin clones than in Control clones. These data indicate that Survivin repressed Bim expression in myeloma cells at least through transcriptional regulation and limited the induction of Bim expression during IL6 deprivation. Bim repression by Survivin has been also evaluated in the human embryonic kidney cell line HEK-293 and in the breast cancer cell line CAL51. Importantly, as shown in figure 5, Survivin overexpression in these cells led to the decreased Bim expression indicating that this effect was not cell type-restricted.

High survivin gene expression correlated with short survival and low levels of bim gene expression in patients with MM.

Given that Survivin overexpression appeared to favor myeloma cell growth, we examined whether Survivin expression had a poor prognostic impact in patients with MM. A comprehensive analysis of gene expression profiles (GEP) performed in CD138 selected myeloma cells from a cohort of 250 newly diagnosed patients with MM, allowed us to identify significant genes elevated in a high-risk group of patients defined by early disease-related death (11). We observed that this high risk enriched gene-signature contained a large array of genes involved in the mitotic network activity, including *survivin*. To confirm this result, we performed quantitative RT-PCR in a subgroup of patients predicted either at low-risk (n=10) or high-risk (n=12) to quantify *survivin* gene expression in myeloma cells from these patients. This analysis revealed that *survivin* mRNA was significantly upregulated in the high risk group compared to the low risk group ($p < 0.01$) (Figure 6A), thus comforting the role of Survivin in the aggressiveness of the disease. Furthermore, in these patients, *bim* gene expression was also evaluated. It appeared that *survivin* and *bim* gene expressions were inversely correlated with significant parameters ($r = -0.47$, $p = 0.026$) (Figure 6B). These results strongly corroborate our results obtained in the HMCL XG6 showing decreased Bim levels when Survivin was aberrantly expressed.

DISCUSSION

Our present results indicate that Survivin might play a critical role in MM biology. Indeed, we demonstrate here that Survivin overexpression contributes to myeloma cell growth and survival both *in vitro* in the absence of their major growth factor IL6 and *in vivo* in NOD/SCID mice. Of major interest, we found out, for the first time, that Survivin overexpression in various cell types associates with a low level of Bim, the major pro-apoptotic factor involved in cytokine deprivation. Finally high expression of Survivin in patients with MM correlates with high-risk disease defined by short survival in a cohort of patients with MM at diagnosis and the inverse correlation between Survivin and Bim expressions was confirmed in this cohort.

Our results provide evidence that Survivin overexpressing XG6 clones acquired the capacity to proliferate and to survive *in vitro* in the absence of exogenous IL6, in contrast to Control clones or the parental cell line, demonstrating that Survivin overexpression overcame the IL6 dependence of these cells for their growth. Moreover, quantitative RT-PCR experiments clearly indicate that *IL6* mRNA levels were unchanged in Survivin clones compared to Control clones, thus arguing against the induction of an IL6 autocrine loop in these cells. The transition from IL6 dependent state to IL6 independent state is an important step in the malignant progression in MM (21, 22) and unravelling the molecular mechanisms involved in this process is of major interest. Our results suggest that Survivin may participate in this process. Indeed, we previously showed that Survivin knockdown by RNA interference in XG6 led to cell accumulation in G1 cell cycle phase (13), and our present results strongly indicate that Survivin overexpression allowed the G1/S transition in the absence of IL6. In line with these data, Suzuki *et al* demonstrated that Survivin might play an important role in early cell cycle entry by activating both Cdk4/cyclinD and Cdk2/CyclinE complexes linked to the release of their respective inhibitors p21^{Waf1} and p16^{INK4a} from these complexes (23). Of note, activated mutants of the oncogene Ras were also able to induce IL6-independent myeloma cell growth (24). Since Ras mutants deregulate Survivin expression (25), it is tempting to hypothesize that Ras status may interfere with IL6 dependence control via Survivin.

These aspects are under investigation in our model. Importantly, we further demonstrate that forced expression of Survivin into myeloma cells contributed to tumor development in an *in vivo* NOD/SCID xenograft model. This effect may be related to the acquired IL6 independent status of Survivin clones because only IL6-independent HMCLs led to tumor formation in this model (personal data). Survivin overexpression has been yet involved in other models of stepwise carcinogenesis in tissue-specific *survivin* transgenic mice (26-28).

Furthermore, our results indicate that Survivin protects myeloma cells from apoptosis induced by IL6 deprivation through the regulation of the pro-apoptotic protein Bim. Indeed, we observed that Survivin overexpression led to the strongly decreased expression of Bim in various cell lines, mainly by downregulation of its gene transcription. Many reports have demonstrated the pivotal role of Bim in apoptosis triggering by cytokine deprivation in various cells (8, 29), especially in B lymphocytes in which Bim functions as a tumor suppressor (30) and whose deficiency cooperates with oncogenes such as c-Myc in leukemogenesis (31). In MM, our laboratory has already highlighted the main role of Bim in controlling myeloma cell apoptosis especially upon IL6 withdrawal (9). Moreover, reduced Bim levels in myeloma cells showed significant reduction in sensitivity to apoptosis (32). For the first time, our present data obtained in *in vitro* experiments and confirmed in tumors from patients, argue for a link between Survivin level and *bim* transcription, highlighting that Survivin participates in apoptosis control upstream of the mitochondria. Many transcription factors, i.e. FoxO3A, AP-1, Myb, CHOP, SMAD4 or oncogenes such as c-Myc or E2F1 modulate *bim* gene expression (31, 33-36). Moreover, a molecular mechanism based on decreased *bim* mRNA stability cannot be excluded. Actually, Matsui *et al* described a chaperone/cochaperone complex involving the Heat-Shock Cognate Protein 70 (Hsc70) appearing to be critical in *bim* mRNA stabilization (37). Two recent reports also incriminate various microRNA regulating *bim* expression (38, 39). Further experiments are currently performed to define which factors might be involved in the regulation of *bim* mRNA by Survivin. Interestingly, we also show here that myeloma cells do express Survivin in the mitochondrial compartment that appeared to be the most cytoprotective (5, 6). This

may also contribute to counteract apoptotic pathway triggered by various stimuli such as IL6 withdrawal, as observed in Survivin clones.

Finally, we recently found by gene expression profiling analysis performed on 250 newly diagnosed patients with MM treated with high dose-therapy, that a significant gene set including *survivin*, was overexpressed in high risk patients characterized by short survival (11). Our present results indeed demonstrate that Survivin overexpression in MM cells tightly correlates with short survival in patients. Thus we assume that Survivin level correlates with poor prognosis and might be considered as a prognosis factor in MM. Our results corroborate those of Zhan *et al* (12) who defined a high-risk gene signature including *survivin* gene linked to early disease-related death in newly diagnosed patients (40). High Survivin expression in cancer cells results from various pathways including oncogenes and/or signalling pathways deregulation as well as epigenetic events depending on cell types (4). In our opinion, it would be of particular interest to unravel the mechanisms driving *survivin* gene deregulation in myeloma cells. Finally, the inverse expression levels of *survivin* and *bim* expressions in myeloma tumors should deserve great attention to define the delicate balance between pro- and anti-apoptotic proteins that probably dictate cell demise in MM.

Altogether, these data highlight the major role of Survivin in tumor progression that may be related to its capacity to enhance cell cycle entry in tumoral cells and to promote their survival in the absence of their growth factor, allowing accumulation of genetic errors that is a hallmark of cancer cells (41) and of particular importance in myeloma cells that display high genetic instability (42, 43).

On the basis of all these results, targeting Survivin might be particularly attractive for new anti-myeloma interventions. Survivin antagonists currently in development such as antisense oligonucleotides or small molecules akin to shepherdin (44) or YM155 (45), should get substantial attention in MM and progress in the coming years in cancer therapy.

REFERENCES

1. Li F, Ambrosini G, Chu EY, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-4.
2. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, *et al.* Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999;23:387-8.
3. Ruchaud S, Carmena M, and Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:798-812.
4. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008;8:61-70.
5. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, and Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114:1117-27.
6. Dohi T, Xia F, and Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* 2007;27:17-28.
7. Youle RJ. and Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:47-59.
8. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286:1735-8.
9. Gomez-Bougie P, Bataille R, and Amiot M. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol* 2004;34:3156-64.
10. Richardson P, Mitsiades C, Schlossman R, *et al.* The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:317-23.
11. Decaux O, Magrangeas F, Charbonnel C, *et al.* Prediction of survival in multiple myeloma based on gene-expression profiles revealed cell cycle chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients. *J Clin Oncol* 2008;*In press*.
12. Zhan F, Huang Y, Colla S, *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2020-8.
13. Romagnoli M, Trichet V, David C, *et al.* Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia* 2007;21:1070-8.
14. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, *et al.* Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988;332:83-5.
15. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, *et al.* Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989;73:517-26.
16. Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H, *et al.* Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood* 2003;101:4998-5006.
17. Wuilleme-Toumi S, Trichet V, Gomez-Bougie P, Gratas C, Bataille R, and Amiot M. Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:865-9.
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
19. Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, *et al.* Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 1994;83:3654-63.
20. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, *et al.* Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* 2002;99:2172-8.
21. Rawat R, Rainey GJ, Thompson CD, Frazier-Jessen MR, Brown RT, and Nordan RP. Constitutive activation of STAT3 is associated with the acquisition of an interleukin 6-independent phenotype by murine plasmacytomas and hybridomas. *Blood* 2000;96:3514-21.
22. Kuehl WM and Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2:175-87.
23. Suzuki A, Hayashida M, Ito T, *et al.* Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000;19:3225-34.

24. Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, LeBien TW, and Van Ness B. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res* 1995;55:3640-6.
25. Sommer KW, Rodgarkia-Dara CJ, Schreiner C, Holzmann K, Krupitza G, and Cerni C. Oncogenic c-H-ras deregulates survivin expression: an improvement for survival. *FEBS Lett* 2007;581:4921-6.
26. Allen SM, Florell SR, Hanks AN, *et al.* Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer Res* 2003;63:567-72.
27. Salz W, Eisenberg D, Plescia J, *et al.* A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior. *Cancer Res* 2005;65:3531-4.
28. Thomas J, Liu T, Cotter MA, *et al.* Melanocyte expression of survivin promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. *Cancer Res* 2007;67:5172-8.
29. Zantl N, Weirich G, Zall H, *et al.* Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* 2007;26:7038-48.
30. Ewings KE, Wiggins CM, and Cook SJ. Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle* 2007;6: 2236-40.
31. Egle A, Harris AW, Bouillet P, and Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6164-9.
32. Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, and Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007;117:112-21.
33. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, and Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 2000;10: 1201-4.
34. Biswas SC, Shi Y, Sproul A, and Greene LA. Pro-apoptotic Bim induction in response to nerve growth factor deprivation requires simultaneous activation of three different death signaling pathways. *J Biol Chem* 2007;282:29368-74.
35. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007;129:1337-49.
36. Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, and Downward J. Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene* 2007;26:970-81.
37. Matsui H, Asou H, and Inaba T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* 2007;25: 99-112.
38. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008;9:405-14.
39. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, *et al.* E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008;13:272-86.
40. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, *et al.* A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109:2276-84.
41. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
42. Bergsagel PL and Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:6333-8.
43. Magrangeas F, Lode L, Wuilleme S, Minvielle S, and Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* 2005;19:191-4.
44. Plescia J, Salz W, Xia F, *et al.* Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7:457-68.
45. Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, *et al.* YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 2007;67:8014-21.

Acknowledgments

We gratefully thank Catherine David for her help in xenograft model, Loic Campion for statistical analysis, Dr DC Altieri (University, ML) for providing us pcDNA3 *survivin* and Philippe Juin for helpful discussion.

Financial support

This work has been supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labélisée 2005). Céline Séveno is supported by the french National Institute of Cancer (INCA).

Conflict of interest disclosure

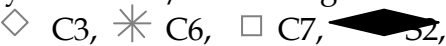
The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Survivin overexpression and localization in XG6 clones

(A) Survivin expression was assessed by western blotting analysis in XG6 parental cell line, XG6 Control clones (C3, C6 and C7) and XG6 Survivin clones (S2, S4 and S15). Protein loading was controlled with anti-actin mAb. (B) Survivin localization was evaluated by western blotting after subcellular fractionation of C3 Control clone and S2 Survivin clones. Enrichment of fractions was verified by expression of PARP-1 for nuclear fraction, COX IV for mitochondrial fraction and tubulin for cytoplasmic fraction.

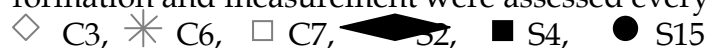
Figure 2: Survivin promoted IL6-dependence escape

XG6 clones were studied in absence of exogenous IL6 for (A) their cell growth by eosin-counting over 8 days, (B) their proliferation by [³H] thymidine incorporation assay and (C) their apoptotic index by annexinV/PI staining over 8 days and analysis by flow cytometry. In (A) and (B) :  C3, * C6, □ C7,  S2, ■ S4, ● S15

Results were reproduced three times in independent experiments and a representative one is presented. (D) Quantification of *IL6* mRNA was performed by quantitative RT-PCR in XG6 parental cell line, XG6 Control clones (C3, C6 and C7) and XG6 Survivin clones (S2, S4 and S15). U266 was a positive control. Results were presented as representative experiment (n=3).

Figure 3: Survivin conferred tumorigenicity to XG6 clones

XG6 parental cell line, XG6 Control clones (C3, C6 and C7) and XG6 Survivin clones (S2, S4 and S15) were inoculated subcutaneously in NOD/SCID mice. Tumor formation and measurement were assessed every week for 20 weeks.

 C3, * C6, □ C7,  S2, ■ S4, ● S15

The Wilcoxon statistical test was used.

Figure 4: Bim expression was decreased in Survivin clones mainly through transcriptional repression

(A) Expression of Bcl-2 and IAP families were investigated by western blotting analysis. The pro-apoptotic BH3-only Bim protein was decreased in Survivin clones both in basal condition **(A)** and in IL6 deprivation condition **(C)** compared to Control clones. **(B)** Quantification of mRNA *bim* was performed by RT-qPCR in XG6 parental cell line, XG6 Control clones (C3 and C6) and XG6 survivin clones (S2 and S4). Results were reproduced three times in independent experiments and the mean $\pm$ SD is presented.

Figure 5: Survivin overexpression led to low Bim level in non myeloma cell lines

Transient Survivin overexpression was performed in the human embryonic HEK-293 and the breast cancer CAL51 cell lines. Survivin and Bim levels were assessed by immunoblot analysis.

Figure 6:

(A) High survivin expression significantly correlated to high-risk MM

Quantification of *survivin* mRNA was performed by quantitative RT-PCR in 22 patients with MM at diagnosis. Survivin related expression corresponds to a ratio with RPL37A housekeeping gene. The Mann-Whitney statistical test was used.

(B) Survivin and bim expression inversely correlated in patients with MM

Quantification of *bim* mRNA was performed by quantitative RT-PCR in 22 patients with MM at diagnosis. Bim related expression correspond to a ratio with *cyclophilin* housekeeping gene. Correlation curve shows *bim* and *survivin* related expressions for each patient. The Spearman statistical test was used.

Figure 1

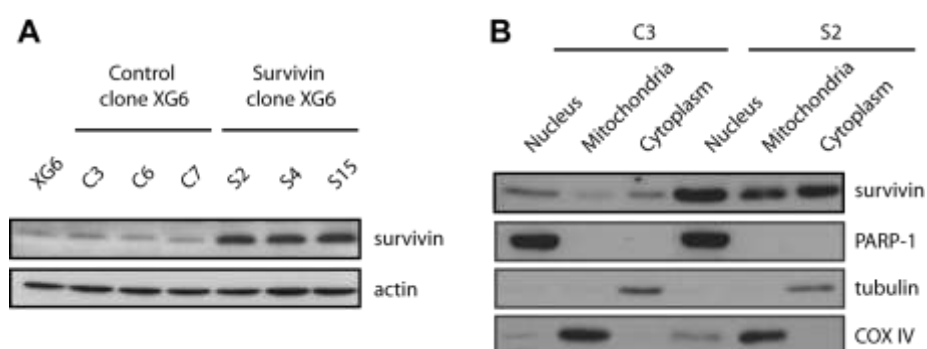


Figure 2

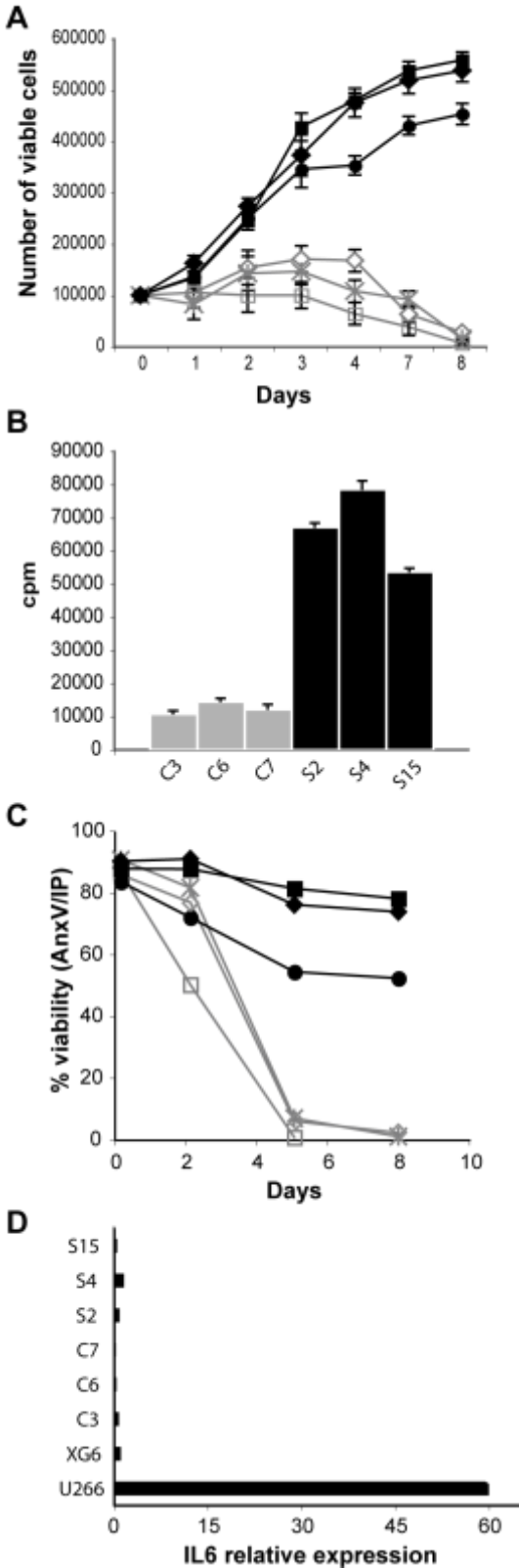


Figure 3

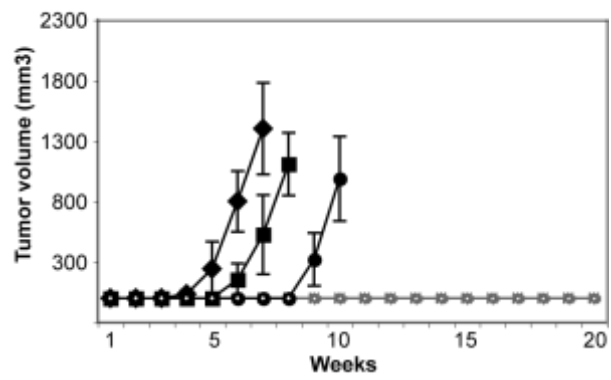


Figure 4

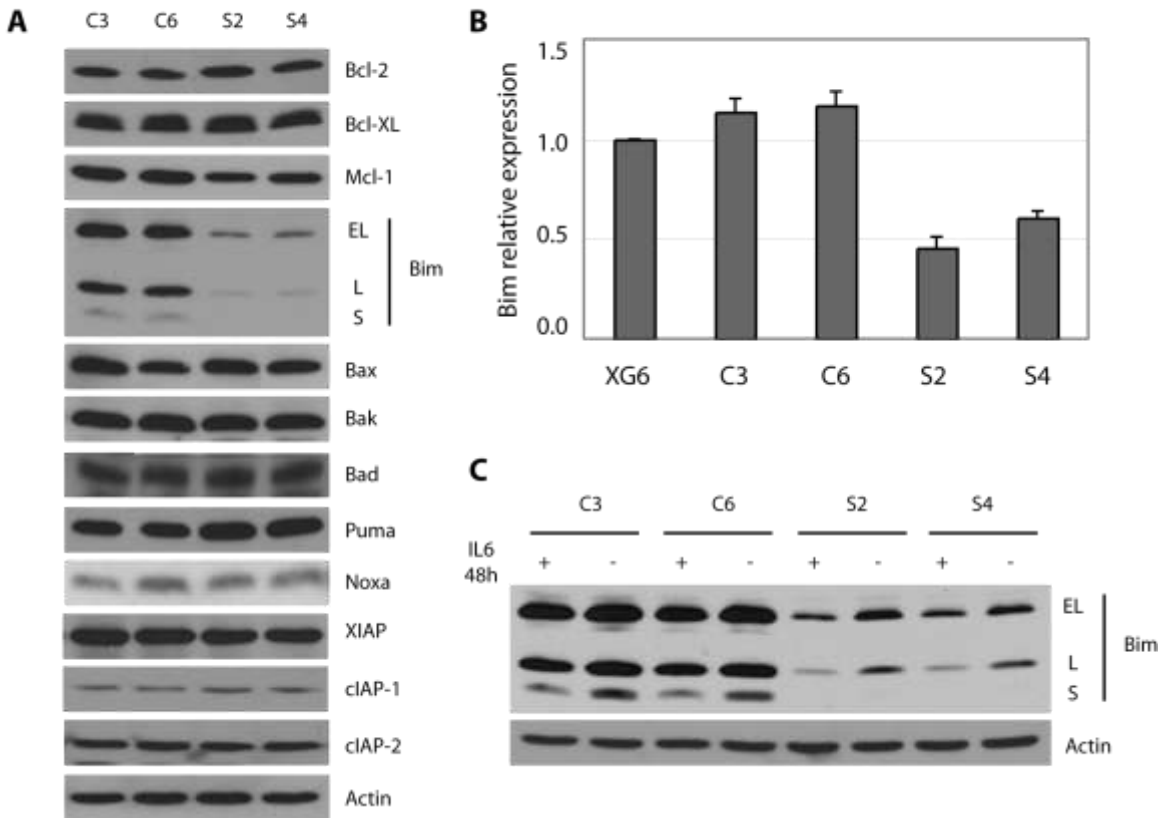


Figure 5

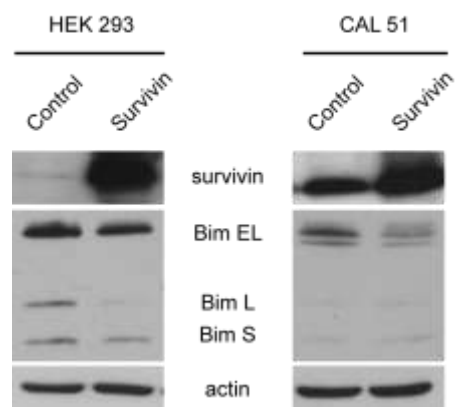
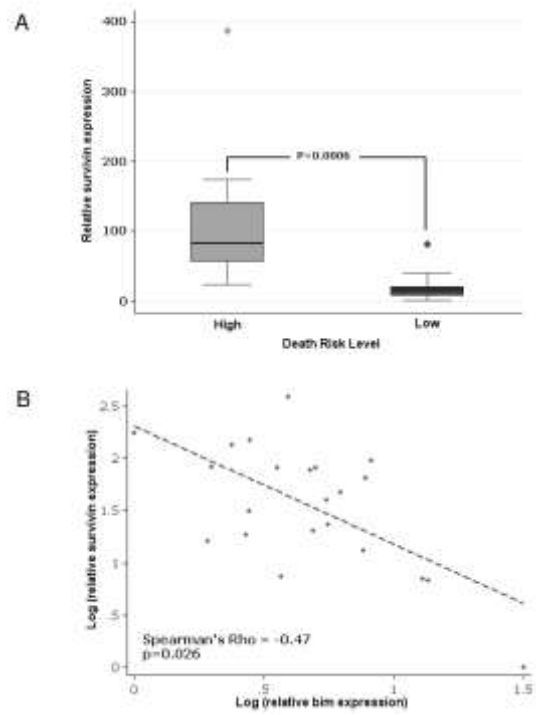


Figure 6



SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Phosphorylated Rb was maintained in IL6-deprived Survivin clones

By western blotting analysis, phosphorylated Rb (P-Rb) protein level (antibody anti-S807/811 P-Rb from Cell Signalling) was assessed in Survivin and Control clones after 48 h of culture with or without IL6. Only Survivin clones maintained a stable level of P-Rb after 48 h of IL6-deprivation in contrast to Control clones.

Figure S2: Cleaved Caspase-3 was undetectable in IL6-deprived Survivin clones

By western blotting analysis, Caspase-3 cleavage (antibody E-8 from Santa Cruz Biotechnology Inc.) was assessed in Survivin and Control clones after 48 h of culture with or without IL6. In contrast to Control clones, Survivin clones didn't show cleaved Caspase-3 after 48 h of IL6-deprivation.

Figure S3: Survivin clones were more resistant than Control clones to AG490 treatment

By flow cytometry analysis, the % of apoptotic cells was assessed by Apo2.7 staining (Immunotech) of Survivin and Control clones after 24h of culture with 50µM of AG490 (Alexis).

Figure S4: Mitochondrial integrity was preserved in IL6-deprived Survivin clones

By flow cytometry analysis, mitochondrial depolarisation was assessed by JC-1 staining (Calbiochem) in Survivin and Control clones after 72h of culture with (empty histogram) or without IL6 (full histogram). JC-1 is a dye that can be used as an indicator of mitochondrial depolarisation that is visualized by a decrease in red fluorescence intensity. 10⁶ cells are incubated for 20 min at 37°C with JC-1 at 5µg/ml in Hank's balanced salt solution.

Figure S1

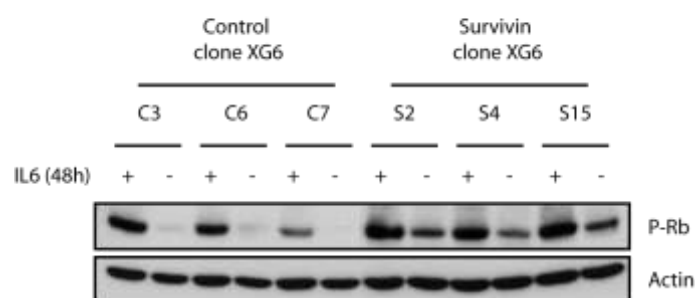


Figure S2

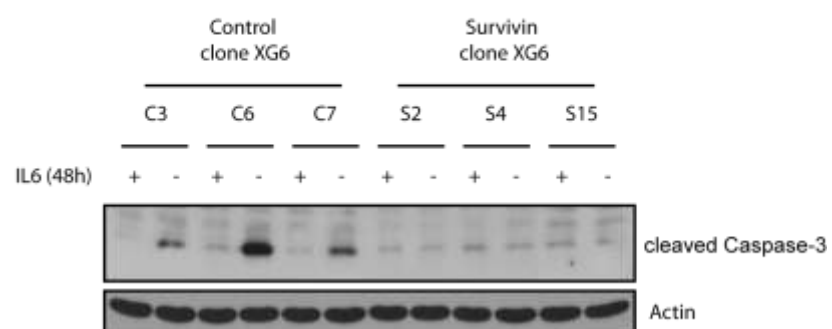


Figure S3

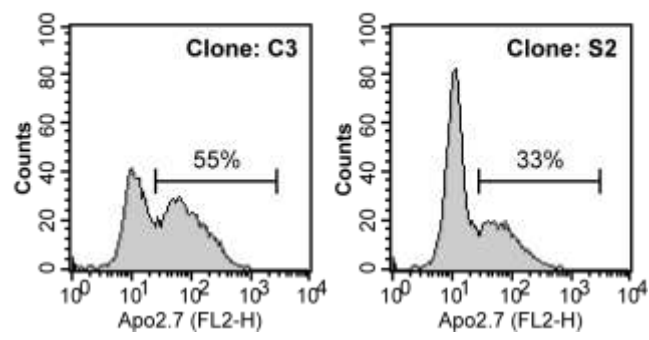
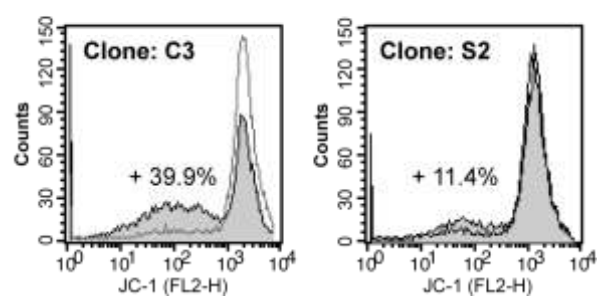


Figure S4



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Expression de la protéine survivine dans le MM

L'étude descriptive de l'expression de la protéine survivine dans le MM fournit plusieurs informations quant à l'implication de cette protéine dans la pathogenèse myélomateuse. Tout d'abord, toutes les lignées cellulaires de MM expriment la protéine survivine à un niveau détectable et similaire à celui observé dans des lignées de cancers connues pour surexprimer la survivine. Dans les tissus sains chez l'adulte, l'expression de la survivine est restreinte aux cellules proliférantes (Xia and Altieri 2006). Cependant, à taux de prolifération similaire, les lignées de MM montrent des niveaux plus élevés de leur expression de survivine en comparaison avec les lymphocytes B non tumoraux infectés *in vitro* par le virus EBV. La même observation est faite entre les plasmocytes primaires de patients en rechute et les plasmocytes polyclonaux provenant d'une plasmocytose réactionnelle ou obtenus par génération *in vitro* à partir de lymphocytes B mémoire d'amygdale. L'expression de la survivine n'est donc pas simplement le reflet du taux de prolifération cellulaire, mais également liée à la malignité intrinsèque du MM. Ensuite, d'après l'analyse de l'expression de la survivine dans les plasmocytes purifiés à partir des prélèvements de patients, nous avons montré que son niveau d'expression dans le MM corrélait avec la progression de la maladie. D'ailleurs, un patient ayant été prélevé au moment du diagnostic puis de la rechute illustre l'augmentation de l'expression de la survivine (d'un facteur 3) entre ces deux étapes. D'après cette étude, il semble que les cellules primaires de MM au diagnostic expriment la survivine à des niveaux faibles voire indétectables par cette technique. Néanmoins, le nombre de patients inclus dans cette étude est restreint. Les plus forts niveaux d'expression de la survivine sont observés dans les cellules myélomateuses obtenues à partir de prélèvements extramédullaires et les lignées de MM qui sont presque exclusivement établies à partir de tels prélèvements. L'expression de la survivine dans le MM augmente donc avec l'aggravation de la maladie.

L'étude du transcriptome des plasmocytes primaires de 250 patients de MM au diagnostic, réalisée au laboratoire, a permis d'approfondir notre compréhension de la dérégulation de l'expression de la survivine dans le MM. D'après cette étude, moins de 10% des patients expriment la survivine dès le diagnostic. De façon intéressante, les deux tiers de ces patients font partie d'un groupe de mauvais pronostic défini par une survie globale écourtée (moins de 3 ans) et caractérisé par une signature de gènes impliqués dans la régulation de la stabilité génétique et le cycle cellulaire (Decaux, JCO, sous presse). Une étude similaire sur une plus grande cohorte détermine un classement des patients de MM selon sept groupes identifiables par leur signature moléculaire. Le groupe de plus mauvais pronostic est associé à un index de prolifération élevé et caractérisé par la surexpression de

gènes que nous retrouvons pour la plupart dans notre set de gènes impliqués dans la régulation de la stabilité génétique, c'est le cas du gène *survivine* (Zhan et al. 2006). Nos travaux indiquent que l'expression de la survivine montre une hétérogénéité dans le MM. Elle peut être présente dès le diagnostic où elle pourrait jouer un rôle dans l'oncogenèse initiale et accélérer le processus évolutif de la tumeur (survie écourtée et chimiorésistance). Néanmoins, dans la majorité des cas, la dérégulation de son expression semble intervenir dans l'évolution de la maladie, comme c'est le cas pour les oncogènes Ras et c-Myc ou encore le suppresseur de tumeur p53. D'ailleurs, ces différents facteurs sont impliqués dans la dérégulation de l'expression de la survivine dans d'autres modèles de cancers (Cosgrave et al. 2006) (Sarthý et al. 2007) (Raj et al. 2008). L'étude des causes de l'expression aberrante de la survivine dans le MM serait certainement utile pour mieux comprendre la pathogenèse de cette tumeur. Il serait intéressant de déterminer la participation de Ras, c-Myc et p53 dans l'expression de la survivine chez patients de MM. Dans nos lignées, seul le statut p53 semble corrélé avec le niveau d'expression de la survivine. Aucune corrélation avec le type de translocation impliquant le locus IGH n'a pu être mise en évidence. Le gène *survivine* ayant un promoteur riche en CG, son statut de méthylation serait également à expertiser (Li and Altieri 1999). Des mécanismes moléculaires impliquant notamment la méthyltransférase DNMT1 (« DNA methyltransferase ») dans la répression de la transcription du gène *survivine* par p53 sont maintenant bien décrits (Esteve et al. 2005; Esteve et al. 2007).

L'étude par cytométrie en flux est particulièrement adaptée à l'étude des hémopathies malignes car elle permet d'éviter l'étape souvent limitante de purification des cellules tumorales. Le nombre de prélèvements analysables serait alors plus important et permettrait d'analyser l'expression de la protéine survivine en fonction de l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur. Par exemple, il serait intéressant d'expertiser son niveau d'expression selon l'expression du CD45 qui sépare la tumeur myélomateuse en deux compartiments : le compartiment CD45⁺ correspond à la fraction la plus proliférante et sensible aux traitements, tandis que le compartiment CD45^{neg/faible} constitue une fraction moins proliférante, mais plus chimiorésistante (Bataille et al. 2003). Sa prédominance dans l'un ou l'autre de ces deux fractions pourrait nous aider à comprendre plus précisément son rôle dans l'évolution de la tumeur. Cependant, nous n'avons pas pu réaliser cette étude car nous avons rencontré des obstacles techniques par un manque de sensibilité de l'anticorps commercialisé pour sa détection par cytométrie en flux.

La compartimentation subcellulaire apparaît être un élément crucial dans la fonction de la survivine. L'étude de sa localisation subcellulaire au sein de plasmocytes primaires par

immunofluorescence ou immunohistochimie permettrait d'évaluer ce paramètre. Des résultats préliminaires en immunohistochimie montrent que les biopsies ostéomédullaires d'une série de 9 patients montrent tous une expression tumorale de la survivine. En moyenne, 40% des plasmocytes tumoraux de ces biopsies expriment la survivine, celle-ci est presque exclusivement localisée dans le cytoplasme (Collaboration avec N. Giuliani, Parme, Italie). Cependant, une étude similaire en immunohistochimie incluant 11 patients de MM révèle que seules les deux tiers des biopsies ostéomédullaires présentent une expression de la survivine et que celle-ci se trouve majoritairement dans le noyau des plasmocytes malins (Grube et al. 2007). Ces résultats divergents peuvent probablement être expliqués par l'utilisation d'anticorps différents pour ces deux études, comme cela avait été évoqué par Li (Li et al. 2005a). Une plus grande série de patients devra aussi être analysée pour conclure à ce sujet.

Rôle de la survivine dans la croissance de la tumeur myélomateuse

L'expression de la survivine est associée à l'évolution de la maladie et à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MM. Afin d'identifier l'implication de la survivine dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la tumorigénicité ou la chimiorésistance, nous avons développé des outils permettant la modulation de son expression et l'étude de ses conséquences fonctionnelles. Deux stratégies ont été mises au point : la diminution de son expression par ARN interférence au moyen d'une méthode lentivirale et la surexpression de son expression par la technique de nucléofection. La forte apoptose spontanée des plasmocytes primaires *ex vivo* exclut la faisabilité de ces techniques sur de telles cellules. Les lignées de MM ont donc été utilisées pour l'étude fonctionnelle de la survivine.

La diminution de l'expression de la survivine par ARN interférence dans deux lignées de MM (XG1 et XG6) entraîne une réduction de leur croissance cellulaire associée à une apoptose spontanée et un arrêt dans leur cycle cellulaire. Les deux lignées de MM utilisées expriment un niveau basal différent en survivine, XG6 exprimant plus faiblement la survivine que XG1. Leur expression est diminuée de moitié par ARN interférence. La réduction de l'expression de la survivine inhibe la croissance cellulaire et la survie dans les deux lignées contrairement aux défauts du cycle cellulaire qui varient entre les deux. De plus, la surexpression de la survivine dans la lignée XG6 (niveau basal faible) ne confère pas

d'avantage de croissance en condition normale de culture, mais s'accompagne d'une survie et d'une prolifération prolongées en cas de privation en IL6.

Rôle de la survivine dans le cycle cellulaire

La diminution de l'expression de la survivine dans la lignée XG1 entraîne un arrêt de son cycle en mitose, principalement en prométaphase, ainsi qu'une apparition de cellules polyploïdes, aux noyaux de taille augmentée. Dans la lignée XG6, la polyploïdie n'est pas observée, les cellules sont bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire. L'absence ou la présence de polyploïdie pourrait être expliquée par leur statut p53 différent, XG6 possédant une protéine p53 sauvage et fonctionnelle contrairement à XG1 (Figure S1). La diminution de l'expression de la survivine dans la lignée XG1 entraîne les mêmes effets sur le cycle cellulaire que dans la lignée HeLa (p53 non fonctionnelle), très souvent utilisée pour les études fonctionnelles de la survivine (Li et al. 1999). Nous-même avons observé une polyploïdie massive lors de la diminution de l'expression de la survivine dans la lignée HeLa. Une étude comparant l'effet de siRNA *survivine* sur le cycle des cellules HCT116 p53^{+/+} et p53^{-/-} montre que les cellules dépourvues de p53 ne sont plus capables de s'arrêter en phase G2/M et deviennent polyploïdes (Beltrami et al. 2004). De même, la diminution de l'expression de la survivine dans les cellules HCT116 p21^{-/-} entraîne une forte polyploïdie, absente des cellules HCT116 p21^{+/+} (Beltrami et al. 2004). Il semble que les protéines p53 et p21 soient nécessaires au blocage du cycle cellulaire lorsque l'expression de la survivine est diminuée par ARN interférence. Cependant, pour une partie des cellules XG1 et HeLa, la réduction de l'expression de la survivine entraîne tout de même un arrêt en G2/M. Ceci est probablement dû à la perturbation de la fonction du complexe CPC (« chromosomal passenger protein »), auquel participe la survivine, qui entraîne un défaut de condensation des chromosomes souligné par l'arrêt des cellules en prométaphase, et un défaut de cytokinèse pour les cellules qui seraient bloquées transitoirement et subiraient une endomitose.

Figure S1 : Fonctionnalité de la protéine p53 dans les lignées de MM

QuickTime™ et un
décodeur sont nécessaires pour visualiser cette image.

Les lignées XG6 et XG1 sont traitées par la doxorubicine (Doxo, 1 μ M) ou le melphalan (Mel, 20 μ M pour XG6 et 50 μ M pour XG1) pendant 2 heures, puis lavées et remises en culture pendant 24 heures en condition normale. Par western blot, on observe une induction de l'expression de la protéine p53 sous l'effet de ces deux drogues génotoxiques, ce qui conduit à une augmentation de l'expression des protéines

p21 et Noxa dans la lignée XG6, au contraire de la lignée XG1. L'augmentation de Noxa dans XG1 semble plutôt liée à la mortalité induite par le melphalan indépendamment de p53. La protéine p53 serait donc fonctionnelle dans la lignée XG6 contrairement à XG1. Une étude génomique a confirmé le statut sauvage de la p53 dans la lignée XG6, alors que XG1 montre une p53 mutée.

En ce qui concerne la lignée XG6, la réduction de l'expression de la survivine n'entraîne ni polyploïdie, ni arrêt en phase G2/M. L'effet visible est un blocage des cellules XG6 en phase G0/G1, la survivine serait donc impliquée dans l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition G1/S. La prolifération de la lignée XG6 est fortement dépendante de l'apport exogène en IL6 contrairement à celle de la lignée XG1 (données personnelles). Nous observons que la surexpression ectopique de la survivine dans la lignée XG6 lui permet de proliférer en absence d'IL6. Nos résultats mettent en évidence le rôle de la survivine dans la transition G1/S des plasmocytes malins, et corroborent ceux montrés dans les précurseurs hématopoïétiques et lymphocytes T murins (Fukuda et al. 2002) (Song et al. 2007). L'expression aberrante de la survivine peut donc surseoir la nécessité des facteurs de croissance pour la transition G1/S de la lignée XG6. La protéine Rb est d'ailleurs phosphorylée malgré l'absence d'IL6 dans la lignée XG6 qui surexprime la survivine. Ces données soulignent le rôle oncogénique de la protéine survivine.

Rôle de la survivine dans la survie

Lorsque l'expression de la survivine est diminuée par ARN interférence, l'apoptose spontanée est induite dans les mêmes proportions dans les lignées XG1 et XG6, malgré leur statut p53 différent. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui montrent que la protéine p53 ne participe pas à l'apoptose induite par l'extinction de l'expression de la survivine (Beltrami et al. 2004). Ces deux lignées expriment fortement l'oncogène c-Myc, leur survie pourrait alors dépendre de l'expression de la survivine. En effet, plusieurs lignées de

cancer dont certaines de MM ayant une dérégulation de l'oncogène c-Myc montrent une forte dépendance à l'expression de la survivine pour leur survie comme peut le révéler leur sensibilité importante aux inhibiteurs de Cdk1 (Goga et al. 2007). Dans notre étude, la mortalité observée s'accompagne de l'activation de la Caspase-3 et du clivage de la protéine PARP-1. Au laboratoire, nous avons expertisé les interactions moléculaires de la survivine dans une série de lignées de MM par immunoprécipitation, et n'avons observé aucun complexe entre la survivine et les Caspases-3 et -9. Ceci est en accord avec la résolution de sa structure cristalline ainsi que des approches acellulaires qui semblent définitivement éliminer la capacité de l'unique domaine BIR de la survivine à se lier de façon stable aux caspases et à en inhiber leur activation et/ou activité (Verdecia et al. 2000). En effet, le domaine BIR de la survivine n'est pas précédé des quelques acides aminés absolument nécessaires à la liaison directe de XIAP avec les caspases. En revanche, nous avons observé un complexe entre la survivine et XIAP dans plusieurs lignées de MM à l'état basal (Figure S2). Des études ont rapporté l'existence de ce complexe et démontrent son implication dans la protection de XIAP vis-à-vis de sa dégradation protéosomale (Dohi et al. 2004b) (Arora et al. 2007). Seule la survivine libérée à partir de la mitochondrie est non phosphorylée sur son résidu sérine 20 et peut interagir avec XIAP (Dohi et al. 2007). Il serait utile d'expertiser la libération de la survivine mitochondriale et sa phosphorylation dans les lignées de MM sous l'effet de différents stimuli apoptotiques. Au laboratoire, la protéine XIAP a été étudiée et notamment impliquée dans la chimiorésistance des lignées de MM et la tumorigenèse dans un modèle murin en xénogreffe sous cutanée (Desplanques, manuscrit en préparation). De plus, la survivine pourrait également former un complexe avec Smac/DIABLO dans le cytoplasme afin de libérer XIAP (Song et al. 2004) ou alors directement le séquestrer dans la mitochondrie (Ceballos-Cancino et al. 2007). Un hétérotrimère entre la survivine, XIAP et XAF-1 a également été rapporté (Arora et al. 2007). D'une façon plus générale, les interactions de la survivine avec XIAP, Smac/DIABLO et XAF-1 devront donc être expertisées dans les lignées de MM.

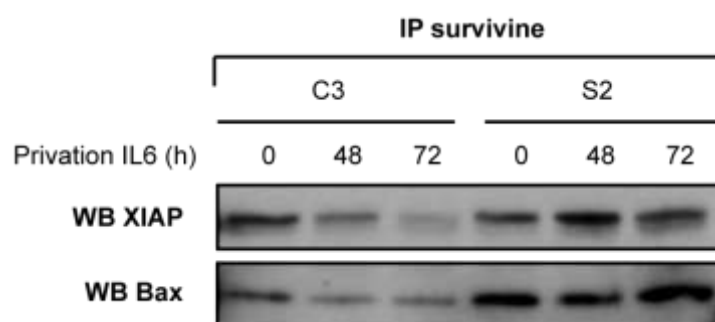


Figure S2 : Complexe survivine-XIAP et survivine-Bax au cours de la privation en IL6

Les cellules XG6 « contrôle » (C3) et exprimant la survivine de façon ectopique (S2) sont cultivées en présence (0h) ou en absence d'IL6 (48

et 72h). La protéine survivine est immunoprécipitée à partir des cellules C3 et S2 avec un anticorps anti-survivine (*Santa Cruz Biotechnology*). Les complexes avec XIAP ou Bax sont révélés par western blot avec un anticorps anti-XIAP ou Bax, respectivement.

Néanmoins, dans notre étude, l'induction de l'apoptose par la diminution de l'expression de la survivine est modeste (environ 25%). Il faut rappeler que l'ARN interférence ne permet qu'une diminution de son expression et non une extinction complète. De plus, la fraction cytoplasmique de survivine, impliquée plus spécifiquement dans la survie cellulaire, serait plus résistante à l'ARN interférence par rapport à sa fraction nucléaire (Beltrami et al. 2004). D'ailleurs, une étude a montré que la survivine est naturellement plus vulnérable dans le noyau (Connell et al. 2008). Il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de la diminution de l'expression de la survivine dans les différents compartiments subcellulaires au sein des lignées XG1 et XG6.

Rôle de la survivine dans la chimiorésistance

La diminution de l'expression de la survivine entraîne l'augmentation de la sensibilité des lignées XG1 et XG6 à l'effet de différentes drogues utilisées dans le traitement conventionnel du MM : doxorubicine (inhibiteur des topoisomérases II), melphalan (alkylant) et dexaméthasone (glucocorticoïde). La sensibilisation aux drogues génotoxiques, doxorubicine et melphalan, souligne une implication potentielle de la survivine dans la réponse au dommage à l'ADN. Suite à un dommage à l'ADN, la kinase Chk2 pourrait être impliquée dans la libération de la survivine mitochondriale à l'origine d'un message de survie probablement nécessaire à la cellule afin de réparer son ADN (Ghosh et al. 2006). Nos résultats suggèrent que l'expression aberrante de la survivine dans le MM pourrait participer à la chimiorésistance fréquemment observée. Une étude récente de l'expression des membres de la famille des IAP chez les patients atteints de MM a notamment révélé une association entre l'augmentation de l'expression de la survivine et la résistance au traitement (Nakagawa et al. 2006). En accord avec ces données, nous émettons l'hypothèse que l'inhibition de la survivine pourrait améliorer l'effet des traitements conventionnels du MM. En ce qui concerne les nouveaux traitements du MM, l'expression de la survivine semble pouvoir être augmentée par le bortézomib, ce qui pourrait participer à la résistance observée chez certains patients (Hideshima et al. 2007). La périfosine, un inhibiteur de Akt, diminue l'expression de la survivine et donne de bons résultats *in vitro* en association avec le bortézomib, mais aussi avec la doxorubicine, le melphalan et la dexaméthasone (Hideshima et al. 2007).

Rôle dans la tumorigenèse et l'évolution de la tumeur

Lorsque la lignée XG6 surexprime la survivine de façon ectopique, elle devient résistante à la privation en IL6 (son facteur de croissance majeur), en terme de croissance cellulaire, prolifération et survie. Ces phénomènes ne sont pas associés à l'induction d'une boucle autocrine en IL6 vérifiée par PCR quantitative en temps réel, ou à l'activation constitutive de la voie JAK2/STAT3 évaluée par western blot anti-STAT3 phosphorylé en tyrosine 705 (Figure S3). Au contraire, précédemment, l'activation intrinsèque de la voie JAK2/STAT3 avait été impliquée dans l'évolution du MM vers l'indépendance à l'IL6 (Rawat et al. 2000) (Jourdan et al. 2005). Néanmoins, dans notre étude, l'indépendance vis-à-vis de la signalisation JAK2/STAT3 est renforcée par le fait que la surexpression de la survivine entraîne une réduction de la sensibilité de la lignée XG6 à l'effet de l'AG490, un inhibiteur de JAK2. Une forte expression de la survivine semble donc se substituer à la nécessité de l'activation de cette voie de signalisation qui constitue une voie de survie majeure dans le MM notamment à travers l'expression de Mcl-1 (Puthier et al. 1999) et Bcl-x_L (Catlett-Falcone et al. 1999). Cependant, STAT3 agit également sur l'expression de la survivine. Dans le MM, l'inhibition de STAT3 entraîne une diminution de l'expression de la survivine (Pathak et al. 2007). De plus, l'IL6 qui active principalement la voie JAK2/STAT3, induit l'expression de la survivine dans la plupart des lignées de MM (données personnelles). D'ailleurs, STAT3 a été démontré comme un facteur de transcription du gène *survivine* dans le cancer du sein (Gritsko et al. 2006). L'expression ectopique de la survivine dans la lignée XG6 supplée la voie JAK2/STAT3 et permet son échappement *in vitro* à la dépendance en IL6.

Figure S3 : Phosphorylation des protéines STAT3 et ERK1/2

Les cellules XG6 « contrôle » (C3) et exprimant la survivine de façon ectopique (S2 et S4) sont cultivées en présence ou en absence d'IL6 pendant 36h.

Par western blot, les niveaux de phosphorylation de la protéine STAT3 (tyrosine T705) et des protéines ERK1/2 sont révélés. La phosphorylation de STAT3 est perdue en absence d'IL6 au contraire de ERK1/2. Cependant, on ne remarque aucune différence entre C3, S2 et S4.

De plus, les lignées de MM dépendantes de l'apport exogène en IL6 pour leur croissance ne semblent pas capables d'induire la formation d'une tumeur dans le modèle de

souris NOD-SCID en xénogreffe sous-cutanée (données non publiées). C'est le cas de la lignée cellulaire XG6 qui a servi dans notre étude. En revanche, la surexpression de la survivine dans cette lignée entraîne sa tumorigenicité puisqu'elle devient capable d'induire une tumeur myélomateuse chez la souris immunodéprimée. La survivine peut donc être considérée dans ce cas comme un véritable oncogène. L'étude de l'expression de différents marqueurs membranaires a révélé une augmentation de l'expression de la molécule de surface ICAM-3 sur les cellules XG6 surexprimant la survivine (Figure S4). ICAM-3 a été décrit comme participant à la progression tumorale *in vitro*, notamment dans la prolifération cellulaire (Kim et al. 2006) et la résistance à la radiothérapie (Chung et al. 2005). Nous n'avons pas réussi à démontrer l'implication de ICAM-3 dans la croissance cellulaire *in vitro*, ses ligands (LFA-1 et DC-SIGN) n'étant pas exprimés. Néanmoins, nous n'excluons pas une participation *in vivo* de l'expression de la molécule ICAM-3 dans la formation de la tumeur chez la souris. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour évaluer cette hypothèse.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure S4 : Expression de la molécule de surface ICAM-3

Les cellules XG6 « contrôle » (C3 et C6) et exprimant la survivine de façon ectopique (S2 et S4) sont analysées en cytométrie de flux pour leur expression membranaire de ICAM-3.

Dans la moelle osseuse, la tumeur est dépendante des interactions avec le stroma qui lui transmet des signaux de survie et de prolifération, notamment par la sécrétion d'IL6. La forte expression de la survivine pourrait permettre aux cellules myélomateuses de s'affranchir de cette dépendance à l'environnement médullaire et de disséminer vers des sites extramédullaires. Ces données sont en accord avec la corrélation que nous avons observé par western blot entre l'expression de la survivine et l'évolution de la maladie.

Corrélation inverse entre l'expression de la survivine et celle de Bim

L'expression ectopique de la survivine permet à la lignée XG6 de survivre en absence d'IL6. Cet avantage de survie est associé à une protection de l'intégrité de la mitochondrie même en condition de privation en IL6 (marquage JC-1 qui évalue la polarisation de la membrane mitochondriale). Au laboratoire, le rôle de plusieurs membres de la famille Bcl-2 a été étudié de manière approfondie dans la physiopathologie du MM. La protéine anti-apoptotique Mcl-1 est essentielle pour la survie de la tumeur myélomateuse (Derenne et al. 2002) et la protéine pro-apoptotique Bim (« BH3-only ») l'est pour la mort induite notamment au cours de la privation en IL6 des cellules de MM (Gomez-Bougie et al. 2004). La famille Bcl-2 montre son importance dans la régulation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe des cellules de MM, notamment à travers l'équilibre du complexe Bim-Mcl-1 (Gomez-Bougie et al. 2005) (Gomez-Bougie et al. 2007). Une étude récente a montré une relation entre la survivine et Bcl-2 (Vogel et al. 2007). Dans notre étude, nous avons constaté que seule l'expression de la protéine Bim, parmi les protéines de la famille Bcl-2 testées, est réduite de façon importante lorsque la survivine est surexprimée dans XG6. En effet, les trois isoformes d'épissage, Bim-EL, Bim-L et Bim-S, sont presque indétectables en western blot dans ces cellules au contraire de la lignée parentale. Leur expression reste inductible sous l'effet de la privation en IL6, comme cela été montré précédemment (Gomez-Bougie et al. 2004). Cependant, cette induction reste très modeste dans les cellules XG6 exprimant fortement la survivine, ce qui expliquerait leur résistance à la privation en IL6. Nos résultats suggèrent que le niveau d'expression de la survivine influence la régulation de l'expression de Bim.

Régulation transcriptionnelle de Bim

Par PCR quantitative en temps réel, nous avons montré que les ARNm *bim* sont diminués de 50% dans les cellules XG6 surexprimant la survivine. De façon importante, par la même technique, nous avons également démontré une corrélation inverse entre les niveaux en ARNm *survivine* et *bim* dans un échantillon de la cohorte de 250 patients au diagnostic. Cette observation appuie la pertinence de notre étude *in vitro* et souligne l'importance de nos résultats. En effet, les patients au diagnostic qui expriment la survivine font partie d'un groupe de mauvais pronostic, nous montrons que ce sont également ceux qui expriment les niveaux les plus faibles de Bim. La protéine Bim est considérée comme un suppresseur de tumeur notamment au sein des lymphocytes B et sa déficience peut coopérer avec la dérégulation d'oncogènes dans la lymphomagenèse (Egle et al. 2004).

Dans le MM, la diminution de l'expression de Bim entraîne une réduction de la sensibilité à l'apoptose (Del Gaizo Moore et al. 2007). Pour la première fois, nous avons démontré que la balance entre la survivine et Bim influence la croissance cellulaire *in vitro* en absence d'IL6 et le pronostic des patients atteints de MM.

Nos résultats issus d'expériences réalisées *In vitro* ou sur la tumeur myélomateuse, montrent que la survivine est donc à l'origine d'un mécanisme qui agit soit sur la transcription du gène *bim*, soit sur la stabilité de ses ARNm. La survivine n'est pas un facteur de transcription, son effet est certainement indirect. De nombreux facteurs de transcription comme FoxO3A, AP-1, Myb, CHOP, SMAD4, c-Myc ou E2F1 peuvent intervenir dans l'expression du gène *bim* (Egle et al. 2004) (Dijkers et al. 2000) (Biswas et al. 2007) (Puthalakath et al. 2007) (Ramjaun et al. 2007). De plus, la stabilité des ARNm *bim* semble constituer un facteur important pour son expression. En effet, la protéine chaperonne Hsc-70 (« heat shock cognate protein 70 ») serait essentielle dans la stabilité des ARNm *bim* (Matsui et al. 2007). Des expériences supplémentaires devront être menées afin de découvrir le ou les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression de Bim par la forte expression de la survivine. Nous pourrions expertiser le niveau d'expression de ces différents facteurs de transcription ainsi que l'effet de leur extinction sur l'expression de Bim.

Régulation post-traductionnelle de Bim

La régulation post-traductionnelle de Bim est également importante pour son niveau d'expression. La voie de signalisation ERK1/2 à l'origine de la phosphorylation de Bim entraîne sa dégradation par le protéasome (Ewings et al. 2007). Cependant, nous n'avons pas observé de plus forte activation de cette voie dans les cellules XG6 qui expriment la survivine de façon ectopique (Figure S3). Néanmoins, lorsque la survivine est surexprimée, les formes ubiquitinylées de la protéine Bim sont plus visibles en western blot (Figure S5). La protéine Bim est donc probablement plus vulnérable à sa dégradation par le protéasome. Au laboratoire, il avait été montré que les protéines Bim et Mcl-1 se protégeaient mutuellement de leur dégradation protéosomale en formant un complexe dans les cellules de MM à l'état basal (Wuilleme-Toumi et al. 2007). Effectivement, dans notre étude, la diminution de la protéine Bim semble liée à une légère diminution de la protéine Mcl-1. Il serait nécessaire de vérifier l'expression de Mcl-1 par PCR afin d'évaluer une éventuelle régulation transcriptionnelle de son gène. Aucune interaction physique entre la survivine et les protéines Bim, Mcl-1, Bcl-X_L et Bcl-2 n'a pu être mise en évidence par immunoprécipitation (données personnelles). La survivine peut être associée aux microtubules grâce à son

extrémité C-terminale en hélice α tout au long du cycle cellulaire (Li et al. 1998). Ainsi, elle peut fonctionner comme une protéine adaptatrice, son domaine BIR lui permettant d'interagir avec d'autres protéines. La protéine Bim peut elle aussi s'associer au cytosquelette, elle y est séquestrée et n'est ainsi plus capable de participer à l'induction de l'apoptose. L'expression ectopique de la survivine dans XG6 pourrait peut-être déplacer cet équilibre, conduisant Bim vers le protéasome. Cependant, Bim semble peu associé au cytosquelette dans les cellules de MM (Gomez-Bougie et al. 2005).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure S5 : Ubiquitination de la protéine Bim

Les cellules XG6 « contrôle » (C3) et exprimant la survivine de façon ectopique (S2) montrent des niveaux différents de la protéine Bim (BimEL(Input)). La protéine Bim est immunoprécipitée (BimEL(IP)) à partir des cellules C3 et S2. Les formes ubiquitinylées de Bim ((Bim)UB) sont révélées par western blot avec un anticorps anti-Ubiquitine (Santa Cruz Biotechnology).

En revanche, nous avons mis en évidence une association entre la survivine et la protéine pro-apoptotique Bax par immunoprécipitation dans les lignées de MM (Figure S2). Dans les cellules XG6 qui expriment la survivine de façon ectopique, ces deux protéines forment un complexe stable au cours de la privation en IL6 contrairement aux cellules XG6 contrôle. *In vitro*, l'expression ectopique de la survivine est associée à une diminution de l'activation de Bax dans la lignée HeLa (Vogel et al. 2007). *In vivo*, les cellules hépatiques des souris hétérozygotes survivine^{+/-} montrent une augmentation du niveau protéique de Bax (Conway et al. 2002). Le rôle majeur de la protéine Bax dans la perméabilisation mitochondriale nous encourage à évaluer l'impact fonctionnel de ce complexe survivine-Bax dans les cellules de MM. La survivine pourrait jouer un rôle dans la séquestration de Bax, mais ceci reste à élucider.

L'ensemble de nos résultats montrent que la survivine participe à l'oncogenèse du MM. En effet, son niveau d'expression, fréquemment dérégulé dans le MM, corrèle avec l'évolution de la maladie et le pronostic des patients. L'efficacité des traitements semble également influencée par son expression. La balance entre la survivine et Bim est

probablement déséquilibrée de façon importante dans les cellules myélomateuses notamment au moment de leur dissémination vers des sites extramédullaires. La réalisation de profils d'expression génique accompagnés de tests « BH3 profiling » serait un atout majeur pour déterminer les patients de MM à risque et établir la meilleure stratégie thérapeutique adaptée à chaque cas. Par exemple, une tumeur ayant un faible niveau de protéine Bim, à cause d'une expression anormale de survivine, sera probablement résistante aux thérapies ciblant la voie mitochondriale de l'apoptose (Letai 2008). Cependant, on peut imaginer que cette situation puisse être réversible par des inhibiteurs de la survivine. La survivine pourrait donc très probablement servir de cible thérapeutique efficace en association avec d'autres drogues dans le traitement de certains patients atteints de MM. Différentes molécules ciblant la survivine sont actuellement testées en clinique, comme un oligonucléotide antisens (ASO) ou un inhibiteur de sa transcription (YM155) (Altieri 2008). D'ailleurs, le YM155 est depuis peu en essai clinique dans le traitement des patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules (patients réfractaires ou en rechute). Il serait intéressant de tester son association avec des drogues génotoxiques ou le bortézomib dans le traitement du MM. Enfin, d'autres approches pourraient être choisies pour cibler les cellules myélomateuses exprimant la survivine de façon anormale. En effet, il a été démontré que l'immunogénicité de l'antigène survivine pouvait constituer un atout en l'immunothérapie chez les patients de MM (Grube et al. 2007).

ANNEXE 1 : ARTICLE

Article intitulé « **Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL** ».

Clinical Cancer Research, 2007 Oct 15;13(20):6010-8.

La voie NF- κ B est constitutivement activée dans plus de 80% des tumeurs myélomateuses dès le diagnostic, soit par le soutien du stroma médullaire, soit par des mutations pouvant affecter différents effecteurs et régulateurs de cette voie dans les plasmocytes malins (Annunziata et al. 2007) (Keats et al. 2007). De plus, la voie NF- κ B a été impliquée dans la croissance cellulaire et la chimiorésistance du MM (Hideshima et al. 2002; Hideshima et al. 2006) (Sanda et al. 2005). Les voies canonique et alternative semblent toutes deux moduler la réponse aux traitements des patients de MM (Gilmore 2007). La recherche et l'expertise d'inhibiteurs spécifiques de ces voies sont donc nécessaires pour améliorer l'efficacité des traitements actuels, notamment par leur utilisation en association.

L'AS602868 bloque l'activation de la voie NF- κ B canonique et la croissance cellulaire dans le MM

L'AS602868 est un inhibiteur pharmacologique de la kinase IKK2 développé par *Merck Serono International SA*. Précédemment, la spécificité de cet inhibiteur avait été démontrée (Frelin et al. 2003) et son potentiel apoptotique révélé dans la leucémie myéloïde aigue (Frelin et al. 2005).

Nous avons testé l'efficacité de cet inhibiteur sur des lignées de MM. Par ELISA, nous avons montré que la translocation nucléaire de la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B sous l'effet du TNF α était efficacement inhibée par l'AS602868. L'induction de l'expression de la molécule de surface ICAM-1 par le TNF α est également bloquée par cet inhibiteur. L'AS602868 permet donc d'inhiber la voie NF- κ B induite par le TNF α et révèle d'ailleurs une forte apoptose en association avec le TNF α sur plusieurs lignées de MM. La croissance cellulaire de plus de 15 lignées de MM testées et de cellules primaires myélomateuses est réduite par l'AS602868. Ceci est expliqué par le blocage de la

prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose par l'AS602868. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Bernard Klein qui a également testé l'effet *in vitro* de cet inhibiteur sur les lignées de MM (Jourdan et al. 2007). Nous avons montré que l'inhibition de la voie NF- κ B entraînait une activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, comme le marquage de la forme activée de Bax en cytométrie de flux le démontre. Ceci conduit à l'activation de la Caspase-3 et le clivage de la protéine PARP-1 (visibles en western blot). En coculture *in vitro* avec des cellules stromales médullaires, la lignée MM1S stimule la sécrétion paracrine d'IL6, le facteur de croissance majeur dans le MM. L'ajout de l'AS602868 permet de bloquer efficacement cette sécrétion. *In vivo*, l'ingestion de l'AS602868 par le gavage de souris immunodéprimées NOD-SCID porteuses d'une tumeur myélomateuse (xénogreffe sous-cutanée d'une lignée de MM), permet de réduire significativement la croissance tumorale. Ainsi, nous avons démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'AS602868 sur l'inhibition de la croissance de la tumeur myélomateuse.

L'AS602868 révèle un effet synergique sur l'apoptose induite par TRAIL dans le MM

TRAIL semble très attractif pour le traitement du MM (Gazitt 1999). Son potentiel anti-apoptotique agit notamment à travers le clivage de la protéine Mcl-1 (Menoret et al. 2006), une protéine cruciale pour la croissance myélomateuse (Derenne et al. 2002). Néanmoins, des phénomènes de résistance à TRAIL ont été observés dans les cellules de MM. Plusieurs études ont donc expertisé son association avec d'autres drogues afin d'inhiber les mécanismes de résistance observés. Une efficacité plus importante a été obtenue par l'association de TRAIL avec le bortézomib, le SN50 (un peptide inhibiteur de la voie NF- κ B) (Mitsiades et al. 2001) ou même des antisens ciblant c-FLIP (Mitsiades et al. 2002b). La voie NF- κ B pourrait donc participer à la résistance à TRAIL comme cela a été montré pour d'autres récepteurs de mort de la famille du TNF. Nous avons expertisé cette hypothèse et pour la première fois dans le MM, nous avons démontré que TRAIL lui-même induisait l'activation de la voie NF- κ B. En effet, la phosphorylation de I κ B α est fortement induite (visible par western blot) dans les cellules traitées par TRAIL, entraînant la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B (par immunofluorescence) qui peut alors contrecarrer la voie d'apoptose engagée en parallèle, en partie en activant la transcription de plusieurs molécules anti-apoptotiques et prolifératives comme c-FLIP_L, c-Myc et plusieurs protéines de la famille des IAP (c-IAP1 et 2). Récemment, l'implication de l'expression de c-FLIP_L dans la résistance à TRAIL a aussi été démontrée dans le MM (Fandy et al. 2007) et

dans le lymphome du manteau (Roue et al. 2007). Ainsi, nous expliquons la synergie observée par l'association de l'AS602868 avec TRAIL sur l'induction de l'apoptose dans les lignées de MM et les cellules primaires provenant de prélèvements médullaires de patients atteints de MM parfois réfractaires à différentes thérapies conventionnelles. En ce qui concerne les cellules primaires, le prélèvement médullaire est traité dans sa globalité en présence d'IL6 afin de réduire l'apoptose spontanée caractéristique des cellules primaires de MM *ex vivo*. En cytométrie de flux, l'évaluation de l'expression de différents marqueurs membranaires (CD138, CD38, CD45) semble montrer que l'apoptose induite par l'association de ces deux drogues est spécifique des cellules malignes du prélèvement. Une étude plus approfondie devra évaluer la toxicité de l'AS602868 sur les précurseurs hématopoïétiques.

L'ensemble de nos résultats montrent que la voie NF- κ B soutient la croissance de la tumeur myélomateuse et constitue un des mécanismes de chimiorésistance au traitement par TRAIL. L'efficacité anti-tumorale de l'AS602868 chez la souris immunodéprimée et son importante synergie en association avec TRAIL soulignent la nécessité de son expertise en clinique humaine. De plus, l'induction de la voie NF- κ B par d'autres traitements conventionnels du MM a été démontrée, notamment par le melphalan et la doxorubicine (Baumann et al. 2007). Cette voie pourrait participer à un mécanisme plus global de chimiorésistance chez les patients de MM, son inhibition pourrait donc considérablement améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Canonical Nuclear Factor κ B Pathway Inhibition Blocks Myeloma Cell Growth and Induces Apoptosis in Strong Synergy with TRAIL

Mathilde Romagnoli,^{1,2} Grégoire Desplanques,^{1,2} Sophie Maïga,^{1,4} Steven Legouill,^{1,3} Michel Dreano,⁵ Régis Bataille,^{1,2,4} and Sophie Barillé-Nion^{1,2}

Abstract Purpose: Intrinsic activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) characterizes various hematologic malignancies. In this study, we specifically address the role of NF- κ B blockade in mediated anti-myeloma activity using the I κ B kinase-2 pharmacologic inhibitor, AS602868.

Experimental Design: Human myeloma cell lines ($n = 16$) and primary myeloma cells ($n = 10$) were tested for their sensitivity to AS602868 in terms of proliferation and apoptosis. Both *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted. Functional mechanisms regarding the apoptotic pathways triggered by AS602868 were studied. The potential proapoptotic synergy between AS602868 and tumor necrosis factor – related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was also evaluated.

Results: Our results show that AS602868 efficiently targeted the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells and potently inhibited their growth in inducing apoptosis through Bax and caspase-3 activation. AS602868 also induced apoptosis in primary myeloma cells even in the presence of bone marrow mononuclear cells. Moreover, the I κ B kinase-2 inhibitor targeted the paracrine effect on the bone marrow environment. Indeed, it decreased the intrinsic and myeloma-induced secretion of interleukin-6 from bone marrow stromal cells. In addition, AS602868 inhibited myeloma cell growth in the MM.1S xenograft myeloma model. Of particular interest, AS602868 strongly increased myeloma sensitivity to TRAIL in blocking TRAIL-induced NF- κ B activation and in decreasing the expression of antiapoptotic proteins such as cFLIP and cIAP-1/2.

Conclusions: Taken together, our data point out the interest to inhibit the canonical NF- κ B pathway in myeloma and clearly encourage clinical evaluation of novel therapies based on targeting NF- κ B, especially in combination with TRAIL.

The nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factors are assembled through the dimerization of five members of the Rel protein family, of which p50-p65 is the most common. In resting cells, NF- κ B dimers are retained in the cytoplasm in a latent, inactive form by I κ B family inhibitors, which bind to the rel-homology domain and interfere with the nuclear localization sequence of NF- κ B (1, 2). Various stimuli activate the NF- κ B signaling pathways leading to translocation of NF- κ B dimers from the cytoplasm to the nucleus. In the canonical pathway, proinflammatory cytokines such as the tumor necrosis factor α (TNF α), working through different receptors belonging to the TNF-receptor family, activate the

I κ B kinase (IKK) complex consisting of the IKK1 (or IKK α) and IKK2 (or IKK β) catalytic subunits and the IKK γ regulatory subunit (or NEMO). This complex predominantly acting through IKK2 (IKK β) catalyzes the phosphorylation of I κ Bs (at sites equivalent to Ser³² and Ser³⁶ of I κ B α), their polyubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. The released NF- κ B dimers, typically heterodimers of p50 and p65 subunits, translocate to the nucleus where it binds to specific DNA sequences in the promoters of target genes and modulates their transcription. Recently, an alternative NF- κ B pathway, strictly dependent on IKK1 was described. This pathway, based on processing of the NF- κ B2/p100 precursor, is activated in response to either the engagement of LT β and BAFF receptors or CD40 and may play a central role in the development and maintenance of secondary lymphoid organs (2).

Constitutive activation of NF- κ B was reported for various solid and hematologic tumors (3, 4). Actually, NF- κ B promotes cell survival through the expression of genes coding for antiapoptotic proteins, i.e., c-FLIP, members of the Bcl-2 family, or the inhibitor of apoptosis proteins (IAP) and stimulates cell proliferation via the induction of growth factors, i.e., c-myc or cell cycle regulators (5, 6). Importantly, most actual anticancer drugs activate the NF- κ B pathway, an event that interferes with their efficiency and participates in

Authors' Affiliations: ¹INSERM, UMR 601, ²Université de Nantes, Faculté de Médecine, ³Department of Clinical Hematology, CHR Nantes, Nantes, France; ⁴Centre de Lutte contre le Cancer Rene Gauducheau, Saint Herblain, France; and ⁵Merck Serono International SA, Geneva, Switzerland

Received 1/18/07; revised 6/7/07; accepted 7/20/07.

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

Requests for reprints: Sophie Barillé-Nion, UMR 601, 9 quai Moncousu, Nantes F-44093, France. Phone: 33-24008-4766; Fax: 33-24008-4778; E-mail: sbarille@nantes.inserm.fr.

© 2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0140

chemoresistance (7). Therefore, it has been proposed that inhibition of NF- κ B could be an adjuvant therapy for cancer.

Among hematologic malignancies, constitutive activation of the NF- κ B pathway was observed in acute myeloid leukemia (8), and in a subgroup of lymphomas with diffuse large and primary mediastinal B-cell lymphomas (9). NF- κ B activation also contributes to malignant transformation of myelodysplastic syndromes (10). Interestingly, Endo et al. recently showed that inhibition of the canonical NF- κ B pathway in B-CLL cells induced cell death in contrast to inhibition of the alternative pathway activated by the TNF superfamily member, BAFF (11). Regarding multiple myeloma (MM), several studies revealed the expression of constitutively active NF- κ B in bone marrow aspirates from patients (12–14). However, the underlying mechanisms for expression of intrinsically activated NF- κ B in MM are poorly understood. NF- κ B could be activated in an autocrine or paracrine manner because several NF- κ B-inducing cytokines including TNF α , lymphotoxin, BAFF/APRIL, interleukin-1, and RANKL are produced either by MM cells or by the bone marrow environment. Indeed, the principal site of tumor growth and propagation of MM is the bone marrow compartment, in which cells from the environment are thought to supply growth and survival factors and to provide contact-mediated drug resistance. Chauhan et al. previously reported that MM cell adhesion to bone marrow stromal cells (BMSC) induced NF- κ B-dependent up-regulation of transcription of interleukin-6 (IL-6), a major growth and antiapoptotic factor in MM (15). They further showed that blocking NF- κ B activation in MM cells overcame the growth and survival advantage conferred by tumor cell binding to BMSC (13). Despite the successful clinical development of immunomodulatory derivatives of thalidomide and proteasome inhibitors acting partially through NF- κ B inhibition, such as bortezomib, the search for additional new agents and effective strategies against myeloma that is still an incurable cancer, remains a high priority. The TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) emerges as a very attractive death ligand in targeted MM therapy because it is able to induce apoptosis in myeloma cells through caspase-8 activation (16, 17). However, TRAIL resistance has also been observed in myeloma cells but mechanisms underlying this resistance remain elusive (18, 19).

Therefore, for its potential use in the treatment of MM, we investigated the pharmacologic inhibitor of the canonical NF- κ B pathway, AS602868, which has the ability to block IKK2. We describe here that AS602868 decreased *in vitro* myeloma cell growth related to cell cycle blockade and induction of apoptosis through the classical apoptotic pathway, targeted the paracrine effects of the bone marrow environment, inhibited the *in vivo* myeloma tumor progression, and sensitized cells to TRAIL-induced cell death in preventing TRAIL-induced NF- κ B activation. Therefore, specific blockade of NF- κ B signaling may represent a novel potent therapeutic approach in the treatment of MM, particularly in combination with TRAIL-targeted therapy.

Materials and Methods

Characteristics of AS602868. AS602868 is an anilinopyrimidine derivative and an ATP competitor that has been optimized through chemical modification after the *in vitro* screening of compounds for their inhibitory effect on IKK2EE, a constitutive form of IKK2. This

compound was developed by Merck Serono International SA and is covered by patent application no. PCT WO 02/46171. AS602868 has an *in vitro* inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) of 60 nmol/L toward purified IKK2EE and has limited or no effect on IKK1 or on a panel of recombinant kinases. In a series of tests on different cell lines, AS602868 was shown to block the phosphorylation of I κ B and subsequent NF- κ B activation (20).

Myeloma cells and BMSC culture. The human myeloma cell lines (HMCL) XG1, XG2, XG5, XG6, XG7, NAN1, NAN3, NAN6, MDN, and SBN have been previously established in our laboratory and were cultured in the presence of 3 ng/mL of recombinant human IL-6 (rhIL6; Novartis; ref. 21). U266, LP1, L363, RPMI 8226, and NCI-H929 HMCLs are commercially available. MM.1S was a gift from Dr. S.T. Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). Cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, 2 mmol/L of glutamine, and 5×10^{-5} mol/L of 2- β -mercaptoethanol.

Primary myeloma cells were obtained from bone marrow aspirates or peripheral blood samples and BMSC from bone marrow samples from patients with MM following Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. For 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, myeloma cells were further purified using CD138 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec) as previously described (22). BMSC were derived from confluent adherent cell monolayer obtained from total bone marrow cells after two passages using trypsin/EDTA solution. Informed consent was provided according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association. The University Hospital of Nantes Review Board approved these studies.

Tritiated [³H]thymidine incorporation assay. HMCLs (10^4 cells/well) were cultured in triplicate in 96-well plates in the presence or absence of AS602868 for 72 h. Cells were pulsed with 1 μ Ci of [³H]thymidine during the last 8 h of culture, harvested onto glass filters with an automatic cell harvester (Perkin-Elmer), and the uptake of [³H]thymidine was monitored using a 1450 Microbeta Jet beta counter (Perkin-Elmer). The IC₅₀ for [³H]thymidine incorporation was calculated for each HMCL. These experiments were done thrice and a mean $\pm$ SD of inhibition was presented.

Cell viability assay. Viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. After 48 h of treatment with 3×10^4 primary purified myeloma cells with increasing (5, 10, and 20 μ mol/L) AS602868 concentrations, cells were incubated with 50 μ L of 2.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) for 210 min. Absorption at the 570 nm wavelength was measured after total solubilization of formazan crystals by 100 μ L of lysis solution. The inhibition of cell viability induced by the drug was tested in triplicate and expressed as a percentage compared with the untreated corresponding cells.

Apoptosis assay. The percentages of apoptosis were assessed by flow cytometry analysis of Apo2.7-PE staining (FACScalibur, Beckman Coulter) after 48 h of treatment. AS602868 treatment was done at a concentration of 10 μ mol/L. In the experiments using the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk (Promega), cells were incubated with the caspase inhibitor (50 μ mol/L) for 1 h, then AS602868 was added for 24 h. In TRAIL experiments, HMCLs or primary myeloma cells were incubated for 48 h with 5 μ mol/L of AS602868 and/or recombinant TRAIL (R&D Systems) at 100 ng/mL for XG6, LP1, U266, MM.1S, and L363, or at 10 ng/mL for more sensitive cell lines NCI-H929, RPMI 8226, XG7, NAN1, and NAN3. Total bone marrow cells from patients with MM were cultured with RPMI 1640 complemented with 5% FCS and 3 ng/mL of rhIL6, and after 48 h of incubation with or without TRAIL (100 ng/mL) in the presence or absence of 10 μ mol/L of AS602868, cells were stained with anti-CD38-APC, CD138-PC5, CD45-FITC, and Apo2.7-PE monoclonal antibodies (Becton Dickinson) before flow cytometry analysis, as previously described (23).

Binding activity of nuclear p50 NF- κ B subunit by ELISA. NF- κ B activation was determined with a Trans-AM NF- κ B p50 transcription factor assay kit (Panomics) according to the manufacturer's instructions. This ELISA used a 96-well plate coated with an oligonucleotide

containing the NF- κ B consensus binding site (5'-GGGACTTCC-3'). Cells were treated for 18 h with 10 μ M of AS602868, then nuclear extracts were prepared with Panomics nuclear extraction kit and added to the ELISA plate. NF- κ B binding to the target oligonucleotide was detected by incubation with primary antibodies specific for the activated form of the p50 subunit, visualized by anti-IgG horseradish peroxidase conjugate, and quantified at 450 nm. Each condition was run in triplicate.

Subcellular p65 NF- κ B subunit localization by immunofluorescence. HMCLs were treated with or without AS602868 at 10 μ M/L for 3 h, then spotted on a glass slide, air-dried 15 min at room temperature, fixed with PBS + 4% formaldehyde, and permeabilized with PBS + 0.05% Tween 20 + 0.05% Triton 100. After saturation in PBS/3% bovine serum albumin for 30 min, slides were incubated for 1 h with anti-human p65 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), then cells were washed and incubated for 30 min with an FITC-conjugated anti-rabbit antibody (1:200; Becton Dickinson). Images were collected using a Leica TCS NT microscope with a 63 $\times$ 1.3 NA Fluotar objective (Leica).

Intercellular adhesion molecule-1 expression. HMCLs were cultured with recombinant TNF α (5 ng/mL; R&D Systems) in the presence or absence of AS602868 (10 μ M/L) for 48 h. Cells were then stained with mouse IgG isotype control or FITC-conjugated anti-human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) antibody. ICAM-1 expression was determined using FACScalibur (Becton Dickinson).

Bax activation. For the detection of activated Bax, 5×10^5 cells treated with 10 μ M/L of AS602868 for 48 h and controls, were washed in PBS and fixed using Intra Prep Permeabilization Reagent Kit (R&D Systems) following the recommendations of the manufacturer. Then, cells were incubated with anti-Bax (clone 6A7) antibody or IgG₁ isotype control for 20 min. After washing in PBS, cells were incubated with FITC-conjugated anti-mouse antibody (R&D Systems) for 20 min, and resuspended in PBS + 1% formaldehyde. Flow cytometry analysis was done as above.

Immunoblot analysis. Cells (5×10^6) were resuspended in lysis buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100, and 2 μ g/mL aprotinin]. Antiphosphatases were added for phosphorylated protein detection. After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 12,000 $\times$ g for 30 min at 4°C. Protein concentration was

measured using bicinchoninic acid (BCA Protein Assay). Fifty micrograms of proteins were loaded for each lane. The proteins were separated by SDS-PAGE and then electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Western blot analysis was done by standard techniques with enhanced chemiluminescence detection (Pierce) using anti-caspase-3 (E-8), anti-c-myc (A-14), and anti-Mcl-1 (S-19) from Santa Cruz Biotechnology Inc.; anti-PARP-1 (Ab-2) from Calbiochem; anti-phosphorylated-I κ B α (Ser^{32/36}, 5A5) and anti-I κ B α from Cell Signaling Technology; anti-c-FLIP (NF6) from Alexis Biochemicals; anti-XIAP, anti-cIAP-1, anti-cIAP-2, and anti-Bcl-x_L from BD Biosciences; anti-Bcl-2 from Dako; and anti-actin from Chemicon International. Protein loading was controlled with anti-actin.

Determination of IL-6 production. BMSC (10^4) and MM.1S (5×10^5) cells were cultured separately or together (coculture) and were incubated for 48 h in the presence or absence of AS602868 (10 μ M/L). Then culture supernatants were harvested and tested by ELISA (Sanquin).

In vivo antitumor activity of AS602868. Six- to 8-week-old non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice (Charles River Laboratories) were s.c. inoculated in the right flank with 10^6 MM.1S cells in 100 μ L of RPMI 1640. Three to 4 weeks later, when palpable tumors developed, mice ($n = 6$) were treated with 100 mg/kg of AS602868 in 0.5% carboxymethylcellulose/0.25% Tween 20 (g/100 mL) in distilled water, every day (6 days a week) by oral gavage. Control mice ($n = 6$) received equal amounts of control vehicle administered the same way at the same schedule. Tumor size was measured every 3 days in two dimensions using a caliper, and tumor volume (mm³) was calculated as $4 \pi/3 \times (\text{tumor width}/2)^2 \times (\text{tumor length}/2)$. Mice were humanely sacrificed when moribund or when subcutaneous tumors reached a diameter of 25 mm.

Statistical analysis. The Wilcoxon signed rank test was used to calculate the statistical significance between treated and control samples from patients and the Mann-Whitney test was used to compare treated and control mice groups in *in vivo* experiments. For all other experiments, the results are shown as mean $\pm$ SD.

Results

AS602868 inhibits the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells. To confirm that the pharmacologic IKK2 inhibitor

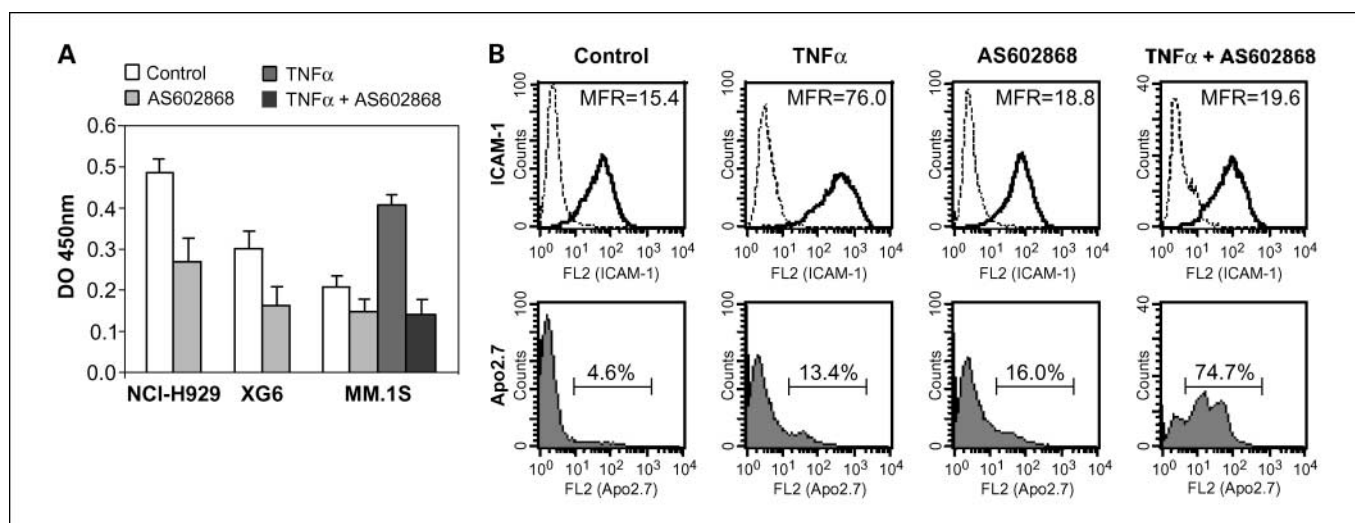


Fig. 1. AS602868 inhibits the NF- κ B pathway in myeloma cells. **A**, p50 NF- κ B binding activity was evaluated by ELISA in nuclear extracts of NCI-H929, XG6, and MM.1S cells treated with or without AS602868 at 10 μ M/L for 18 h. MM.1S cells were also pretreated for 30 min with or without AS602868 before stimulation with TNF α at 5 ng/mL for 30 min (columns, means; bars, SD; $n = 3$). **B**, MM.1S cells were evaluated for their ICAM-1 (CD54) expression (top) and apoptotic index with Apo2.7 staining (bottom) by flow cytometry analysis after the following culture conditions were established for 48 h: control, TNF α (5 ng/mL), AS602868 (10 μ M/L), and AS602868 + TNF α (10 μ M/L + 5 ng/mL). Results are from a representative experiment ($n = 3$).

AS602868 inhibited the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells, we first evaluated the NF- κ B binding activity of the p50 NF- κ B subunit in nuclear extracts from AS602868-treated cells and control cells using ELISA. As shown in Fig. 1A, 10 μ mol/L of AS602868 decreased nuclear p50-binding activity by 44.7%, 46.7%, and 30% in NCI-H929, XG6, and MM1.S cells, respectively. As expected, the positive control TNF α enhanced p50-binding activity in MM1.S cells and AS602868 was able to prevent this effect. These results clearly indicate that AS602868 prevented the translocation of the p50 NF- κ B subunit to the nucleus but promoted its cytosolic retention by interaction with nonphosphorylated I κ B α protein, limiting NF- κ B binding activity in myeloma cells. To further show the potent activity of AS602868 on the NF- κ B pathway in myeloma cells, we evaluated its effect on TNF α -induced targets. We first focused on ICAM-1 (CD54) expression. ICAM-1 expression detected by flow cytometry was induced in HMCLs after a 48-h incubation with TNF α , as shown in Fig. 1B (top) for MM1.S cells. Treatment with AS602868 had no significant effect on ICAM-1 basal levels but it abolished TNF α -induced ICAM-1 expression. The same results were obtained in XG6 and NCI-H929 cells (data not shown). In addition, TNF α alone induced a weak apoptosis in MM1.S cells but its apoptotic potential was strongly revealed by AS602868 cotreatment: 70.1% of specific apoptotic cells in AS602868 + TNF α -treated cells versus 8.8% in TNF α -stimulated cells (Fig. 1B, bottom). These results indicate that AS602868 blocked the NF- κ B pathway induced by TNF α in myeloma cells. Altogether, these data strongly argue for the potent activity of AS602868 on the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells.

AS602868 inhibits *in vitro* myeloma cell growth. We then asked whether the pharmacologic IKK2 inhibitor AS602868 affected the growth of HMCLs. Sixteen HMCLs were incubated with increasing AS602868 doses and were evaluated by [3 H]thymidine incorporation. Then, the IC₅₀ of each HMCL proliferation rate was calculated. As presented in Fig. 2A, AS602868 efficiently decreased HMCL growth with IC₅₀'s ranging from 1.2 $\pm$ 0.8 μ mol/L (NAN3) to 9.2 $\pm$ 0.9 μ mol/L (RPMI 8226; mean = 3.7 $\pm$ 1.75 μ mol/L; n = 16). The AS602868-induced inhibition of proliferation was confirmed by cell cycle analysis using propidium iodide staining. Indeed, AS602868 treatment led to the decrease of cell numbers in S phase (data not shown). We further evaluated whether growth inhibition resulted from the induction of apoptosis. Drug-induced apoptosis was evaluated by Apo2.7 staining after treatment with 10 μ mol/L of AS602868 for 48 h. We showed that the IKK2 inhibitor induced a specific apoptosis in HMCLs (mean = 30.4 $\pm$ 14.3%; n = 15) ranging from 8 $\pm$ 3.2% (MM1.S) to 53.6 $\pm$ 10.6% (NAN3; Fig. 2B). These results clearly show that myeloma cell growth inhibition induced by AS602868 resulted from both inhibition of cell cycle progression and apoptosis induction.

Cell growth inhibition induced by the IKK2 inhibitor was further assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay on CD138⁺-purified primary myeloma cells from patients with MM. As shown in Fig. 2C, increasing concentrations of AS602868 inhibited myeloma cell viability in samples from three patients (two at diagnosis and one on relapse). Cell viability inhibition displayed a dose-response effect, arguing for a drug-specific effect. Moreover, apoptosis analysis of total bone marrow mononuclear cells from patients with MM indicated that AS602868 at 10 μ mol/L induced

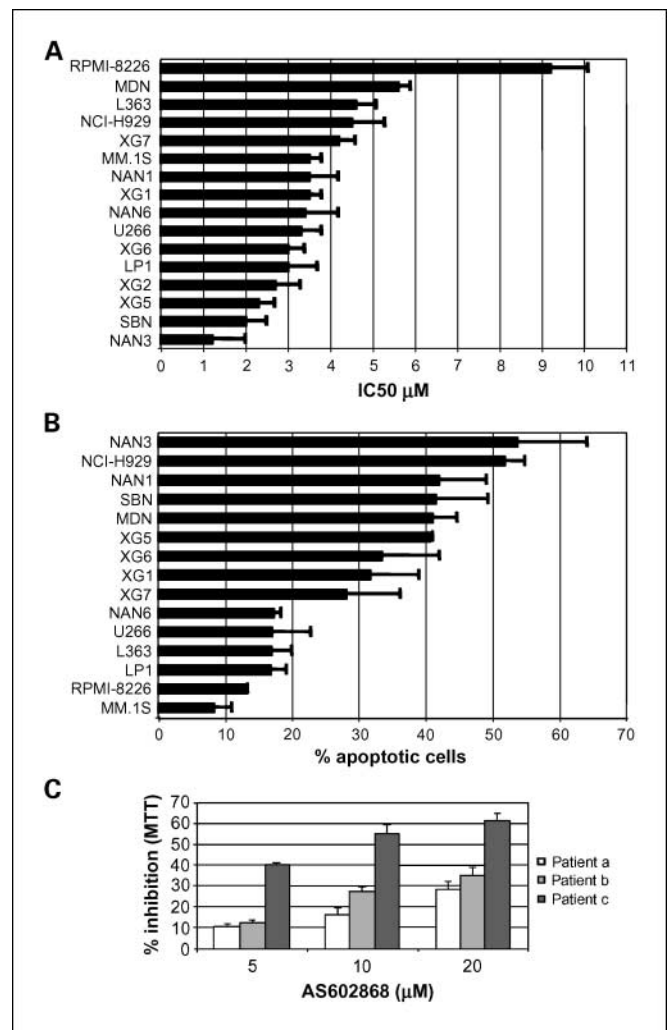


Fig. 2. AS602868 inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloma cells. **A**, IC₅₀ was calculated for each HMCL as the concentration inhibiting 50% of [3 H]thymidine incorporation after 72 h of incubation with increasing concentrations of AS602868 (columns, means; bars, SD; n = 3). **B**, HMCLs were incubated with AS602868 at 10 μ mol/L for 48 h, then apoptosis was evaluated by Apo2.7 staining and analyzed by flow cytometry. Specific drug-induced apoptosis for each HMCL was defined as the percentage of Apo2.7-positive cells in treated versus nontreated conditions (columns, means; bars, SD; n = 3). **C**, the effect of AS602868 at 5, 10, and 20 μ mol/L on CD138⁺-purified primary myeloma cell viabilities were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Triplicates of CD138⁺ purified primary myeloma cells from three patients (a, b, and c) were presented (columns, means; bars, SD).

specific apoptosis in a series of myeloma samples (n = 10), five patients at diagnosis and five patients at relapse (median = 18%; range, 6-53; P < 0.01), as assessed by flow cytometry analysis (Table 1). Interestingly, four out of five cases of MM relapse showed AS602868 sensitivity. It should be noted that these experiments were done in the presence of rhIL6 to limit spontaneous *in vitro* apoptosis of primary myeloma cells (median = 5%).

AS602868 induces apoptosis in myeloma cells. To gain insight into the apoptotic pathways activated by AS602868 in myeloma cells, we first sought to establish Bax activation. We found that in HMCLs, the IKK2 inhibitor induced the exposure of an occluded NH₂-terminal sequence of Bax, reflecting the conformational change which occurs during its activation. The

Table 1. AS602868 induced apoptosis in primary myeloma cells

Patient no.	Status	Sample	CD138+ cells (%)	Spontaneous apoptosis in control (%)	Specific apoptosis after AS602868 treatment (%)
1	R	BM	16	1	10
2	R	BM	10	2	37
3	D	BM	5	4	18
4	D	BM	35	38	30
5	D	BM	28.5	7	53
6	R	PB	12	4	36
7	R	BM	24	1.5	18
8	R	BM	15	6	6
9	D	BM	73	12	18
10	D	BM	5	5	6.5

NOTE: Total cells from either bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples from patients at diagnosis (D) or on relapse (R) were cultured in RPMI 1640 containing 5% FCS with 3 ng/mL of rhIL6 for 48 h in the presence or absence of AS602868 (10 μ mol/L). The proportion of apoptotic myeloma cells was evaluated by fluorescence-activated cell sorting analysis. The percentage of apoptotic cells in controls and percentage of apoptotic cells specifically related to AS602868 are indicated.

activation of Bax was detected in XG6 cells as depicted in one representative experiment in Fig. 3A, as well as in the other HMCLs tested. We further assessed caspase-3 cleavage by immunoblot analysis in AS602868-treated HMCLs. As shown in Fig. 3B, cleaved caspase-3 was detected in XG6 treated by AS602868 for 48 h. Caspase-3 cleavage could be detected as soon as 6 h after treatment with AS602868 (data not shown). In addition, the cleavage of the caspase-3 substrate PARP-1 was also detected in treated cells in contrast to control cells. Finally, the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk efficiently abrogated both caspase-3 and PARP-1 cleavage as well as cell death induced by AS602868 (Fig. 3B). These results show that the IKK2 inhibitor, AS602868, activated a caspase-dependent cell death pathway in myeloma cells.

AS602868 decreases paracrine IL-6 production in the bone marrow environment. Because IL-6 is a major paracrine growth factor in MM, we next sought to establish the effect of AS602868 on IL-6 production by BMSC either alone or in coculture with MM.1S cells. We observed that AS602868 significantly decreased the constitutive production of IL-6 proteins by BMSC (decrease of 23.9% and 38.8% in the two representative experiments shown in Fig. 3C). Interestingly, the IKK2 inhibitor also strongly inhibited IL-6 production in BMSC/MM.1S coculture experiments (decrease of 51.8% and 90.5% in the two representative experiments shown in Fig. 3C).

AS602868 inhibits *in vivo* myeloma cell growth. Finally, the effect of the IKK2 inhibitor was evaluated *in vivo* on an established MM xenograft model (MM.1S) in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. Both groups of mice (control and AS602868-treated groups) were monitored over a period of 24 days and mean tumor size values were reported in Fig. 3D. AS602868 administrated by oral gavage was well tolerated in mice at a dose of 100 mg/kg. Importantly, AS602868 significantly decreased myeloma tumor size from days 18 to 24 of treatment ($P < 0.05$ at day 18 and $P < 0.01$ at days 21 and 24).

AS602868 synergizes with TRAIL to induce apoptosis in myeloma cells. Although TRAIL is considered as an attractive target in MM therapy, MM cells are inequally sensitive to TRAIL-induced apoptosis. Then, we tested whether the IKK2 inhibitor, AS602868, might sensitize them to TRAIL's apoptotic effect.

HMCLs were incubated with recombinant TRAIL (100 or 10 ng/mL, depending on the TRAIL sensitivity of each HMCL) for 48 h in the presence or absence of AS602868 at the sub-optimal dose of 5 μ mol/L. Apoptotic cells were then assessed by Apo2.7 immunostaining and flow cytometry analysis. As shown in Fig. 4A, in all HMCLs tested ($n = 10$), AS602868 strongly increased HMCL response to TRAIL-induced apoptosis (mean = $19.3 \pm 16.6\%$ of apoptotic cells in TRAIL-treated HMCLs versus $47.4 \pm 17.2\%$ in TRAIL + AS602868-treated HMCLs, whereas AS602868 induced $9 \pm 4.2\%$ of apoptotic cells in this panel).

Interestingly, as presented for four patients in Fig. 4B, AS602868 also synergized with TRAIL to specifically induce apoptosis in primary myeloma cells incubated with total bone marrow cells. Dot plots obtained by flow cytometry analysis for patient 2 illustrated specific apoptosis triggered by drugs in Fig. 4C.

Moreover, caspase-3 cleavage detectable in AS602868-treated XG6 cells but not in TRAIL-treated cells, was strongly enhanced in TRAIL + AS602868-treated cells (Fig. 5B). These results show that TRAIL and the IKK2 inhibitor strongly synergize to induce myeloma cell death.

To better understand the mechanisms involved in the apoptotic synergy between TRAIL and AS602868, we evaluated the ability of TRAIL to induce NF- κ B activation in MM cells. In TRAIL- and/or AS602868-treated cells, we also assessed p65 localization, the phosphorylation levels of I κ B α protein (P-I κ B α), and the expression levels of various NF- κ B-regulated proteins which play a role in cell proliferation (c-myc) or in tumor survival, and chemoresistance or radioresistance (c-FLIP_L, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, Mcl-1, Bcl-x_L, and Bcl-2). Confocal microscopy analysis first indicated intrinsic NF- κ B activation because p65 was found in the nucleus as well as in the cytoplasm of control cells. Second, this experiment suggested that TRAIL promoted p65 nuclear localization and that AS602868 abrogated both basal and TRAIL-induced p65 translocation (Fig. 5A). Moreover, immunoblot analysis showed that TRAIL treatment strongly enhanced P-I κ B α protein levels in MM cells, as shown in XG6 cells, indicating that TRAIL was indeed able to activate NF- κ B pathway in MM cells (Fig. 5B). Importantly, AS602868, which alone decreased P-I κ B α level,

completely abrogated the induction of TRAIL-dependent P-I κ B α levels. Interestingly, AS602868 also significantly decreased the NF- κ B-regulated proteins c-myc, c-FLIP_L, and cIAP-1/2 in these cells, as well as slightly decreasing Mcl-1 and XIAP levels, at least by cleavage of the full-length protein (asterisks on Fig. 5B). TRAIL and AS602868 combination strongly decreased the expression of c-myc and of the antiapoptotic proteins c-FLIP_L, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, and Bcl-x_L but not Bcl-2. Similar results were obtained in other HMCLs. These results argue for the potent synergy of the TRAIL/AS602868 combination for the extinction of antiapoptotic and proliferative proteins.

Discussion

Constitutive activation of NF- κ B has been described in many hematologic malignancies leading to the proposition that targeting the NF- κ B pathway may provide benefits in therapeutic strategies, particularly in oncohematology. In the present study, we show that the IKK2 inhibitor AS602868 decreases myeloma cell growth both *in vitro* and *in vivo*, targets the

paracrine effects of the bone marrow environment, and sensitizes myeloma cells to TRAIL proapoptotic effects. These results strongly argue for further studies to suppress NF- κ B activity as a MM therapeutic strategy.

We first show the ability of AS602868 to interfere with NF- κ B activation in myeloma cells. Indeed, this inhibitor decreased either NF- κ B-binding activity or nuclear translocation of both NF- κ B subunits p50 and p65, respectively. It also decreased constitutive phospho-I κ B α levels. These data corroborate those of Frelin et al. (8) who showed the decrease of NF- κ B activation in acute myeloid leukemia cells treated with AS602868, and by electrophoretic mobility shift assay in parallel with the inhibition of IKK2 phosphorylation. In addition, AS602868 completely blocked TNF α -induced expression of ICAM-1 on myeloma cells, a well-known target of NF- κ B (24). Moreover, the apoptotic effect of TNF α on myeloma cells was revealed by AS602868 treatment as previously observed in Jurkat cells (20). These results underscore the effect of TNF α in both caspase-8-dependent proapoptotic and NF- κ B-dependent survival pathways in myeloma cells and that the NF- κ B inhibitor tilts the balance towards apoptosis. Taken together, these results

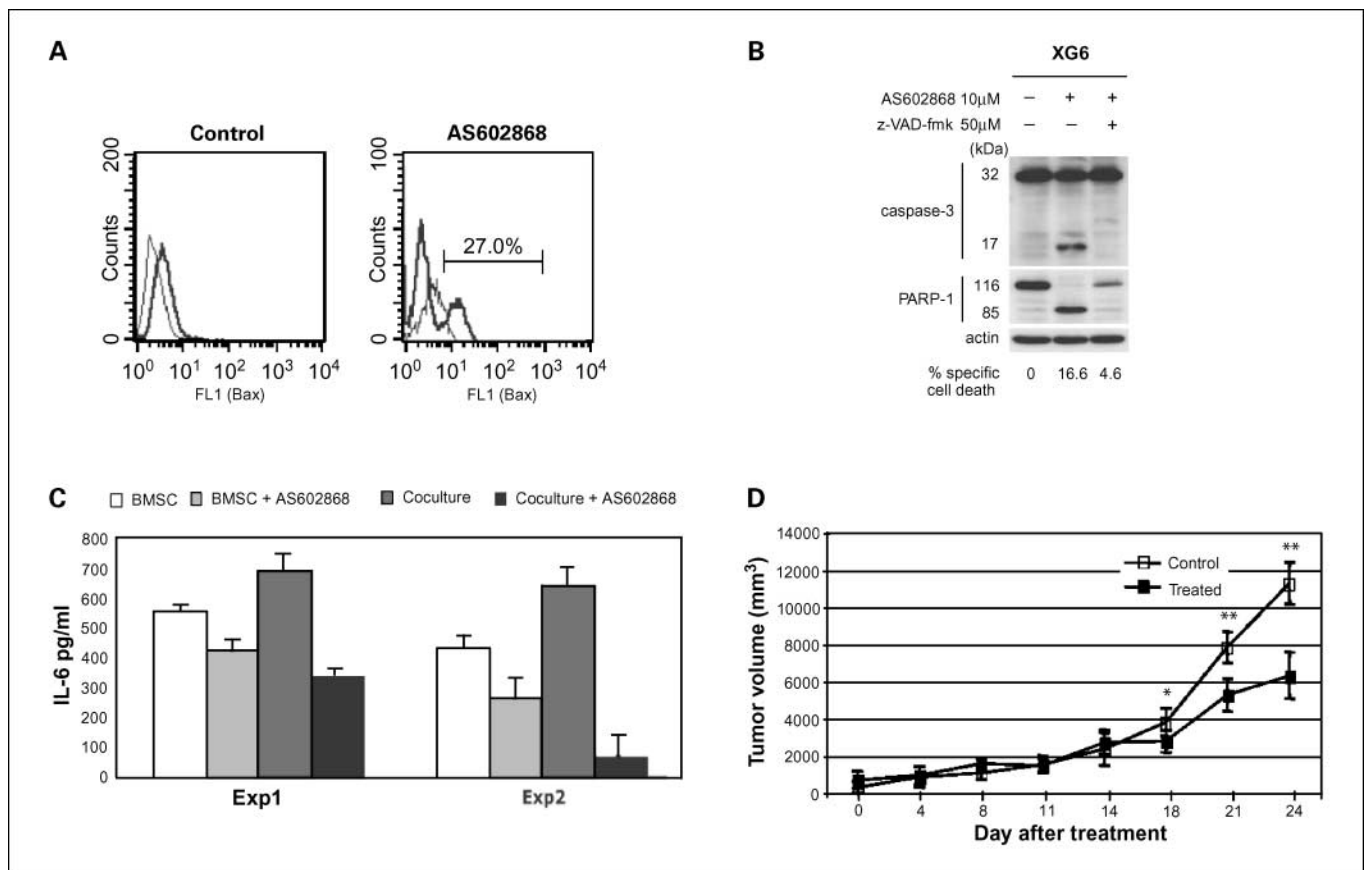


Fig. 3. AS602868 induces apoptosis through Bax activation, targets the bone environment, and inhibits tumorigenesis. **A**, Bax activation was assessed in XG6 cells by flow cytometry analysis using the 6A7 clone monoclonal antibody specifically recognizing the activated form of Bax. Cells were treated for 48 h with or without AS602868 at 10 μ M/L. The percentage of Bax-positive cells is indicated. Thin lines, IgG₁ isotypic control; thick lines, conformationally active Bax. **B**, caspase-3 and PARP-1 cleavages were determined by immunoblot analysis in XG6 cells treated by AS602868 (10 μ M/L) for 48 h, preincubated or not for 1 h with the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk (50 μ M/L), in comparison with nontreated control cells. Actin was used as the quantitative control of loaded proteins. The percentage of specific cell death is indicated in both conditions compared with control condition. **C**, IL-6 production was measured by ELISA in supernatants of BMSC culture and BMSC + MM.1S coculture in the presence or absence of AS602868 at 10 μ M/L for 48 h. Two independent experiments were done in triplicate (columns, means; bars, SD). **D**, myeloma (MM.1S) bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice were treated for 24 d as indicated in the Materials and Methods. Two groups of mice received either the IKK2 inhibitor ($n = 6$) or the corresponding vehicle ($n = 6$). Tumor size was measured in two dimensions using a caliper, and tumor volume (mm³) was calculated. Tumor sizes were calculated in each group at each time point (points, means; bars, SD). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

strongly argue for potent blockade of the canonical NF- κ B pathway by AS602868 in myeloma cells.

Interestingly, AS602868 seemed to have an important inhibiting activity on myeloma cell growth, in a range of concentrations close to those determined in acute myeloid leukemia cells (0.6-14 μ mol/L; ref. 8). Importantly, AS602868 also inhibited the cell growth of primary myeloma cells even in the presence of exogenous IL-6 or in patients in relapse. Thus, the canonical NF- κ B pathway clearly takes part in myeloma cell growth as recently described in B-CLL (11). In addition, in our study, AS602868 specifically induced apoptosis in primary myeloma cells among total bone marrow mononuclear cells, suggesting that this molecule may selectively target myeloma cells. Nevertheless, further experiments would be necessary to precisely define the sensibility of CD34+ hematopoietic stem cells. Actually, in an abstract presented at the 2006 American Society of Hematology meeting, Jourdan et al. noticed that the IKK2 inhibitor induced growth inhibition in myeloma cells but also altered the survival of CD34+ cells among bone marrow cells (25). However, this potential cytotoxic effect of AS602868 was not reported by Frelin et al. in acute myeloid leukemias (8).

Decreased cell growth observed in myeloma cells was associated with the induction of apoptosis. To define the molecular apoptotic mechanisms triggered by AS602868, we studied Bax and caspase-3 activation and we showed that both mechanisms were induced. In addition, the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk protected myeloma cells from AS602868-induced cell death as well as caspase-3 and PARP-1 cleavage. Moreover, AS602868 efficiently decreased the expression of endogenous inhibitors of caspases cIAP-1/2 and promoted cleavage in inactive fragments of both XIAP and Mcl-1, the most potent endogenous caspase inhibitor and the major regulator of mitochondrial proapoptotic activity in MM cells, respectively (26). It also inhibited the expression of c-FLIP_L, which is an important NF- κ B-regulated antiapoptogenic protein involved in TRAIL resistance through the suppression of either recruitment of procaspase-8 by FADD or autocatalytic activation of caspase-8. Altogether, these data indicate that inhibition of NF- κ B in myeloma cells activated the mitochondrial cell death pathway leading to caspase cascade activation and caspase-dependent cell death and may promote an extrinsic caspase-8-dependent apoptotic pathway. In acute myeloid leukemia blasts, AS602868 also induced a strong apoptotic response related to mitochondrial potential failure and activation of caspases (8). Finally, the proliferative c-myc protein level was also down-regulated and might favor cell growth inhibition by AS602868. In addition, we observe that AS602868 targeted the bone marrow environment in decreasing paracrine IL-6 production by BMSC which supports myeloma cell growth. Importantly, we show that AS602868, by itself, inhibits tumor size in a xenograft model of MM.1S

nisms were induced. In addition, the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk protected myeloma cells from AS602868-induced cell death as well as caspase-3 and PARP-1 cleavage. Moreover, AS602868 efficiently decreased the expression of endogenous inhibitors of caspases cIAP-1/2 and promoted cleavage in inactive fragments of both XIAP and Mcl-1, the most potent endogenous caspase inhibitor and the major regulator of mitochondrial proapoptotic activity in MM cells, respectively (26). It also inhibited the expression of c-FLIP_L, which is an important NF- κ B-regulated antiapoptogenic protein involved in TRAIL resistance through the suppression of either recruitment of procaspase-8 by FADD or autocatalytic activation of caspase-8. Altogether, these data indicate that inhibition of NF- κ B in myeloma cells activated the mitochondrial cell death pathway leading to caspase cascade activation and caspase-dependent cell death and may promote an extrinsic caspase-8-dependent apoptotic pathway. In acute myeloid leukemia blasts, AS602868 also induced a strong apoptotic response related to mitochondrial potential failure and activation of caspases (8). Finally, the proliferative c-myc protein level was also down-regulated and might favor cell growth inhibition by AS602868. In addition, we observe that AS602868 targeted the bone marrow environment in decreasing paracrine IL-6 production by BMSC which supports myeloma cell growth. Importantly, we show that AS602868, by itself, inhibits tumor size in a xenograft model of MM.1S

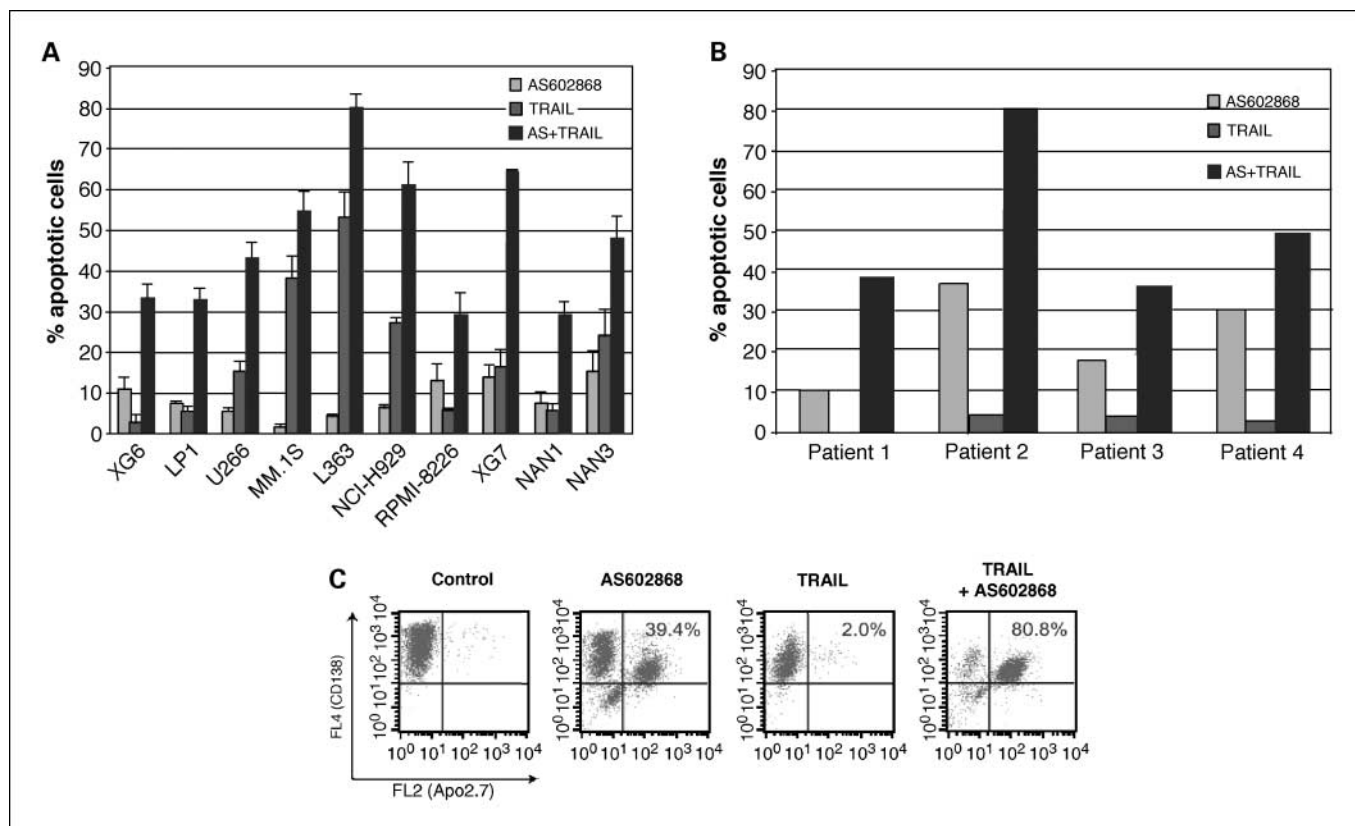
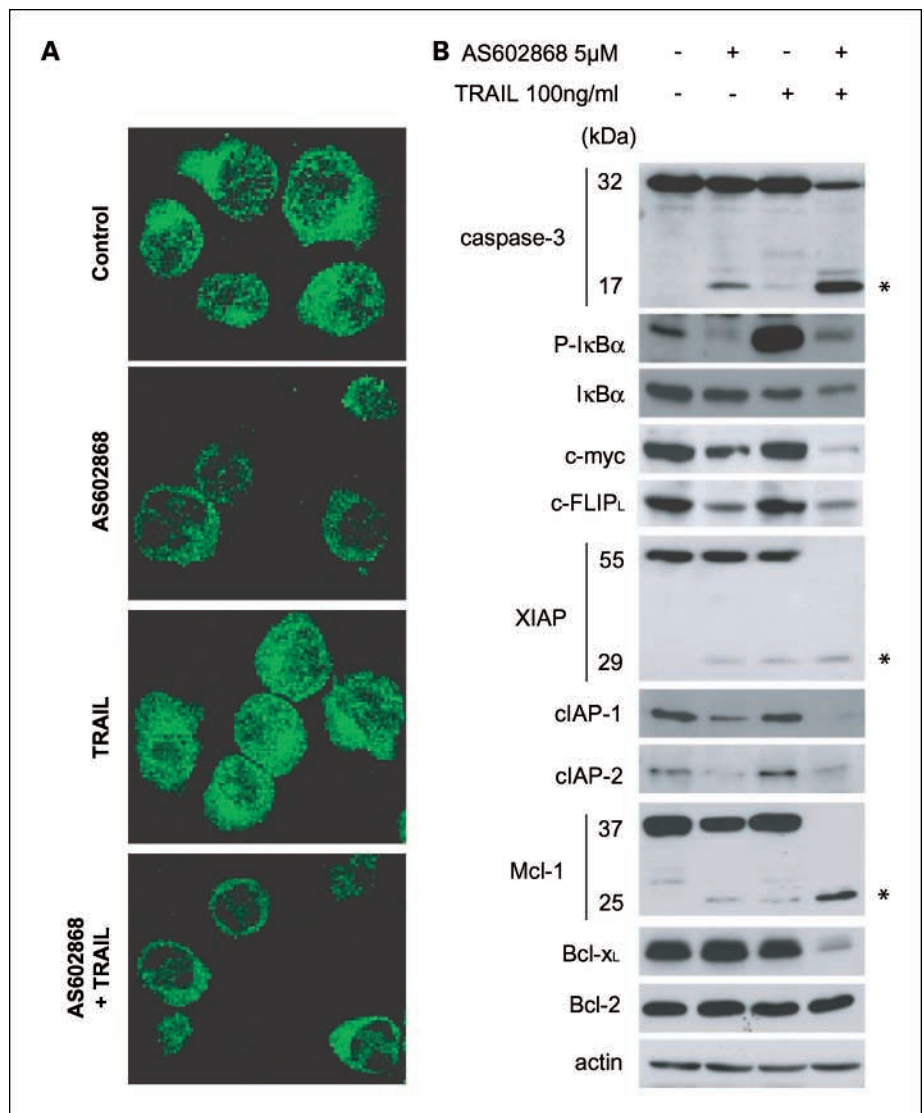


Fig. 4. AS602868 synergizes with TRAIL to induce cell death in myeloma cells. **A**, HMCLs were incubated with recombinant TRAIL (100 ng/mL for XG6, LP1, U266, MM.1S, and L363 or 10 ng/mL for NCI-H929, RPMI 8226, XG7, NAN1, and NAN3) in combination or not with AS602868 (5 μ mol/L) for 48 h. After flow cytometry analysis, the percentage of Apo2.7-positive cells was calculated for each treated HMCL compared with nontreated control cells (columns, means; bars, SD; $n = 3$). **B** and **C**, total bone marrow mononuclear cells from four patients with MM were incubated with or without AS602868 (10 μ mol/L) in the presence or absence of TRAIL (100 ng/mL) for 48 h. Then the proportion of apoptotic myeloma cells was measured by specific coexpression of CD38- and CD138-targeting myeloma cells and Apo2.7 as analyzed by flow cytometry. Four different samples from patients (patients 1-4) with MM were presented in the histogram (**B**) and one patient (patient 2) in the dot plot (**C**). AS, AS602868.

Fig. 5. AS602868 promotes TRAIL-induced apoptosis through inhibition of TRAIL-induced NF- κ B activation and decrease of NF- κ B regulated protein expression. **A**, subcellular localization of p65 NF- κ B subunits was evaluated by immunofluorostaining and monitored by confocal microscopy. XG6 cells were treated with or without AS602868 at 10 μ mol/L for 18 h before the addition or not of TRAIL at 100 ng/mL for 1 h. Results from a representative experiment ($n = 3$) are shown. **B**, level of NF- κ B activation (P -I κ B α) and expression of the proliferative protein (c -myc) and proapoptotic molecules (caspase-3, cFLIP $_L$, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, Bcl-x $_L$, and Bcl-2) were determined by immunoblot analysis in XG6 cells treated with or without AS602868 (5 μ mol/L), TRAIL (100 ng/mL), or the combination of AS602868 + TRAIL for 48 h. Results from a representative experiment ($n = 3$) are shown. *, cleaved form of caspase-3, XIAP, and Mcl-1.



myeloma cells when orally administrated, without apparent toxicity.

TRAIL can selectively induce apoptosis in cancer cells and emerges as an attractive targeted therapy in MM. However, heterogeneous TRAIL sensitivity has been previously observed in HMCLs (16, 18, 19, 27), but the mechanisms underlying TRAIL resistance have not been resolved. In addition to inducing apoptosis by caspase-8 recruitment through FADD, TRAIL binding to its receptors might also lead to NF- κ B activation through TRADD (28, 29). We then wondered whether the combination of TRAIL and AS602868 might induce synergy in death response in MM cells. We indeed show that interrupting the NF- κ B pathway with AS602868 strongly sensitized myeloma cells to lethal action of TRAIL in HMCLs and in primary myeloma cells, and even overcame TRAIL resistance. These effects were also observed when using the agonist monoclonal antibody HGS-ETR1 or HGS-ETR2, targeting the TRAIL receptors DR4 and DR5, respectively, in combination with AS602868 (data not shown). Interestingly, we point out for the first time that TRAIL potently activated the NF- κ B pathway in MM cells. Indeed, NF- κ B activation was detectable as early as 1 hour after

TRAIL treatment (data not shown). Importantly, NF- κ B inhibitor completely prevented cells from TRAIL-induced NF- κ B activation. Therefore, inhibition of TRAIL-induced NF- κ B activation by AS602868 associates with high increase of TRAIL proapoptotic capacity. Strongly decreased expression of the antiapoptotic proteins c-FLIP $_L$, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, and Bcl-x $_L$ was detected in MM cells when treated by the drug combination. XIAP and Mcl-1 decrease resulted from the cleavage of the full-length corresponding proteins, as previously observed for Mcl-1 (19). Of note, it has been recently shown that silencing c-FLIP $_L$ sensitized myeloma cells to TRAIL (30). Moreover c-FLIP $_L$ levels also regulate TRAIL sensitivity in mantle cell lymphoma B cells and the decrease of c-FLIP $_L$ by IKK inhibition sensitized these cells to TRAIL (31). Such an effect may occur in myeloma cells treated with AS602868, which decreased c-FLIP $_L$ expression, promoting caspase-8-dependent apoptotic pathways induced by TRAIL. In contrast to the proteasome inhibitor bortezomib that up-regulates DR5 expression (32), expression of the TRAIL receptors DR4 and DR5 was not modulated by the NF- κ B inhibitor (data not shown). Altogether, these results point out that TRAIL resistance occurs

at least through the activation of the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells, and suggests that AS602868 enhanced TRAIL's apoptotic effect in myeloma cells at least through c-FLIP_L down-regulation. In addition, some reports showed interest in inhibiting NF- κ B in order to increase drug sensitivity in myeloma cells. Indeed, Dai et al. previously reported that the pharmacologic NF- κ B inhibitor Bay-11-7082 increased the sensitivity of myeloma cells to the checkpoint inhibitor UCN-01 (33). Bharti et al. also showed that curcumin (diferuloylmethane) inactivated NF- κ B and potentiated the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents (34), and Mitsiades et al. reported that the NF- κ B inhibitory peptide SN50 enhanced doxorubicine's effect on myeloma cells (35). These effects might be related to the NF- κ B activation frequently induced by drugs in treated cells.

Altogether, our data underscore the central role for NF- κ B in MM. Indeed, NF- κ B participated in (a) myeloma cell survival, (b) tumorigenesis, (c) resistance to TRAIL-induced apoptosis, and (d) in protumoral activation of the bone marrow environment. These findings suggest that a strategy combining anti-MM drugs with NF- κ B inhibitors warrants attention in the treatment of MM and may constitute an additional approach to the oncologist's armamentarium.

Acknowledgments

We thank Viviane Dubrille for providing bone marrow samples from patients with MM, Céline Seveno for her help in confocal analysis, and GEFLUC for financial support.

References

- Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280–8.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004;18:2195–224.
- Yemelyanov A, Gasparian A, Lindholm P, et al. Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF- κ B function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2006;25:387–98.
- Braun T, Carvalho G, Fabre C, Grosjean J, Fenaux P, Kroemer G. Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. *Cell Death Differ* 2006;13:748–58.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301–10.
- Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431–6.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005;5:297–309.
- Frelin C, Imbert V, Griessinger E, et al. Targeting NF- κ B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2005;105:804–11.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005;11:28–40.
- Braun T, Carvalho G, Coquelle A, et al. NF- κ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;107:1156–65.
- Endo T, Nishio M, Enzler T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood* 2007;109:703–10.
- Ni H, Ergin M, Huang Q, et al. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in multiple myeloma: downregulation of NF- κ B induces apoptosis. *Br J Haematol* 2001;115:279–86.
- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 2002;277:16639–47.
- Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 2003;171:3863–71.
- Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B. *Blood* 1996;87:1104–12.
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001;98:795–804.
- Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* 1999;13:1817–24.
- Spencer A, Yeh SL, Koutrevelis K, Baulch-Brown C. TRAIL-induced apoptosis of authentic myeloma cells does not correlate with the procaspase-8/cFLIP ratio. *Blood* 2002;100:3049–50.
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, et al. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 2006;108:1346–52.
- Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Loubat A, Dreano M, Peyron JF. AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF- α in Jurkat leukemic cells. *Oncogene* 2003;22:8187–94.
- Bataille R, Jego G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234–40.
- Barille S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 1999;163:5723–8.
- Jego G, Robillard N, Puthier D, et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 1999;94:701–12.
- Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001;20:4519–27.
- Jourdan M, Moreaux J, Hose D, et al. Inhibition of multiple myeloma cells growth by AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2 [abstract 3472]. *Blood* 2006;108.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002;100:194–9.
- Mitsiades N, Mitsiades C, Anderson KC, Treon SP. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is modulated by FLICE-inhibitory protein (FLIP) and procaspase-8 in multiple myeloma cells. *Blood* 2002;200:3049–51.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 1997;7:821–30.
- Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nat Cell Biol* 2001;3:409–16.
- Fandy TE, Ross DD, Gore SD, Srivastava RK. Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIP(L). *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60:313–9.
- Roue G, Perez-Galan P, Lopez-Guerra M, Villamor N, Campo E, Colomer D. Selective inhibition of I κ B kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J Immunol* 2007;178:1923–30.
- Liu X, Yue P, Chen S, et al. The proteasome inhibitor PS-341 (Bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Res* 2007;67:4981–8.
- Dai Y, Pei XY, Rahmani M, Conrad DH, Dent P, Grant S. Interruption of the NF- κ B pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2761–70.
- Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003;101:1053–62.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Biologic sequelae of nuclear factor- κ B blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002;99:4079–86.

ANNEXE 2 : REVUE

Revue intitulée « **La survivine en cancérologie : aspects moléculaires et applications thérapeutiques** ».

Sous presse, Médecine Sciences.

La survivine en cancérologie :
Check-up pour son dixième anniversaire
Aspects moléculaires et applications thérapeutiques

Titre en anglais :

Survivin in cancerology : check-up for its tenth anniversary

Mathilde Romagnoli ^{*,1}, Céline Séveno ^{*,1}, Régis Bataille ¹ et Sophie Barillé-Nion ¹

* Co-auteurs,

¹ INSERM, Université de Nantes, UMR 601, 9 quai Moncousu, Nantes F-44093, France

Résumé : Découverte il y a dix ans, la survivine s'avère orchestrer à la fois le cycle et la mort cellulaires, deux fonctions particulièrement dérégulées dans les cellules cancéreuses. Présente au cours du développement embryonnaire, puis absente des tissus différenciés adultes, la survivine est fortement exprimée dans la plupart des tumeurs mettant en jeu des voies d'activation diverses. Grâce aux nombreux travaux réalisés en recherche fondamentale, sa capacité à interagir avec différents partenaires moléculaires et sa distribution subcellulaire originale commencent à être mieux appréhendées. Ses propriétés pro-oncogéniques multiples et sa valeur pronostique démontrée dans divers cancers ont fait de la survivine une cible anti-tumorale particulièrement attractive dont les premiers essais cliniques semblent prometteurs.

Abstract: Discovered 10 years ago, survivin has a dual role in the smooth progress of mitosis and in apoptosis resistance. Survivin plays an important physiological role in development, but is absent in differentiated adult tissues. In contrast, aberrant survivin expression is found in most human cancers because of various signalling pathways. A complex survivin network appears to intersect multiple pathways in cell biology, related to several molecular partners and fine subcellular localizations. Based on its pro-oncogenic properties, basic and translational research have shown a growing interest in survivin study that has led to consider survivin as a prognostic marker and a promising target for anti-tumoral therapies.

Introduction

Découverte il y a 10 ans [1], la survivine a rapidement attiré l'attention de la communauté scientifique par sa biologie fascinante et son potentiel thérapeutique en cancérologie. Conservée au cours de l'évolution, la survivine appartient à la famille des IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins), définie par le domaine structurel BIR caractérisé à l'origine chez le baculovirus pour son rôle dans la protection vis-à-vis de l'apoptose. Initialement décrite comme acteur de la survie des cellules cancéreuses, ce qui lui valut son nom, la survivine se place en fait au carrefour de la régulation de processus cellulaires essentiels: cycle et mort cellulaires. La majorité des tumeurs, solides ou hématopoïétiques, l'exprime de façon aberrante et des études génomiques l'identifient comme le 4^e gène spécifique de tumeur [2]. La survivine possède également un rôle physiologique majeur lors du développement, les souris knock-out pour cette protéine ne survivant pas au delà du 5^e jour embryonnaire [3]. En revanche, la survivine n'est pas ou peu exprimée dans les tissus différenciés adultes. En cancérologie, de nombreuses études démontrent l'intérêt pronostique de la survivine et son expression préférentielle dans les tumeurs en fait une cible thérapeutique attractive actuellement en cours d'évaluation clinique. Dans cette revue, nous aborderons les causes et les conséquences de l'expression aberrante de la survivine dans les cellules tumorales. Nous ferons le bilan des mécanismes moléculaires de la survivine qui participent au cycle cellulaire, et détaillerons ceux encore en cours d'exploration, impliqués dans la résistance à l'apoptose. Les fonctions multiples de la survivine la projettent au coeur d'un réseau fonctionnel pro-tumoral et la désignent comme cible thérapeutique particulièrement pertinente dans le cancer [4]. Nous évoquerons donc son intérêt pronostique en cancérologie et les applications thérapeutiques qui découlent des nombreux travaux de recherche menés depuis 10 ans.

La survivine dans les cancers : les causes de sa surexpression

La survivine est une petite protéine de 16,5 kDa, de ½ vie courte (30 minutes) et composée de trois domaines principaux : un domaine BIR en N-terminal, une extrémité C-terminale en hélice α et entre les deux un domaine NES d'exportation hors du noyau (Figure 1). L'étude de son promoteur a fourni de nombreuses informations sur la régulation de ce gène. Tout d'abord, les régions CDE/CHR sont impliquées dans la régulation de son expression au cours du cycle cellulaire. Ainsi, la survivine montre un pic en phase G2/M en relation directe avec sa fonction de régulateur mitotique. La voie Rb/E2F participe également à la régulation de son expression, notamment lors de la transition G1/S. Cependant, dans les cellules tumorales, la survivine est exprimée de manière aberrante, indépendamment du cycle cellulaire [5]. En effet, d'un côté, l'expression de la survivine est induite par de nombreuses voies de signalisation (STAT3, PI3K, NF- κ B) ou oncogènes (Myc, ErbB2...)

fréquemment dérégulés ou amplifiés dans les cancers. D'un autre côté, son expression n'est plus réprimée par des suppresseurs de tumeur souvent non fonctionnels dans les cellules cancéreuses (p53, Rb). Des anomalies génétiques (amplification) et épigénétiques (hypométhylation) du gène *survivine* peuvent également être à l'origine de sa surexpression. Quatre variants (2B, ΔEx3, 3B et 2α) de la survivine obtenus par épissage alternatif ont été décrits, mais à des niveaux nettement inférieurs à ceux de la survivine. Une étude récente montre que seul le variant 3B possède des propriétés biologiques proches de celles de la survivine [6]. Enfin, des mécanismes post-traductionnels régulent la stabilité de la protéine : (1) phosphorylation en T34 par Cdk1 au cours des phases G2/M [7] et (2) polyubiquitination sur plusieurs de ses résidus lysines (la survivine en possède 16) à travers des liaisons K48 permettant sa dégradation par le protéasome en fin de mitose [8], processus inhibé par son interaction avec Hsp90 [9]. Ces différents mécanismes entraînent une expression soutenue de la survivine dans les cellules cancéreuses indépendamment du cycle cellulaire, leur procurant un avantage de croissance (mitose et survie) [5].

Son rôle dans le déroulement du cycle cellulaire

La survivine est un régulateur important de la mitose. En effet, elle intervient en tant que membre du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) avec les deux autres protéines, INCENP et boréoline, régulatrices de la kinase mitotique Aurora-B (pour revue : [10]). Le CPC est localisé au niveau des chromosomes en prophase, des centromères en métaphase, des cortex et fuseau équatoriaux en anaphase et du pont intercellulaire en télophase. Il assure le déroulement correct de la mitose : régulation de la structure des chromosomes et du fuseau mitotique, ségrégation correcte des chromatides sœurs et achèvement de la cytodierèse. Lors du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique en métaphase, le CPC contrôle la tension de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique. La survivine est fortement impliquée dans la localisation du CPC. Sa phosphorylation en T117 par Aurora-B [11] et sa polyubiquitination à travers des liaisons K63 (sans impact sur sa dégradation par le protéasome) [12] régulent la dynamique de sa localisation au centromère. INCENP et boréoline interviennent eux aussi dans la localisation du CPC [13].

En plus de son rôle canonique dans la mitose, la survivine possède un rôle lors de la transition G1/S. En effet, elle est nécessaire à l'entrée en cycle des cellules murines normales telles que les précurseurs hématopoïétiques soumis aux cytokines ou les lymphocytes T lors de leur activation. De plus, dans les cellules tumorales, la survivine forcerait la transition G1/S en absence de facteurs de croissance, en déplaçant les inhibiteurs des Cdk (p16^{INK4a}, p21^{Cip} et p27^{Kip1}) des complexes Cycline-Cdk [14]. Nous-

mêmes observons que la survivine soutient la croissance des cellules myélomateuses humaines en absence d'interleukine-6, leur facteur majeur de croissance (manuscrit soumis).

Un dialogue entre cycle cellulaire et survie

La survivine assurerait le lien entre prolifération et survie au cours du cycle. En effet, dans les cellules tumorales en cycle, la survivine étant à son niveau maximal, elle peut agir à la fois dans le déroulement correct de la mitose et dans le blocage de la catastrophe mitotique (apoptose durant la mitose) à un moment où la cellule cancéreuse est fragilisée par son instabilité chromosomique. Dès la phase G2, le complexe CyclineB1-Cdk1 phosphoryle la survivine en T34 situé dans le domaine BIR, favorisant des interactions protéiques impliquées dans la séquestration d'acteurs majeurs de l'apoptose : la caspase-3 avec p21^{Cip} dans les centrosomes [15], et la caspase-9 au niveau des microtubules [7]. De plus, le complexe survivine-Aurora-B est impliqué dans la régulation des protéines de la famille Bcl-2 au cours de la mitose, notamment en phosphorylant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et inactivant la protéine pro-apoptotique Bax. Ceci maintiendrait l'intégrité de la mitochondrie nécessaire à la survie de la cellule tumorale [16] (Figure 2). Enfin, la kinase Chk2 activée lors d'un dommage à l'ADN pour bloquer le cycle afin de permettre la réparation de l'ADN, interviendrait également dans la libération d'une fraction mitochondriale de survivine spécialisée dans le blocage de l'apoptose (voir § localisation subcellulaire) [17]. La fonction de la survivine dans la survie au cours de la mitose semble particulièrement importante dans les cellules cancéreuses qui ont une activité proliférative soutenue.

La survivine contre la mort cellulaire

L'activité anti-apoptotique de la survivine est largement démontrée aussi bien dans les cellules cancéreuses par l'utilisation d'antagonistes moléculaires (antisens, ARN interférence...) *in vitro* et *in vivo* que dans les cellules normales par des modèles d'animaux hétérozygotes survivine^{+/-}. Cette activité est essentielle au cours de la mitose et l'est aussi au cours de l'interphase particulièrement dans les cellules cancéreuses qui expriment la survivine de façon aberrante indépendamment du cycle. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas totalement élucidés et de nombreux travaux essaient de les démêler actuellement. Malgré la présence d'un domaine BIR, des études à la fois structurales et biochimiques éliminent définitivement l'hypothèse selon laquelle la survivine pourrait se lier de façon stable aux caspases et les inhiber directement comme cela est clairement démontré pour XIAP, membre de la famille des IAP et puissant inhibiteur direct des caspases. La survivine inhiberait les caspases de façon indirecte avec l'aide d'autres partenaires [18]. De plus, la survivine bloquerait la mort cellulaire indépendante des caspases notamment en inhibant la libération du facteur mitochondrial pro-apoptotique AIF

[19] (Figure 2). Enfin, la survivine participerait aussi à la survie en régulant les processus de réparation de l'ADN et le métabolisme cellulaire en réponse à un stress [20].

La survivine préfère la coopération dans le blocage de l'apoptose

L'étude de « l'interactome » de la survivine ouvre un champ riche d'investigations [21]. Le domaine BIR de la survivine lui permet de former des homodimères et d'interagir avec plusieurs partenaires moléculaires impliqués eux-mêmes dans le contrôle de l'apoptose (Figure 2). D'une part, la survivine favorise l'activité anti-apoptotique de XIAP par deux mécanismes : (1) le complexe survivine/XIAP protège ce dernier de sa dégradation par le protéasome [22], (2) la survivine neutralise Smac, un inhibiteur de XIAP libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose [23]. Cependant, l'activité anti-apoptotique du complexe survivine/XIAP peut être contrecarrée par XAF-1, autre inhibiteur de XIAP, qui entraîne la dégradation de la survivine [24]. D'autre part, la survivine pourrait participer à la régulation de la perméabilité mitochondriale en interagissant avec Bax, un complexe observé dans les cellules myélomateuses (données personnelles). Enfin, la survivine semble impliquée dans l'installation d'un environnement permissif pro-oncogénique associé à l'adaptation aux stress cellulaires en formant des complexes stables avec la protéine chaperonne Hsp90 [9], ou encore avec HBXIP du virus de l'hépatite B impliqué dans les cancers du foie [25].

LIEN ENTRE LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET BLOCAGE DE L'APOPTOSE

La localisation subcellulaire de la survivine et sa fonction sont étroitement liées. En effet, il a été montré que l'exportation de la survivine hors du noyau, grâce notamment au transporteur Crm1, était indispensable à son activité anti-apoptotique dans les cellules interphasiques [26]. De plus, une fraction de survivine située dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie a été spécifiquement identifiée dans des lignées tumorales [27]. Bien que la survivine ne possède pas de séquence d'import mitochondrial, son association avec Hsp90 pourrait lui permettre d'entrer dans la mitochondrie [9]. Dans ce compartiment, la survivine séquestrerait Smac en l'empêchant d'être libéré lors de l'apoptose [28]. La survivine mitochondriale pourrait aussi être libérée dans le cytoplasme au cours de l'apoptose et ainsi interagir avec XIAP pour le stabiliser. La mitochondrie serait alors un passage important pour la survivine car elle y est déphosphorylée en S20, une modification essentielle pour son interaction avec XIAP [29] (Figures 1 et 2). Ainsi, lors d'un stress cellulaire, la libération de la survivine mitochondriale limiterait l'amplification du processus apoptotique. Cette localisation confère donc un avantage aux cellules tumorales vis-à-vis de l'apoptose, et ceci indépendamment du cycle cellulaire.

La survivine comme marqueur pronostique : un bon tuyau ?

Plusieurs modèles animaux transgéniques comme celui du mélanome soulignent l'importance de la survivine dans la prédisposition à l'apparition de cancers [30]. En clinique humaine, l'expression aberrante de la survivine dans les tumeurs a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré sa corrélation avec la progression de la maladie et un pronostic défavorable (pour revue [31]). Nous avons également observé cette corrélation dans le myélome multiple [32]. Néanmoins, la localisation cytoplasmique ou nucléaire associée à ce pronostic diffère (Tableau I) et aucune donnée n'est encore disponible sur la valeur prédictive de la survivine mitochondriale. Des études complémentaires utilisant des protocoles standardisés devront être réalisées pour conclure sur ce sujet.

Certaines études se sont également attachées à étudier le rôle de la survivine en tant que marqueur prédictif de l'efficacité des thérapies anti-tumorales (pour revue : [33]). Des études *in vitro* montrent que la survivine est fortement exprimée dans des lignées cellulaires radio ou chimio-résistantes. Chez les patients, l'expression aberrante de la survivine est ainsi corrélée à la résistance au taxol pour les carcinomes ovariens ou au cisplatine pour les cancers de l'estomac et de la vessie. Elle est également associée à une résistance aux traitements hormonaux dans les cancers du sein et de la prostate. De plus, l'expression de la survivine est induite par des traitements anti-cancéreux tel que le cisplatine. La survivine jouerait donc un rôle dans la résistance aux traitements à la fois *de novo* et acquise.

En plus de son intérêt pronostique, la survivine semble également utilisable en clinique en tant que biomarqueur urinaire dans le cancer de la vessie [34] et indicateur de rechute dans le cancer du sein [35].

La survivine : une cible prometteuse

L'expression préférentielle de la survivine dans les tissus tumoraux en fait une cible thérapeutique potentielle particulièrement pertinente (Tableau II). De plus, la survivine étant également exprimée par les cellules endothéliales lors de l'angiogénèse [36], son inhibition permettrait de cibler aussi bien la tumeur que les néovaisseaux associés.

Plusieurs inhibiteurs ciblant l'expression ou la fonction de la survivine sont actuellement en cours de développement clinique (pour revue : [37]). Récemment, la molécule YM155, inhibiteur direct de la transcription du gène *survivine*, a permis d'induire une régression tumorale importante chez des patients au cours d'essais de phase I [38]. Par ailleurs, l'inhibition de la traduction de la survivine permettait d'obtenir une augmentation de l'apoptose spontanée, une sensibilisation aux radiations et à différentes drogues *in vitro* (cisplatine, étoposide) ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale *in vivo*, comme nous l'avons notamment observé dans le myélome multiple [32]. Basé sur ces résultats, un

oligonucléotide antisens (ASO) vient d'être testé avec succès dans un essai clinique de phase I et la phase II a été annoncée. Enfin, plusieurs inhibiteurs de l'interaction Hsp90/survivine ont également été générés (17-AAG, AICAR, shepherdine). Ces molécules libèrent les « protéines-clientes » d'Hsp90 [39], et particulièrement la survivine, déclenchant alors leur dégradation et induisant l'apoptose dans les cellules cancéreuses comme cela a été clairement démontré pour la shepherdine [40]. L'association d'inhibiteurs de la survivine à des traitements anti-cancéreux conventionnels et leur administration éventuellement séquentielle pourraient améliorer les protocoles thérapeutiques anti-anticancéreux existants.

La survivine est également la cible de thérapies géniques et cellulaires innovantes (pour revue : [33]). Ainsi, une molécule de fusion entre la protéine TAT du HIV et le dominant négatif T34A de la survivine a été testée avec succès dans un modèle pré-clinique de mélanome. Des études se sont également servies de l'expression tissulaire restreinte de la survivine pour induire une apoptose spécifique grâce à des virus oncolytiques. Cette technique qui consiste à induire un cycle lytique viral dans les cellules ayant le promoteur *survivine* actif, a permis d'obtenir une forte inhibition de la croissance tumorale dans des modèles de cancer du poumon et de gliome chez la souris [41]. La surexpression de la survivine dans les tumeurs en fait également un antigène de choix pour des protocoles d'immunothérapie et de vaccination (pour revue : [37]). Des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques dirigés contre des épitopes de la survivine ont été détectés dans le sang de patients atteints de mélanome ou de myélome multiple [42], et un protocole de vaccination (phase I) a permis d'observer une régression tumorale transitoire. Un vaccin à ADN utilisant des bactéries atténuées exprimant la survivine a également permis d'observer une apoptose tumorale ainsi qu'une inhibition de la néo-angiogénèse chez la souris [43]. Enfin, la persistance dans le temps de la réponse anti-survivine indique qu'une vaccination sur le long terme pourrait s'avérer efficace dans la prévention des rechutes [44].

Conclusion

La survivine est au cœur de processus cellulaires complexes et ses propriétés biologiques sont particulièrement exploitées par les tumeurs qui l'expriment fréquemment à des niveaux aberrants et pour lesquelles une « addiction » à celle-ci est souvent observée. Ces arguments font de la survivine une cible prometteuse des thérapies anti-tumorales, et les essais pré-cliniques et cliniques la ciblant montrent une efficacité significative sans effet secondaire majeur. Néanmoins, le rôle physiologique de la survivine dans l'hématopoïèse et le système immunitaire suggère qu'une utilisation prolongée des inhibiteurs de la survivine pourrait s'avérer délétère. Un suivi sera donc nécessaire pour conclure définitivement sur l'innocuité de l'inhibition de la survivine en cancérologie. C'est pourquoi, il est important d'approfondir nos connaissances sur les fonctions et les mécanismes d'action de cette

protéine qui en 10 ans a montré de multiples facettes. Les prochaines études montreront peut-être que la cellule souche tumorale tant convoitée exprime la survivine. Ainsi, des thérapies ciblant la survivine seraient capables d'atteindre à la fois la masse tumorale, les néovaisseaux associés ainsi que la cellule souche tumorale qui alimente la tumeur.

Remerciements

Nous remercions pour leur soutien : la Ligue Contre le Cancer (équipe labellisée) et l'Institut National du Cancer (contrat C.Séveno).

Acronymes :

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

BIR : Bacculovirus IAP Repeat

CDE/CHR : cell cycle-dependent element / cell cycle homology region

CPC : Chromosomal Passenger Complex

INCENP : INner CENtrome Protein

Cdk1 : Cyclin dependante kinase 1

NES : Nuclear Exportation Signal

XIAP : X-chromosome-linked IAP

AIF : Apoptosis Inducing Factor

XAF-1 : XIAP-Associated Factor-1

Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase

Hsp90 : Heat shock protein 90

HBXIP : Hepatitis B X-Interacting Protein

ASO : oligonucléotide antisens

T34 et T117 : thréonine en position 34 et 117

S20 : sérine en position 20

K48 et K63 : lysine en position 48 et 63

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 1: Régulation de l'expression de la survivine.

Dans les cellules normales, la transcription du gène *survivine* est dépendante du cycle cellulaire grâce à ses motifs CDE/CHR et la voie Rb/E2F. Dans les cellules tumorales, son expression aberrante indépendante du cycle cellulaire est soutenue par diverses voies de signalisation ou oncogènes (voies activatrices (+)), et n'est plus réprimée par des suppresseurs de tumeur (voies répressives (-)). L'ARNm *survivine* subit un épissage alternatif, les variants 2B, Δ Ex3, 3B et 2 α obtenus sont minoritaires par rapport à la survivine. La survivine est composée de trois domaines principaux : (1) un domaine BIR impliqué dans son homodimérisation, ses interactions avec les membres du CPC lors de la mitose et diverses protéines lors de l'apoptose, (2) une séquence d'exportation hors du noyau (NES) et (3) une extrémité C-terminale en hélice α impliquée dans son interaction avec les microtubules. Enfin, au niveau post-traductionnel, la survivine peut être modifiée : phosphorylations et/ou ubiquitinations. La survivine porte trois sites de phosphorylation qui peuvent moduler ses interactions protéiques et localisations. La survivine est entraînée vers le protéasome après sa polyubiquitination à travers des liaisons K48, au contraire de sa polyubiquitination à travers des liaisons K63 modulée par Udf1/hFAM qui intervient dans sa localisation au centromère.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 2: Rôle de la survivine dans le blocage de l'apoptose mitochondriale.

En amont de la mitochondrie, dans les cellules en mitose, le complexe Survivine-Aurora-B semble contrôler la stabilisation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 par sa phosphorylation et la diminution de l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax. Au niveau de la mitochondrie, la survivine inhibe la libération des facteurs Smac et AIF, impliqués dans l'apoptose caspase-dépendante et indépendante respectivement. En aval de la mitochondrie, la survivine, elle-même relarguée à partir de la mitochondrie lors d'un stress cellulaire : (1) forme un complexe avec XIAP pour le stabiliser et favoriser son rôle d'inhibiteur direct des caspases et (2) neutralise Smac, un inhibiteur de XIAP. XAF-1, autre inhibiteur de XIAP, inhibe le complexe survivine/XIAP.

Cancer	Localisation de la survivine
Foie	Nucléaire
Poumon	Cytoplasmique/ Nucléaire
Mélanome	Nucléaire
Sein	Nucléaire/Cytoplasmique
Colorectal	Nucléaire/Cytoplasmique
Oesophage	Nucléaire
Ovaire	Nucléaire
Pancréas	Cytoplasmique
Estomac	Cytoplasmique
Leucémie	Nucléaire/Cytoplasmique

Tableau I : Tableau des études associant la surexpression et la localisation de la survivine à un mauvais pronostic, d'après [31].

Approche thérapeutique	Molécule	Statut de l'étude	Référence
Inhibition de la transcription	YM155 (Astellas)	Phase I	[38]
Inhibition de la traduction	ASO LY2181308 (ISIS/ Eli Lilly)	Phase I	[33]
Antagoniste Hsp90	17-AAG	Phase I	[45]
	AICAR	Pré-clinique	[46]
	Shepherdin	Phase I	[40]
Dominant Négatif	TAT-surv-T34A	Pré-clinique	[33]
Virothérapie	Adénovirus	Pré-clinique	[33, 42]
Thérapie génique	Promoteur <i>survivine</i>	Pré-clinique	[47]
Immunothérapie	Cellules dendritiques	Phase I	[48]
	Peptides	Phase I	[49]
	Vaccin à ADN	Pré-clinique	[43]

Tableau II : Tableau des principales stratégies thérapeutiques ciblant la survivin

1. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
2. Velculescu, V.E., et al., *Analysis of human transcriptomes*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 387-8.
3. Uren, A.G., et al., *Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype*. Curr Biol, 2000. **10**(21): p. 1319-28.
4. Altieri, D.C., *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 61-70.
5. Xia, F. and D.C. Altieri, *Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3392-5.
6. Knauer, S.K., et al., *The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein*. Cell Cycle, 2007. **6**(12): p. 1502-9.
7. O'Connor, D.S., et al., *Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13103-7.
8. Zhao, J., et al., *The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 23**: p. 4363-71.
9. Fortugno, P., et al., *Regulation of survivin function by Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 13791-6.
10. Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw, *Chromosomal passengers: conducting cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 798-812.
11. Delacour-Larose, M., et al., *Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis*. Cell Cycle, 2007. **6**(15): p. 1878-85.
12. Vong, Q.P., et al., *Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1499-504.
13. Jeyaprakash, A.A., et al., *Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together*. Cell, 2007. **131**(2): p. 271-85.
14. Suzuki, A., et al., *Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation*. Oncogene, 2000. **19**(29): p. 3225-34.
15. Li, F., et al., *Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. 461-6.
16. Vogel, C., C. Hager, and H. Bastians, *Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 339-45.
17. Ghosh, J.C., et al., *Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11576-9.
18. Verdecia, M.A., et al., *Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(7): p. 602-8.
19. Liu, T., B. Brouha, and D. Grossman, *Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 39-48.
20. Chakravarti, A., et al., *Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7494-506.
21. Laudet, B., et al., *[Therapeutic agents targetting protein-protein interactions: myth or reality?]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(3): p. 273-8.
22. Dohi, T., et al., *An IAP-IAP complex inhibits apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34087-90.
23. Song, Z., X. Yao, and M. Wu, *Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23130-40.
24. Arora, V., et al., *Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26202-9.
25. Marusawa, H., et al., *HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression*. Embo J, 2003. **22**(11): p. 2729-40.
26. Colnaghi, R., et al., *Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33450-6.
27. Dohi, T., et al., *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis*. J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1117-27.
28. Ceballos-Cancino, G., et al., *Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin*. Oncogene, 2007.
29. Dohi, T., F. Xia, and D.C. Altieri, *Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 17-28.

30. Thomas, J., et al., *Melanocyte expression of survivin promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice*. *Cancer Res*, 2007. **67**(11): p. 5172-8.
31. Fukuda, S. and L.M. Pelus, *Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(5): p. 1087-98.
32. Romagnoli, M., et al., *Significant impact of survivin on myeloma cell growth*. *Leukemia*, 2007. **21**(5): p. 1070-8.
33. Pennati, M., M. Folini, and N. Zaffaroni, *Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(6): p. 1133-9.
34. Kenney, D.M., et al., *Detection of newly diagnosed bladder cancer, bladder cancer recurrence and bladder cancer in patients with hematuria using quantitative rt-PCR of urinary survivin*. *Tumour Biol*, 2007. **28**(2): p. 57-62.
35. Yie, S.M., et al., *Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA*. *Clin Exp Metastasis*, 2006. **23**(5-6): p. 279-89.
36. Mesri, M., et al., *Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(5): p. 1757-65.
37. Altieri, D.C., *Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(3): p. 478-82.
38. Tolcher. *A phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, administered by 168 hour continuous infusion to patients with advanced solid tumors*. in *American Society of Clinical Oncology*. 2006. Atlanta, USA.
39. Arrigo, A.P., *[Heat shock proteins as molecular chaperones]*. *Med Sci (Paris)*, 2005. **21**(6-7): p. 619-25.
40. Plescia, J., et al., *Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(5): p. 457-68.
41. Li, B., et al., *A survivin-mediated oncolytic adenovirus induces non-apoptotic cell death in lung cancer cells and shows antitumoral potential in vivo*. *J Gene Med*, 2006. **8**(10): p. 1232-42.
42. Grube, M., et al., *CD8⁺ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 1053-60.
43. Xiang, R., et al., *A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication*. *Cancer Res*, 2005. **65**(2): p. 553-61.
44. Hadrup, S.R., et al., *Persistence of survivin specific T cells for seven years in a melanoma patient during complete remission*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(5): p. 480-2.
45. Sausville, E.A., J.E. Tomaszewski, and P. Ivy, *Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003. **3**(5): p. 377-83.
46. Meli, M., et al., *Small-molecule targeting of heat shock protein 90 chaperone function: rational identification of a new anticancer lead*. *J Med Chem*, 2006. **49**(26): p. 7721-30.
47. Chen, J.S., et al., *Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy*. *Cancer Gene Ther*, 2004. **11**(11): p. 740-7.
48. Otto, K., et al., *Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin*. *Vaccine*, 2005. **23**(7): p. 884-9.
49. Tsuruma, T., et al., *Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer*. *J Transl Med*, 2004. **2**(1): p. 19.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, S., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Kurata, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Takizawa, T., and Kitagawa, M. 2007. Rapid induction of IAP family proteins and Smac/DIABLO expression after proapoptotic stimulation with doxorubicin in RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Exp Mol Pathol* **83**(3): 405-412.
- Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**(17): 2177-2196.
- Adams, J.M. and Cory, S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* **19**(5): 488-496.
- Adida, C., Crotty, P.L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D.C. 1998. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* **152**(1): 43-49.
- Aguilar, R.C. and Wendland, B. 2003. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 184-190.
- Akyurek, N., Ren, Y., Rassidakis, G.Z., Schlette, E.J., and Medeiros, L.J. 2006. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Cancer* **107**(8): 1844-1851.
- Alexandrakis, M.G., Passam, F.H., Kyriakou, D.S., Dambaki, K., Niniraki, M., and Stathopoulos, E. 2004. Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. *Am J Clin Oncol* **27**(1): 8-13.
- Allan, L.A. and Clarke, P.R. 2007. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell* **26**(2): 301-310.
- Altieri, D.C. 2006a. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* **5**(3): 478-482.
- . 2006b. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 609-615.
- . 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* **8**(1): 61-70.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**(8): 917-921.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D.C. 1998. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* **273**(18): 11177-11182.
- Andersen, M.H., Svane, I.M., Becker, J.C., and Straten, P.T. 2007. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* **13**(20): 5991-5994.
- Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *Embo J* **24**(12): 2096-2103.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr., Kuehl, W.M., and Staudt, L.M. 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**(2): 115-130.
- Arora, V., Cheung, H.H., Plenchette, S., Micali, O.C., Liston, P., and Korneluk, R.G. 2007. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* **282**(36): 26202-26209.
- Arzoumanian, V., Hoering, A., Sawyer, J., van Rhee, F., Bailey, C., Gurley, J., Shaughnessy, J.D., Jr., Anaissie, E., Crowley, J., and Barlogie, B. 2008. Suppression of abnormal karyotype predicts superior survival in multiple myeloma. *Leukemia*.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C., and Bataille, R. 1996. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* **335**(2): 91-97.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J.G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J.L., Facon, T., and Mathiot, C. 2007. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* **109**(8): 3489-3495.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Grosbois, B., and Bataille, R. 1999. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res* **59**(18): 4546-4550.

- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Minvielle, S., and Bataille, R. 2002. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* **99**(6): 2185-2191.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.L., and Bataille, R. 2001. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* **98**(10): 3082-3086.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**(3): 899-906.
- Banks, D.P., Plescia, J., Altieri, D.C., Chen, J., Rosenberg, S.H., Zhang, H., and Ng, S.C. 2000. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* **96**(12): 4002-4003.
- Bao, R., Connolly, D.C., Murphy, M., Green, J., Weinstein, J.K., Pisarcik, D.A., and Hamilton, T.C. 2002. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* **94**(7): 522-528.
- Barille, S., Collette, M., Bataille, R., and Amiot, M. 1995. Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. *Blood* **86**(8): 3151-3159.
- Barille, S., Thabard, W., Robillard, N., Moreau, P., Pineau, D., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Amiot, M. 1999. CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. *Br J Haematol* **106**(2): 532-535.
- Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., Badros, A., Zangari, M., Anaissie, E., Epstein, J., Shaughnessy, J., Ayers, D., Spoon, D., and Tricot, G. 2001. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood* **98**(2): 492-494.
- Bataille, R., Boccadoro, M., Klein, B., Durie, B., and Pileri, A. 1992. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* **80**(3): 733-737.
- Bataille, R., Durie, B.G., and Grenier, J. 1983. Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br J Haematol* **55**(3): 439-447.
- Bataille, R., Durie, B.G., Grenier, J., and Sany, J. 1986. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol* **4**(1): 80-87.
- Bataille, R. and Harousseau, J.L. 1997. Multiple myeloma. *N Engl J Med* **336**(23): 1657-1664.
- Bataille, R., Jego, G., Robillard, N., Barille-Nion, S., Harousseau, J.L., Moreau, P., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. 2006. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* **91**(9): 1234-1240.
- Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X.G., and Klein, B. 1989. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* **84**(6): 2008-2011.
- Bataille, R., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.L., and Moreau, P. 2005. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica* **90**(5): 706-707.
- Bataille, R., Robillard, N., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. 2003. A cellular model for myeloma cell growth and maturation based on an intracloal CD45 hierarchy. *Immunol Rev* **194**: 105-111.
- Baumann, P., Mandl-Weber, S., Oduncu, F., and Schmidmaier, R. 2007. Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leuk Res*.
- Beltrami, E., Plescia, J., Wilkinson, J.C., Duckett, C.S., and Altieri, D.C. 2004. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* **279**(3): 2077-2084.
- Bergsagel, P.L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Kirby, S.L., and Kuehl, W.M. 1996. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13931-13936.
- Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* **23**(26): 6333-6338.
- Bezieau, S., Devilder, M.C., Avet-Loiseau, H., Mellerin, M.P., Puthier, D., Pennarun, E., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Moisan, J.P., and Bataille, R. 2001. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* **18**(3): 212-224.
- Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A.S., Shishodia, S., and Aggarwal, B.B. 2007. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* **109**(6): 2293-2302.

- Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., and Aggarwal, B.B. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* **101**(3): 1053-1062.
- Billadeau, D., Jelinek, D.F., Shah, N., LeBien, T.W., and Van Ness, B. 1995. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res* **55**(16): 3640-3646.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K. 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* **68**(4): 2521-2528.
- Biswas, S.C., Shi, Y., Sproul, A., and Greene, L.A. 2007. Pro-apoptotic Bim induction in response to nerve growth factor deprivation requires simultaneous activation of three different death signaling pathways. *J Biol Chem* **282**(40): 29368-29374.
- Blagosklonny, M.V. and Pardee, A.B. 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* **1**(2): 103-110.
- Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McClelland, M.L., Kuang, J., and Stukenberg, P.T. 2002. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* **13**(9): 3064-3077.
- Bommert, K., Bargou, R.C., and Stuhmer, T. 2006. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* **42**(11): 1574-1580.
- Bras, M., Queenan, B., and Susin, S.A. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* **70**(2): 231-239.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**(53): 8608-8618.
- Caldas, H., Honsey, L.E., and Altura, R.A. 2005. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer* **4**(1): 11.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-740.
- Carbone, P.P., Kellerhouse, L.E., and Gehan, E.A. 1967. Plasmacytic myeloma. A study of the relationship of survival to various clinical manifestations and anomalous protein type in 112 patients. *Am J Med* **42**(6): 937-948.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* **16**(5): 807-818.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S., and Jove, R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**(1): 105-115.
- Ceballos-Cancino, G., Espinosa, M., Maldonado, V., and Melendez-Zajgla, J. 2007. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene* **26**(54): 7569-7575.
- Chakravarti, A., Zhai, G.G., Zhang, M., Malhotra, R., Latham, D.E., Delaney, M.A., Robe, P., Nestler, U., Song, Q., and Loeffler, J. 2004. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* **23**(45): 7494-7506.
- Chang, H., Qi, X.Y., Claudio, J., Zhuang, L., Patterson, B., and Stewart, A.K. 2006a. Analysis of PTEN deletions and mutations in multiple myeloma. *Leuk Res* **30**(3): 262-265.
- Chang, H. and Schimmer, A.D. 2007. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* **6**(1): 24-30.
- Chang, H., Yeung, J., Xu, W., Ning, Y., and Patterson, B. 2006b. Significant increase of CKS1B amplification from monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma and plasma cell leukaemia as demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridisation. *Br J Haematol* **134**(6): 613-615.
- Chantalat, L., Skoufias, D.A., Kleman, J.P., Jung, B., Dideberg, O., and Margolis, R.L. 2000. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* **6**(1): 183-189.
- Chappell, S.A., LeQuesne, J.P., Paulin, F.E., deSchoolmeester, M.L., Stoneley, M., Soutar, R.L., Ralston, S.H., Helfrich, M.H., and Willis, A.E. 2000. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **19**(38): 4437-4440.
- Chatterjee, M., Jain, S., Stuhmer, T., Andrulis, M., Ungethum, U., Kuban, R.J., Lorentz, H., Bommert, K., Topp, M., Kramer, D., Muller-Hermelink, H.K., Einsele, H., Greiner, A., and Bargou, R.C. 2007. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* **109**(2): 720-728.

- Chauhan, D., Hideshima, T., Rosen, S., Reed, J.C., Kharbanda, S., and Anderson, K.C. 2001. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* **276**(27): 24453-24456.
- Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* **87**(3): 1104-1112.
- Chen, J., Jin, S., Tahir, S.K., Zhang, H., Liu, X., Sarthy, A.V., McGonigal, T.P., Liu, Z., Rosenberg, S.H., and Ng, S.C. 2003. Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem* **278**(1): 486-490.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chen-Kiang, S. 2003. Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev* **194**: 39-47.
- Chim, C.S., Fung, T.K., and Liang, R. 2003. Disruption of INK4/CDK/Rb cell cycle pathway by gene hypermethylation in multiple myeloma and MGUS. *Leukemia* **17**(12): 2533-2535.
- Chng, W.J., Ahmann, G.J., Henderson, K., Santana-Davila, R., Greipp, P.R., Gertz, M.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S.V., Lust, J.A., Kyle, R.A., Zeldenrust, S.R., Hayman, S.R., and Fonseca, R. 2006. Clinical implication of centrosome amplification in plasma cell neoplasm. *Blood* **107**(9): 3669-3675.
- Chng, W.J., Braggio, E., Mulligan, G., Bryant, B., Remstein, E., Valdez, R., Dogan, A., and Fonseca, R. 2008. The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood* **111**(3): 1603-1609.
- Chng, W.J., Kumar, S., Vanwier, S., Ahmann, G., Price-Troska, T., Henderson, K., Chung, T.H., Kim, S., Mulligan, G., Bryant, B., Carpten, J., Gertz, M., Rajkumar, S.V., Lacy, M., Dispenzieri, A., Kyle, R., Greipp, P., Bergsagel, P.L., and Fonseca, R. 2007. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* **67**(7): 2982-2989.
- Chung, Y.M., Kim, B.G., Park, C.S., Huh, S.J., Kim, J., Park, J.K., Cho, S.M., Kim, B.S., Kim, J.S., Yoo, Y.D., and Bae, D.S. 2005. Increased expression of ICAM-3 is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Int J Cancer* **117**(2): 194-201.
- Ciemerych, M.A. and Sicinski, P. 2005. Cell cycle in mouse development. *Oncogene* **24**(17): 2877-2898.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., and Sklar, J. 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* **47**(1): 19-28.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. 2000. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3260-3265.
- Collette, M., Descamps, G., Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., and Amiot, M. 2007. Crucial role of phosphatase CD45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells. *Eur Cytokine Netw* **18**(3): 120-126.
- Colnaghi, R., Connell, C.M., Barrett, R.M., and Wheatley, S.P. 2006. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem* **281**(44): 33450-33456.
- Connell, C.M., Colnaghi, R., and Wheatley, S.P. 2008. Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J Biol Chem* **283**(6): 3289-3296.
- Conway, E.M., Pollefeys, S., Steiner-Mosonyi, M., Luo, W., Devriese, A., Lupu, F., Bono, F., Leducq, N., Dol, F., Schaeffer, P., Collen, D., and Herbert, J.M. 2002. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* **123**(2): 619-631.
- Cosgrave, N., Hill, A.D., and Young, L.S. 2006. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. *J Mol Endocrinol* **37**(3): 377-390.
- Courtois, G. and Gilmore, T.D. 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* **25**(51): 6831-6843.
- Creagh, E.M. and Martin, S.J. 2003. Cell stress-associated caspase activation: intrinsically complex? *Sci STKE* **2003**(175): pe11.
- Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**(4): 2168-2174.
- Cutts, S.M., Fowler, K.J., Kile, B.T., Hii, L.L., O'Dowd, R.A., Hudson, D.F., Saffery, R., Kalitsis, P., Earle, E., and Choo, K.H. 1999. Defective chromosome segregation, microtubule bundling and nuclear bridging in inner centromere protein gene (Incenp)-disrupted mice. *Hum Mol Genet* **8**(7): 1145-1155.
- Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K., and Cheng, J.Q. 2004. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* **279**(7): 5405-5412.

- Danial, N.N. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* **13**(24): 7254-7263.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**(2): 205-219.
- Dasgupta, P., Kinkade, R., Joshi, B., Decook, C., Haura, E., and Chellappan, S. 2006. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6332-6337.
- Davenport, E.L., Moore, H.E., Dunlop, A.S., Sharp, S.Y., Workman, P., Morgan, G.J., and Davies, F.E. 2007. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood* **110**(7): 2641-2649.
- Debatin, K.M. and Krammer, P.H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**(16): 2950-2966.
- Decaux, O., Lode, L., Minvielle, S., and Avet-Loiseau, H. 2007. [Genetic abnormalities in multiple myeloma: role in oncogenesis and impact on survival]. *Rev Med Interne* **28**(10): 677-681.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D., and Letai, A. 2007. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* **117**(1): 112-121.
- Delacour-Larose, M., Thi, M.N., Dimitrov, S., and Molla, A. 2007. Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. *Cell Cycle* **6**(15): 1878-1885.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4): 193-209.
- Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M., and Letai, A. 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* **12**(2): 171-185.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Amiot, M. 2002. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100**(1): 194-199.
- Descamps, G., Wuilleme-Toumi, S., Trichet, V., Venot, C., Debussche, L., Hercend, T., Collette, M., Robillard, N., Bataille, R., and Amiot, M. 2006. CD45neg but not CD45pos human myeloma cells are sensitive to the inhibition of IGF-1 signaling by a murine anti-IGF-1R monoclonal antibody, mAVE1642. *J Immunol* **177**(6): 4218-4223.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**(8): 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**(6639): 300-304.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10**(19): 1201-1204.
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., and Andrews, D.W. 2006. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *Embo J* **25**(11): 2287-2296.
- Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N.R., Plescia, J., and Altieri, D.C. 2004a. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* **114**(8): 1117-1127.
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C.E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., and Altieri, D.C. 2004b. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**(33): 34087-34090.
- Dohi, T., Xia, F., and Altieri, D.C. 2007. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* **27**(1): 17-28.
- Drach, J., Schuster, J., Nowotny, H., Angerler, J., Rosenthal, F., Fiegl, M., Rothermundt, C., Gsur, A., Jager, U., Heinz, R., and et al. 1995. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **55**(17): 3854-3859.
- Drewinko, B., Alexanian, R., Boyer, H., Barlogie, B., and Rubinow, S.I. 1981. The growth fraction of human myeloma cells. *Blood* **57**(2): 333-338.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1): 33-42.
- Durie, B.G., Kyle, R.A., Belch, A., Bensinger, W., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Comenzo, R., Djulbegovic, B., Fantl, D., Gahrton, G., Harousseau, J.L., Hungria, V., Joshua, D., Ludwig, H., Mehta, J., Morales, A.R., Morgan, G., Nouel, A., Oken, M., Powles, R., Roodman, D., San Miguel, J., Shimizu, K., Singhal, S., Sirohi, B., Sonneveld, P., Tricot, G., and Van Ness, B. 2003. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* **4**(6): 379-398.

- Durie, B.G. and Salmon, S.E. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* **36**(3): 842-854.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**(10): 988-994.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. 2004. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6164-6169.
- Ekholm, S.V. and Reed, S.I. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 676-684.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Elnenaie, M.O., Gruszka-Westwood, A.M., A'Hernt, R., Matutes, E., Sirohi, B., Powles, R., and Catovsky, D. 2003. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* **88**(5): 529-537.
- Ely, S., Di Liberto, M., Niesvizky, R., Baughn, L.B., Cho, H.J., Hatada, E.N., Knowles, D.M., Lane, J., and Chen-Kiang, S. 2005. Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma. *Cancer Res* **65**(24): 11345-11353.
- Esteve, P.O., Chin, H.G., and Pradhan, S. 2005. Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(4): 1000-1005.
- . 2007. Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *J Biol Chem* **282**(4): 2615-2625.
- Evans, R.P., Naber, C., Steffler, T., Checkland, T., Maxwell, C.A., Keats, J.J., Belch, A.R., Pilarski, L.M., Lai, R., and Reiman, T. 2008. The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 is a potential new treatment for multiple myeloma. *Br J Haematol* **140**(3): 295-302.
- Ewings, K.E., Wiggins, C.M., and Cook, S.J. 2007. Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle* **6**(18): 2236-2240.
- Facon, T. 1999. [Standard treatment of multiple myeloma]. *Rev Med Interne* **20**(7): 611-621.
- Fandy, T.E., Ross, D.D., Gore, S.D., and Srivastava, R.K. 2007. Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**(3): 313-319.
- Ferlin, M., Noraz, N., Hertogh, C., Brochier, J., Taylor, N., and Klein, B. 2000. Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol* **111**(2): 626-634.
- Filipits, M., Pohl, G., Stranzl, T., Kaufmann, H., Ackermann, J., Gisslinger, H., Greinix, H., Chott, A., and Drach, J. 2003. Low p27Kip1 expression is an independent adverse prognostic factor in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* **9**(2): 820-826.
- Flactif, M., Zandecki, M., Lai, J.L., Bernardi, F., Obein, V., Bauters, F., and Facon, T. 1995. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. *Leukemia* **9**(12): 2109-2114.
- Fong, W.G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., and Korneluk, R.G. 2000. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**(1): 113-122.
- Fonseca, R., Blood, E.A., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Bailey, R.J., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., Hoyer, J.D., Harrington, D., Kay, N.E., Van Ness, B., and Greipp, P.R. 2002. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* **99**(10): 3735-3741.
- Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P.C., Sessa, W.C., and Altieri, D.C. 2003. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13791-13796.
- Fortugno, P., Wall, N.R., Giodini, A., O'Connor, D.S., Plescia, J., Padgett, K.M., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. 2002. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 575-585.
- Fraser, A.G., James, C., Evan, G.I., and Hengartner, M.O. 1999. Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* **9**(6): 292-301.
- Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Loubat, A., Dreano, M., and Peyron, J.F. 2003. AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF-alpha in Jurkat leukemic cells. *Oncogene* **22**(50): 8187-8194.
- Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Peyron, A.C., Rochet, N., Philip, P., Dageville, C., Sirvent, A., Hummelsberger, M., Berard, E., Dreano, M., Sirvent, N., and Peyron, J.F. 2005. Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* **105**(2): 804-811.

- Fukuda, S., Foster, R.G., Porter, S.B., and Pelus, L.M. 2002. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood* **100**(7): 2463-2471.
- Fukuda, S., Mantel, C.R., and Pelus, L.M. 2004. Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood* **103**(1): 120-127.
- Fukuda, S. and Pelus, L.M. 2001. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* **98**(7): 2091-2100.
- . 2006. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* **5**(5): 1087-1098.
- Galvan, V., Kurakin, A.V., and Bredesen, D.E. 2004. Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Lett* **558**(1-3): 57-62.
- Gartel, A.L. and Shchors, K. 2003. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* **283**(1): 17-21.
- Gastinne, T., Leleu, X., Duhamel, A., Moreau, A.S., Franck, G., Andrieux, J., Lai, J.L., Coiteux, V., Yakoub-Agha, I., Bauters, F., Harousseau, J.L., Zandecki, M., and Facon, T. 2007. Plasma cell growth fraction using Ki-67 antigen expression identifies a subgroup of multiple myeloma patients displaying short survival within the ISS stage I. *Eur J Haematol* **79**(4): 297-304.
- Gazitt, Y. 1999. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* **13**(11): 1817-1824.
- Ghosh, J.C., Dohi, T., Raskett, C.M., Kowalik, T.F., and Altieri, D.C. 2006. Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res* **66**(24): 11576-11579.
- Gilmore, T.D. 2007. Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer Cell* **12**(2): 95-97.
- Giodini, A., Kallio, M.J., Wall, N.R., Gorbsky, G.J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Symons, M., and Altieri, D.C. 2002. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* **62**(9): 2462-2467.
- Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., and Barille, S. 2001. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* **98**(13): 3527-3533.
- Glassford, J., Rabin, N., Lam, E.W., and Yong, K.L. 2007. Functional regulation of D-type cyclins by insulin-like growth factor-I and serum in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* **139**(2): 243-254.
- Goga, A., Yang, D., Tward, A.D., Morgan, D.O., and Bishop, J.M. 2007. Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat Med* **13**(7): 820-827.
- Gomez-Bougie, P., Bataille, R., and Amiot, M. 2004. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol* **34**(11): 3156-3164.
- Gomez-Bougie, P., Oliver, L., Le Gouill, S., Bataille, R., and Amiot, M. 2005. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene* **24**(54): 8076-8079.
- Gomez-Bougie, P., Willeme-Toumi, S., Menoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., and Amiot, M. 2007. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res* **67**(11): 5418-5424.
- Green, D.R. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**(1): 1-4.
- Greipp, P.R., Katzmann, J.A., O'Fallon, W.M., and Kyle, R.A. 1988. Value of beta 2-microglobulin level and plasma cell labeling indices as prognostic factors in patients with newly diagnosed myeloma. *Blood* **72**(1): 219-223.
- Greipp, P.R. and Kumar, S. 2005. Plasma cell labeling index. *Methods Mol Med* **113**: 25-35.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J.H., Beam, C.A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., and Jove, R. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **12**(1): 11-19.
- Grossman, D., Kim, P.J., Schechner, J.S., and Altieri, D.C. 2001. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2): 635-640.
- Grube, M., Moritz, S., Obermann, E.C., Rezvani, K., Mackensen, A., Andreesen, R., and Holler, E. 2007. CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* **13**(3): 1053-1060.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. 2000. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. *Genes Dev* **14**(21): 2745-2756.

- Gurbuxani, S., Xu, Y., Keerthivasan, G., Wickrema, A., and Crispino, J.D. 2005. Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11480-11485.
- Hacker, G. and Weber, A. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 150-155.
- Hallek, M., Bergsagel, P.L., and Anderson, K.C. 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**(1): 3-21.
- Hamilton, M.S., Barker, H.F., Ball, J., Drew, M., Abbot, S.D., and Franklin, I.M. 1991. Normal and neoplastic human plasma cells express bcl-2 antigen. *Leukemia* **5**(9): 768-771.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., and Naito, M. 2004. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol* **6**(9): 849-860.
- Hattori, M., Sakamoto, H., Satoh, K., and Yamamoto, T. 2001. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* **169**(2): 155-164.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., and Alnemri, E.S. 2003. The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* **278**(40): 38699-38706.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**(1): 432-438.
- Hekmat-Nejad, M., You, Z., Yee, M.C., Newport, J.W., and Cimprich, K.A. 2000. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* **10**(24): 1565-1573.
- Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 107-137.
- Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Tai, Y.T., Vallet, S., Kiziltepe, T., Ocio, E., Ikeda, H., Okawa, Y., Hideshima, H., Munshi, N.C., Yasui, H., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2007. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol* **138**(6): 783-791.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Podar, K., Schlossman, R.L., Richardson, P., and Anderson, K.C. 2001a. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Semin Oncol* **28**(6): 607-612.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., and Anderson, K.C. 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* **277**(19): 16639-16647.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., and Anderson, K.C. 2001b. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* **20**(42): 5991-6000.
- Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Dang, L., Munshi, N., Richardson, P., Schenkein, D., and Anderson, K.C. 2006. MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **12**(19): 5887-5894.
- Hilbert, D.M., Kopf, M., Mock, B.A., Kohler, G., and Rudikoff, S. 1995. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* **182**(1): 243-248.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I., and Weinberg, R.A. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**(6): 993-1006.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**(5): 3247-3257.
- Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., and Korneluk, R.G. 1999. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* **1**(3): 190-192.
- Honda, R., Korner, R., and Nigg, E.A. 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**(8): 3325-3341.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. 1991. S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**(3): 507-517.
- Hulin, C. 2007. [New treatment of multiple myeloma]. *Rev Med Interne* **28**(10): 682-688.
- Hunter, A.M., LaCasse, E.C., and Korneluk, R.G. 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**(9): 1543-1568.
- Hurley, P.J. and Bunz, F. 2007. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* **6**(4): 414-417.

- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Staudt, L.M. 2004. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* **5**(2): 191-199.
- Ishikawa, H., Mahmoud, M.S., Fujii, R., Abroun, S., and Kawano, M.M. 2000. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* **39**(1-2): 51-55.
- Ishikawa, H., Tsuyama, N., Abroun, S., Liu, S., Li, F.J., Taniguchi, O., and Kawano, M.M. 2002. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* **99**(6): 2172-2178.
- Ishikawa, H., Tsuyama, N., Obata, M., and M, M.K. 2006. Mitogenic signals initiated via interleukin-6 receptor complexes in cooperation with other transmembrane molecules in myelomas. *J Clin Exp Hematop* **46**(2): 55-66.
- Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. 2000. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* **19**(5): 617-623.
- Jack, M.T., Woo, R.A., Hirao, A., Cheung, A., Mak, T.W., and Lee, P.W. 2002. Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9825-9829.
- Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. 1999. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* **94**(2): 701-712.
- Jelinek, D.F., Witzig, T.E., and Arendt, B.K. 1997. A role for insulin-like growth factor in the regulation of IL-6-responsive human myeloma cell line growth. *J Immunol* **159**(1): 487-496.
- Jeyaparakash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A., and Conti, E. 2007. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* **131**(2): 271-285.
- Jiang, X., Wilford, C., Duensing, S., Munger, K., Jones, G., and Jones, D. 2001. Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. *J Cell Biochem* **83**(2): 342-354.
- Jiang, Y., de Bruin, A., Caldas, H., Fangusaro, J., Hayes, J., Conway, E.M., Robinson, M.L., and Altura, R.A. 2005. Essential role for survivin in early brain development. *J Neurosci* **25**(30): 6962-6970.
- Jiang, Y., Saavedra, H.I., Holloway, M.P., Leone, G., and Altura, R.A. 2004. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *J Biol Chem* **279**(39): 40511-40520.
- Jones, G., Jones, D., Zhou, L., Steller, H., and Chu, Y. 2000. Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* **275**(29): 22157-22165.
- Jones, S.M. and Kazlauskas, A. 2001. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol* **3**(2): 165-172.
- Jonkers, J. and Berns, A. 2004. Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* **6**(6): 535-538.
- Jourdan, M., Mahtouk, K., Veyrune, J.L., Couderc, G., Fiol, G., Redal, N., Duperray, C., De Vos, J., and Klein, B. 2005. Delineation of the roles of paracrine and autocrine interleukin-6 (IL-6) in myeloma cell lines in survival versus cell cycle. A possible model for the cooperation of myeloma cell growth factors. *Eur Cytokine Netw* **16**(1): 57-64.
- Jourdan, M., Moreaux, J., Vos, J.D., Hose, D., Mahtouk, K., Abouladze, M., Robert, N., Baudard, M., Reme, T., Romanelli, A., Goldschmidt, H., Rossi, J.F., Dreano, M., and Klein, B. 2007. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol* **138**(2): 160-168.
- Jung, J.E., Kim, T.K., Lee, J.S., Oh, S.Y., Kwak, S., Jin, X., Sohn, J.Y., Song, M.K., Sohn, Y.W., Lee, S.Y., Pian, X., Lee, J.B., Chung, Y.G., Choi, Y.K., You, S., and Kim, H. 2005. Survivin inhibits anti-growth effect of p53 activated by aurora B. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(4): 1164-1171.
- Kang, B.H. and Altieri, D.C. 2006. Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. *J Biol Chem* **281**(34): 24721-24727.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**(4): 301-310.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Shimizu, Y., and Tanaka, T. 2003. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* **256**(2): 331-341.
- Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., and et al. 1988. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**(6159): 83-85.

- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A.K., Carpten, J., and Bergsagel, P.L. 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**(2): 131-144.
- Kenney, D.M., Geschwindt, R.D., Kary, M.R., Linic, J.M., Sardesai, N.Y., and Li, Z.Q. 2007. Detection of newly diagnosed bladder cancer, bladder cancer recurrence and bladder cancer in patients with hematuria using quantitative rt-PCR of urinary survivin. *Tumour Biol* **28**(2): 57-62.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kim, Y.G., Kim, M.J., Lim, J.S., Lee, M.S., Kim, J.S., and Yoo, Y.D. 2006. ICAM-3-induced cancer cell proliferation through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Lett* **239**(1): 103-110.
- Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M., and Bataille, R. 1989. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* **73**(2): 517-526.
- Klein, B., Zhang, X.G., Lu, Z.Y., and Bataille, R. 1995. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* **85**(4): 863-872.
- Knauer, S.K., Bier, C., Habtemichael, N., and Stauber, R.H. 2006. The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep* **7**(12): 1259-1265.
- Knauer, S.K., Bier, C., Schlag, P., Fritzmann, J., Dietmaier, W., Rodel, F., Klein-Hitpass, L., Kovacs, A.F., Doring, C., Hansmann, M.L., Hofmann, W.K., Kunkel, M., Brochhausen, C., Engels, K., Lippert, B.M., Mann, W., and Stauber, R.H. 2007a. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* **6**(12): 1502-1509.
- Knauer, S.K., Kramer, O.H., Knosel, T., Engels, K., Rodel, F., Kovacs, A.F., Dietmaier, W., Klein-Hitpass, L., Habtemichael, N., Schweitzer, A., Brieger, J., Rodel, C., Mann, W., Petersen, I., Heinzl, T., and Stauber, R.H. 2007b. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *Faseb J* **21**(1): 207-216.
- Knoepfler, P.S. 2007. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res* **67**(11): 5061-5063.
- Kornacker, M., Verneris, M.R., Kornacker, B., Scheffold, C., and Negrin, R.S. 2001. Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol Lett* **76**(3): 169-173.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**(1): 99-163.
- Kuehl, W.M. and Bergsagel, P.L. 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* **2**(3): 175-187.
- Kulkarni, M.S., Daggett, J.L., Bender, T.P., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., and Williams, M.E. 2002. Frequent inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p18 by homozygous deletion in multiple myeloma cell lines: ectopic p18 expression inhibits growth and induces apoptosis. *Leukemia* **16**(1): 127-134.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K.H., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. 1998. The Xenopus Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J Cell Biol* **142**(6): 1559-1569.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. 2006. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* **134**(6): 573-589.
- Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., Melton, L.J., 3rd, and Rajkumar, S.V. 2007. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* **356**(25): 2582-2590.
- Lagace, M., Xuan, J.Y., Young, S.S., McRoberts, C., Maier, J., Rajcan-Separovic, E., and Korneluk, R.G. 2001. Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* **77**(3): 181-188.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**(4): 358-361.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., and Glimcher, L.H. 2003. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9946-9951.
- Lens, S.M., Rodriguez, J.A., Vader, G., Span, S.W., Giaccone, G., and Medema, R.H. 2006. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol Biol Cell* **17**(4): 1897-1909.

- Lesne, S., Gabriel, C., Nelson, D.A., White, E., Mackenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. 2005. Akt-dependent expression of NAIP-1 protects neurons against amyloid- β toxicity. *J Biol Chem* **280**(26): 24941-24947.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**(3): 183-192.
- Letai, A.G. 2008. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* **8**(2): 121-132.
- Li, F. 2005. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* **92**(2): 212-216.
- Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* **1**(8): 461-466.
- Li, F. and Altieri, D.C. 1999. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* **344 Pt 2**: 305-311.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**(6711): 580-584.
- Li, F. and Brattain, M.G. 2006. Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol* **169**(1): 1-11.
- Li, F., Yang, J., Ramnath, N., Javle, M.M., and Tan, D. 2005a. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer* **114**(4): 509-512.
- Li, F.J., Tsuyama, N., Ishikawa, H., Obata, M., Abroun, S., Liu, S., Otsuyama, K., Zheng, X., Ma, Z., Maki, Y., and Kawano, M.M. 2005b. A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in myeloma. *Blood* **105**(8): 3295-3302.
- Li, R. and Murray, A.W. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**(3): 519-531.
- Li, X., Pennisi, A., Zhan, F., Sawyer, J.R., Shaughnessy, J.D., and Yaccoby, S. 2007. Establishment and exploitation of hyperdiploid and non-hyperdiploid human myeloma cell lines. *Br J Haematol* **138**(6): 802-811.
- Li, Y., Xie, M., Yang, J., Yang, D., Deng, R., Wan, Y., and Yan, B. 2006. The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* **25**(23): 3296-3306.
- Linden, M., Kirchhof, N., Carlson, C., and Van Ness, B. 2004. Targeted overexpression of Bcl-XL in B-lymphoid cells results in lymphoproliferative disease and plasma cell malignancies. *Blood* **103**(7): 2779-2786.
- Ling, X., Cheng, Q., Black, J.D., and Li, F. 2007. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem* **282**(37): 27204-27214.
- Liston, P., Fong, W.G., Kelly, N.L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C.G., McBurney, M.W., and Korneluk, R.G. 2001. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**(2): 128-133.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A., and Korneluk, R.G. 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**(6563): 349-353.
- Liu, P., Leong, T., Quam, L., Billadeau, D., Kay, N.E., Greipp, P., Kyle, R.A., Oken, M.M., and Van Ness, B. 1996. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* **88**(7): 2699-2706.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., and Elledge, S.J. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**(12): 1448-1459.
- Liu, S., Ishikawa, H., Tsuyama, N., Li, F.J., Abroun, S., Otsuyama, K.I., Zheng, X., Ma, Z., Maki, Y., Iqbal, M.S., Obata, M., and Kawano, M.M. 2006. Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* **25**(3): 419-429.
- Liu, T., Brouha, B., and Grossman, D. 2004. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* **23**(1): 39-48.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**(4): 487-501.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A., and Dobbstein, M. 2003. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* **278**(35): 32507-32516.
- Louis, S.F., Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Guffei, A., Lichtensztejn, Z., Kuttler, F., Chuang, T.C., Moshir, S., Mougey, V., Chuang, A.Y., Kerr, P.D., Fest, T., Boukamp, P., and Mai, S. 2005. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9613-9618.

- Magrangeas, F., Lode, L., Wullemme, S., Minvielle, S., and Avet-Loiseau, H. 2005. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* **19**(2): 191-194.
- Mahboubi, K., Li, F., Plescia, J., Kirkiles-Smith, N.C., Mesri, M., Du, Y., Carroll, J.M., Elias, J.A., Altieri, D.C., and Pober, J.S. 2001. Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway. *Lab Invest* **81**(3): 327-334.
- Mahmoud, M.S., Ishikawa, H., Fujii, R., and Kawano, M.M. 1998. Induction of CD45 expression and proliferation in U-266 myeloma cell line by interleukin-6. *Blood* **92**(10): 3887-3897.
- Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C.V., Schmitt, M., Gabbert, H.E., and Gerharz, C.D. 2002. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* **9**(12): 1334-1342.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 741-752.
- Mallette, F.A. and Ferbeyre, G. 2007. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* **6**(15): 1831-1836.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**(11): 630-641.
- Marango, J., Shimoyama, M., Nishio, H., Meyer, J.A., Min, D.J., Sirulnik, A., Martinez-Martinez, Y., Chesi, M., Bergsagel, P.L., Zhou, M.M., Waxman, S., Leibovitch, B.A., Walsh, M.J., and Licht, J.D. 2007. The Multiple Myeloma SET Domain (MMSET) protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional co-repressor. *Blood*.
- Martin, S.J. 2001. Dealing the CARDs between life and death. *Trends Cell Biol* **11**(5): 188-189.
- Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., and Reed, J.C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo J* **22**(11): 2729-2740.
- Mateos, M.V., Hernandez, J.M., Hernandez, M.T., Gutierrez, N.C., Palomera, L., Fuertes, M., Diaz-Mediavilla, J., Lahuerta, J.J., de la Rubia, J., Terol, M.J., Sureda, A., Bargay, J., Ribas, P., de Arriba, F., Alegre, A., Oriol, A., Carrera, D., Garcia-Larana, J., Garcia-Sanz, R., Blade, J., Prosper, F., Mateo, G., Esseltine, D.L., van de Velde, H., and San Miguel, J.F. 2006. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood* **108**(7): 2165-2172.
- Matsui, H., Asou, H., and Inaba, T. 2007. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* **25**(1): 99-112.
- Maxwell, C.A., Keats, J.J., Belch, A.R., Pilarski, L.M., and Reiman, T. 2005. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. *Cancer Res* **65**(3): 850-860.
- McCann, D.J., Yezefski, T., Nguyen, H.G., Papadantonakis, N., Liu, H., Wen, Q., Crispino, J.D., and Ravid, K. 2008. Survivin overexpression alone does not alter megakaryocyte ploidy nor interfere with erythroid/megakaryocytic lineage development in transgenic mice. *Blood*.
- McNeish, I.A., Lopes, R., Bell, S.J., McKay, T.R., Fernandez, M., Lockley, M., Wheatley, S.P., and Lemoine, N.R. 2005. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* **302**(1): 69-82.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. 1993. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* **4**(6): 615-661.
- Meng, H., Yang, C., Ni, W., Ding, W., Yang, X., and Qian, W. 2007. Antitumor activity of fludarabine against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Eur J Haematol* **79**(6): 486-493.
- Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Geffroy-Luseau, A., Daniels, S., Moreau, P., Le Gouill, S., Harousseau, J.L., Bataille, R., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. 2006. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* **108**(4): 1346-1352.
- Mesri, M., Morales-Ruiz, M., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Pober, J.S., Sessa, W.C., and Altieri, D.C. 2001. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* **158**(5): 1757-1765.
- Micheau, O. and Tschopp, J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2): 181-190.
- Miller, L.K. 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* **9**(8): 323-328.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T.N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S.F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W.R., Nielsen, L.L., Pickett, C.B., and Liu, S. 2002. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **21**(17): 2613-2622.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2002a. Activation of NF-kappaB and

- upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* **21**(37): 5673-5683.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Kung, A.L., Davies, F.E., Morgan, G., Akiyama, M., Shringarpure, R., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Hideshima, T., Chauhan, D., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Rosen, N.S., and Anderson, K.C. 2006a. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* **107**(3): 1092-1100.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., Munshi, N.C., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2006b. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* **42**(11): 1564-1573.
- Mitsiades, C.S., Treon, S.P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T., and Anderson, K.C. 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **98**(3): 795-804.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N., Treon, S.P., and Anderson, K.C. 2002b. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **99**(11): 4079-4086.
- Moreau, P., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Pineau, D., Morineau, N., Milpied, N., Harousseau, J.L., and Bataille, R. 2004. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica* **89**(5): 547-551.
- Moreau, P., Robillard, N., Jego, G., Pellat, C., Le Gouill, S., Thoumi, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.L., and Bataille, R. 2006. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol* **132**(2): 168-170.
- Morrow, C.J., Tighe, A., Johnson, V.L., Scott, M.I., Ditchfield, C., and Taylor, S.S. 2005. Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3639-3652.
- Moynagh, P.N. 2005. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4589-4592.
- Muchmore, S.W., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E.D., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S.C., and Altieri, D.C. 2000. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell* **6**(1): 173-182.
- Musacchio, A. and Salmon, E.D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-393.
- Nakagawa, Y., Abe, S., Kurata, M., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Inoue, M., Takemura, T., Suzuki, K., and Kitagawa, M. 2006. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol* **81**(11): 824-831.
- Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.Z., Amin, H.M., Martinez, R.L., Saeed, S., Barton, K., and Alkan, S. 2001. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol* **115**(2): 279-286.
- Nimmanapalli, R., O'Bryan, E., Kuhn, D., Yamaguchi, H., Wang, H.G., and Bhalla, K.N. 2003. Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases. *Blood* **102**(1): 269-275.
- Nurse, P. 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**(1): 71-78.
- O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. 2000a. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13103-13107.
- O'Connor, D.S., Schechner, J.S., Adida, C., Mesri, M., Rothermel, A.L., Li, F., Nath, A.K., Pober, J.S., and Altieri, D.C. 2000b. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* **156**(2): 393-398.
- O'Connor, D.S., Wall, N.R., Porter, A.C., and Altieri, D.C. 2002. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**(1): 43-54.
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M.A., and Almasan, A. 2004. Apoptosis of multiple myeloma. *Int J Hematol* **80**(3): 224-231.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Jr., Lee, K.P., and Boise, L.H. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* **107**(12): 4907-4916.
- Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A., Wakeham, A., Suh, W.K., Duncan, G.S., Ciofani, M., Rottapel, R., Zuniga-Pflucker, J.C., and Mak, T.W. 2004. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med* **199**(3): 399-410.
- Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R.G., O'Connor, D.S., Li, F., Altieri, D.C., and Sessa, W.C. 2000. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* **275**(13): 9102-9105.

- Pathak, A.K., Bhutani, M., Nair, A.S., Ahn, K.S., Chakraborty, A., Kadara, H., Guha, S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B. 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* **5**(9): 943-955.
- Pellat-Deceunynck, C. and Bataille, R. 2004. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* **32**(2): 293-301.
- Peng, J., Tan, C., Roberts, G.J., Nikolaeva, O., Zhang, Z., Lapolla, S.M., Primorac, S., Andrews, D.W., and Lin, J. 2006a. tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem* **281**(47): 35802-35811.
- Peng, X.H., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B.H., Zhou, M., and Yang, L. 2006b. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem* **281**(36): 25903-25914.
- Pennati, M., Folini, M., and Zaffaroni, N. 2007. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* **28**(6): 1133-1139.
- Peter, M.E. 2004. The flip side of FLIP. *Biochem J* **382**(Pt 2): e1-3.
- Peters, J.M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 644-656.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., and Doxsey, S.J. 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**(17): 3974-3985.
- Pinsky, B.A. and Biggins, S. 2005. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol* **15**(9): 486-493.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., and Strasser, A. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**(7): 1337-1349.
- Puthier, D., Bataille, R., and Amiot, M. 1999. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* **29**(12): 3945-3950.
- Qiang, Y.W., Yao, L., Tosato, G., and Rudikoff, S. 2004. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* **103**(1): 301-308.
- Raj, D., Liu, T., Samadashwily, G., Li, F., and Grossman, D. 2008. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* **29**(1): 194-201.
- Rajkumar, S.V., Dispenzieri, A., and Kyle, R.A. 2006. Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldenstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* **81**(5): 693-703.
- Ramjaun, A.R., Tomlinson, S., Eddaoudi, A., and Downward, J. 2007. Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF β -induced apoptosis. *Oncogene* **26**(7): 970-981.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**(4): 372-380.
- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H.E., and Dahl, I.M. 2005. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* **105**(1): 317-323.
- Rawat, R., Rainey, G.J., Thompson, C.D., Frazier-Jessen, M.R., Brown, R.T., and Nordan, R.P. 2000. Constitutive activation of STAT3 is associated with the acquisition of an interleukin 6-independent phenotype by murine plasmacytomas and hybridomas. *Blood* **96**(10): 3514-3521.
- Richardson, P., Mitsiades, C., Schlossman, R., Ghobrial, I., Hideshima, T., Chauhan, D., Munshi, N., and Anderson, K. 2007. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2007**: 317-323.
- Rodriguez, J.A., Span, S.W., Ferreira, C.G., Krut, F.A., and Giaccone, G. 2002. CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Exp Cell Res* **275**(1): 44-53.
- Romagnoli, M., Desplanques, G., Maiga, S., Legouill, S., Dreano, M., Bataille, R., and Barille-Nion, S. 2007. Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin Cancer Res* **13**(20): 6010-6018.
- Rosa, J., Canovas, P., Islam, A., Altieri, D.C., and Doxsey, S.J. 2006. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol Biol Cell* **17**(3): 1483-1493.
- Rosinol, L., Cibeira, M.T., Montoto, S., Rozman, M., Esteve, J., Filella, X., and Blade, J. 2007. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc* **82**(4): 428-434.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**(7): 1243-1252.

- Roue, G., Perez-Galan, P., Lopez-Guerra, M., Villamor, N., Campo, E., and Colomer, D. 2007. Selective inhibition of IkappaB kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J Immunol* **178**(3): 1923-1930.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. 2007a. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 798-812.
- . 2007b. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* **131**(2): 230-231.
- Salz, W., Eisenberg, D., Plescia, J., Garlick, D.S., Weiss, R.M., Wu, X.R., Sun, T.T., and Altieri, D.C. 2005. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior. *Cancer Res* **65**(9): 3531-3534.
- Sampath, S.C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., and Funabiki, H. 2004. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**(2): 187-202.
- San Miguel, J., Blade, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Glasmacher, A., Jagannath, S., Lonial, S., Orlowski, R.Z., Sonneveld, P., and Ludwig, H. 2006. A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *Oncologist* **11**(1): 51-61.
- San Miguel, J.F., Almeida, J., Mateo, G., Blade, J., Lopez-Berges, C., Caballero, D., Hernandez, J., Moro, M.J., Fernandez-Calvo, J., Diaz-Mediavilla, J., Palomera, L., and Orfao, A. 2002. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* **99**(5): 1853-1856.
- San Miguel, J.F. and Garcia-Sanz, R. 2005. Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* **18**(4): 569-583.
- San Miguel, J.F., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., Moro, M.J., Hernandez, J.M., Ortega, F., Borrego, D., Carnero, M., Casanova, F., Jimenez, R., and et al. 1995. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* **85**(2): 448-455.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.
- Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B., Ueda, R., and Okamoto, T. 2005. Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **11**(5): 1974-1982.
- Santra, M., Zhan, F., Tian, E., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr. 2003. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood* **101**(6): 2374-2376.
- Sarasquete, M.E., Garcia-Sanz, R., Armellini, A., Fuertes, M., Martin-Jimenez, P., Sierra, M., Del Carmen Chillon, M., Alcoceba, M., Balanzategui, A., Ortega, F., Hernandez, J.M., Sureda, A., Palomera, L., Gonzalez, M., and San Miguel, J.F. 2006. The association of increased p14ARF/p16INK4a and p15INK4a gene expression with proliferative activity and the clinical course of multiple myeloma. *Haematologica* **91**(11): 1551-1554.
- Sarthy, A.V., Morgan-Lappe, S.E., Zakula, D., Verneti, L., Schurdak, M., Packer, J.C., Anderson, M.G., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Fesik, S.W. 2007. Survivin depletion preferentially reduces the survival of activated K-Ras-transformed cells. *Mol Cancer Ther* **6**(1): 269-276.
- Sehra, S. and Dent, A.L. 2006. Caspase function and the immune system. *Crit Rev Immunol* **26**(2): 133-148.
- Seidel, C., Hjertner, O., Abildgaard, N., Heickendorff, L., Hjorth, M., Westin, J., Nielsen, J.L., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A., and Borset, M. 2001. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* **98**(7): 2269-2271.
- Seidel, C., Sundan, A., Hjorth, M., Turesson, I., Dahl, I.M., Abildgaard, N., Waage, A., and Borset, M. 2000. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* **95**(2): 388-392.
- Shaughnessy, J. 2005. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* **10 Suppl 1**: 117-126.
- Shaughnessy, J.D., Jr., Haessler, J., van Rhee, F., Anaissie, E., Pineda-Roman, M., Cottler-Fox, M., Hollmig, K., Zangari, M., Mohiuddin, A., Alsayed, Y., Graziutti, M., Epstein, J., Crowley, J., and Barlogie, B. 2007. Testing standard and genetic parameters in 220 patients with multiple myeloma with complete data sets: superiority of molecular genetics. *Br J Haematol* **137**(6): 530-536.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**(3): 459-470.
- . 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* **13**(8): 1979-1987.
- Shi, Y., Reiman, T., Li, W., Maxwell, C.A., Sen, S., Pilarski, L., Daniels, T.R., Penichet, M.L., Feldman, R., and Lichtenstein, A. 2007. Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood* **109**(9): 3915-3921.

- Skopelitou, A., Hadjiyannakis, M., Tsenga, A., Theocharis, S., Alexopoulou, V., Kittas, C., and Agnantis, N. 1993. Expression of C-myc p62 oncoprotein in multiple myeloma: an immunohistochemical study of 180 cases. *Anticancer Res* **13**(4): 1091-1095.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**(4785): 177-182.
- Smith, A.P., Gimenez-Abian, J.F., and Clarke, D.J. 2002. DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell Cycle* **1**(1): 16-33.
- Sommer, K.W., Rodgarkia-Dara, C.J., Schreiner, C., Holzmann, K., Krupitza, G., and Cerni, C. 2007. Oncogenic c-H-ras deregulates survivin expression: an improvement for survival. *FEBS Lett* **581**(25): 4921-4926.
- Song, J., Salek-Ardakani, S., So, T., and Croft, M. 2007. The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. *Nat Immunol* **8**(1): 64-73.
- Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., and Croft, M. 2005. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* **22**(5): 621-631.
- Song, Z., Liu, S., He, H., Hoti, N., Wang, Y., Feng, S., and Wu, M. 2004. A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *Mol Biol Cell* **15**(3): 1287-1296.
- Song, Z., Yao, X., and Wu, M. 2003. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**(25): 23130-23140.
- Sreedhar, A.S. and Csermely, P. 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **101**(3): 227-257.
- Srinivasula, S.M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**(34): 31469-31472.
- Standal, T., Borset, M., Lenhoff, S., Wisloff, F., Stordal, B., Sundan, A., Waage, A., and Seidel, C. 2002. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood* **100**(12): 3925-3929.
- Stauber, R.H., Mann, W., and Knauer, S.K. 2007. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res* **67**(13): 5999-6002.
- Stromberg, T., Dimberg, A., Hammarberg, A., Carlson, K., Osterborg, A., Nilsson, K., and Jernberg-Wiklund, H. 2004. Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood* **103**(8): 3138-3147.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**(5): 925-936.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.C., and Fesik, S.W. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* **401**(6755): 818-822.
- Suzuki, A., Hayashida, M., Ito, T., Kawano, H., Nakano, T., Miura, M., Akahane, K., and Shiraki, K. 2000. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* **19**(29): 3225-3234.
- Syljuasen, R.G. 2007. Checkpoint adaptation in human cells. *Oncogene* **26**(40): 5833-5839.
- Tai, Y.T., Podar, K., Catley, L., Tseng, Y.H., Akiyama, M., Shringarpure, R., Burger, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Munshi, N.C., Kahn, C.R., Mitsiades, C., and Anderson, K.C. 2003. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res* **63**(18): 5850-5858.
- Temme, A., Rieger, M., Reber, F., Lindemann, D., Weigle, B., Diestelkoetter-Bachert, P., Ehninger, G., Tatsuka, M., Terada, Y., and Rieber, E.P. 2003. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol Biol Cell* **14**(1): 78-92.
- Thomas, J., Liu, T., Cotter, M.A., Florell, S.R., Robinette, K., Hanks, A.N., and Grossman, D. 2007. Melanocyte expression of survivin promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. *Cancer Res* **67**(11): 5172-5178.
- Tran, J., Master, Z., Yu, J.L., Rak, J., Dumont, D.J., and Kerbel, R.S. 2002. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4349-4354.
- Tricot, G., Sawyer, J.R., Jagannath, S., Desikan, K.R., Siegel, D., Naucke, S., Mattox, S., Bracy, D., Munshi, N., and Barlogie, B. 1997. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol* **15**(7): 2659-2666.
- Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**(5): 552-558.

- Tsuchiya, H., Epstein, J., Selvanayagam, P., Dedman, J.R., Gallick, G., Alexanian, R., and Barlogie, B. 1988. Correlated flow cytometric analysis of H-ras p21 and nuclear DNA in multiple myeloma. *Blood* **72**(2): 796-800.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**(4706): 1440-1443.
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**(6960): 859-864.
- Uchiyama, H., Barut, B.A., Mohrbacher, A.F., Chauhan, D., and Anderson, K.C. 1993. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* **82**(12): 3712-3720.
- Uren, A.G., Beilharz, T., O'Connell, M.J., Bugg, S.J., van Driel, R., Vaux, D.L., and Lithgow, T. 1999. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10170-10175.
- Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L., and Choo, K.H. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* **10**(21): 1319-1328.
- Vader, G., Medema, R.H., and Lens, S.M. 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* **173**(6): 833-837.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., Flygare, J.A., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Dixit, V.M., and Vucic, D. 2007. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**(4): 669-681.
- Vaux, D.L. and Silke, J. 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 287-297.
- Vegran, F., Boidot, R., Oudin, C., Defrain, C., Rebucci, M., and Lizard-Nacol, S. 2007. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* **26**(2): 290-297.
- Velculescu, V.E., Madden, S.L., Zhang, L., Lash, A.E., Yu, J., Rago, C., Lal, A., Wang, C.J., Beaudry, G.A., Ciriello, K.M., Cook, B.P., Dufault, M.R., Ferguson, A.T., Gao, Y., He, T.C., Hermeking, H., Hiraldo, S.K., Hwang, P.M., Lopez, M.A., Luderer, H.F., Mathews, B., Petroziello, J.M., Polyak, K., Zawel, L., Kinzler, K.W., and et al. 1999. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* **23**(4): 387-388.
- Verdecia, M.A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D.A., Hunter, T., and Noel, J.P. 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* **7**(7): 602-608.
- Verhagen, A.M., Kratina, T.K., Hawkins, C.J., Silke, J., Ekert, P.G., and Vaux, D.L. 2007. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* **14**(2): 348-357.
- Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B.A., Koentgen, F., Vaux, D.L., and Silke, J. 2007. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**(4): 682-693.
- Vogel, C., Hager, C., and Bastians, H. 2007. Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res* **67**(1): 339-345.
- Vong, Q.P., Cao, K., Li, H.Y., Iglesias, P.A., and Zheng, Y. 2005. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* **310**(5753): 1499-1504.
- Wagner, M., Schmelz, K., Dorken, B., and Tamm, I. 2008. Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*.
- Wang, Z., Fukuda, S., and Pelus, L.M. 2004. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene* **23**(49): 8146-8153.
- Wang, Z., Sampath, J., Fukuda, S., and Pelus, L.M. 2005. Disruption of the inhibitor of apoptosis protein survivin sensitizes Bcr-abl-positive cells to STI571-induced apoptosis. *Cancer Res* **65**(18): 8224-8232.
- Waters, J.C., Chen, R.H., Murray, A.W., and Salmon, E.D. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* **141**(5): 1181-1191.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-730.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**(3): 323-330.
- Wheatley, S.P., Barrett, R.M., Andrews, P.D., Medema, R.H., Morley, S.J., Swedlow, J.R., and Lens, S.M. 2007. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell Cycle* **6**(10): 1220-1230.

- Wheatley, S.P., Henzing, A.J., Dodson, H., Khaled, W., and Earnshaw, W.C. 2004. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem* **279**(7): 5655-5660.
- Wheatley, S.P. and McNeish, I.A. 2005. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* **247**: 35-88.
- Wilkinson, J.C., Wilkinson, A.S., Galban, S., Csomos, R.A., and Duckett, C.S. 2008. Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Mol Cell Biol* **28**(1): 237-247.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305.
- Witzig, T.E., Timm, M., Larson, D., Therneau, T., and Greipp, P.R. 1999. Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Br J Haematol* **104**(1): 131-137.
- Wuilleme-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.L., Amiot, M., and Bataille, R. 2005. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **19**(7): 1248-1252.
- Wuilleme-Toumi, S., Trichet, V., Gomez-Bougie, P., Gratas, C., Bataille, R., and Amiot, M. 2007. Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **361**(4): 865-869.
- Xia, F. and Altieri, D.C. 2006. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. *Cancer Res* **66**(7): 3392-3395.
- Xia, W., Bisi, J., Strum, J., Liu, L., Carrick, K., Graham, K.M., Treece, A.L., Hardwicke, M.A., Dush, M., Liao, Q., Westlund, R.E., Zhao, S., Bacus, S., and Spector, N.L. 2006a. Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res* **66**(3): 1640-1647.
- Xia, Y., Novak, R., Lewis, J., Duckett, C.S., and Phillips, A.C. 2006b. Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Mol Cell Biochem* **286**(1-2): 67-76.
- Xing, Z., Conway, E.M., Kang, C., and Winoto, A. 2004. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. *J Exp Med* **199**(1): 69-80.
- Xu, F., Gardner, A., Tu, Y., Michl, P., Prager, D., and Lichtenstein, A. 1997. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors. *Br J Haematol* **97**(2): 429-440.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D. 1996. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* **10**(19): 2411-2422.
- Xu, Y., Fang, F., Ludewig, G., Jones, G., and Jones, D. 2004. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* **23**(7): 419-429.
- Yan, H., Frost, P., Shi, Y., Hoang, B., Sharma, S., Fisher, M., Gera, J., and Lichtenstein, A. 2006. Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res* **66**(4): 2305-2313.
- Yang, D., Welm, A., and Bishop, J.M. 2004. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(42): 15100-15105.
- Yang, J., Qian, J., Wezeman, M., Wang, S., Lin, P., Wang, M., Yaccoby, S., Kwak, L.W., Barlogie, B., and Yi, Q. 2006. Targeting beta2-microglobulin for induction of tumor apoptosis in human hematological malignancies. *Cancer Cell* **10**(4): 295-307.
- Yang, J., Zhang, X., Wang, J., Qian, J., Zhang, L., Wang, M., Kwak, L.W., and Yi, Q. 2007. Anti beta2-microglobulin monoclonal antibodies induce apoptosis in myeloma cells by recruiting MHC class I to and excluding growth and survival cytokine receptors from lipid rafts. *Blood* **110**(8): 3028-3035.
- Yie, S.M., Luo, B., Ye, N.Y., Xie, K., and Ye, S.R. 2006. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis* **23**(5-6): 279-289.
- Youle, R.J. and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.
- Zandecki, M., Lai, J.L., Genevieve, F., Bernardi, F., Volle-Remy, H., Blanchet, O., Francois, M., Cosson, A., Bauters, F., and Facon, T. 1997. Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood* **90**(9): 3682-3690.

- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J.P., Kuehl, W.M., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. 2007. CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* **109**(11): 4995-5001.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* **108**(6): 2020-2028.
- Zhang, X.G., Gaillard, J.P., Robillard, N., Lu, Z.Y., Gu, Z.J., Jourdan, M., Boiron, J.M., Bataille, R., and Klein, B. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* **83**(12): 3654-3663.
- Zhao, J., Tenev, T., Martins, L.M., Downward, J., and Lemoine, N.R. 2000. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* **113 Pt 23**: 4363-4371.
- Zhu, N., Gu, L., Findley, H.W., Chen, C., Dong, J.T., Yang, L., and Zhou, M. 2006. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *J Biol Chem* **281**(21): 14711-14718.

RESUME

EXPRESSION ET FONCTION DE LA PROTEINE SURVIVINE DANS LE MYELOME MULTIPLE : IMPLICATIONS CLINICO-BIOLOGIQUES

Le myélome multiple (MM), qui représente 20% des hémopathies malignes, est caractérisé par une importante instabilité chromosomique, une prolifération résiduelle et un défaut d'apoptose. La forte chimiorésistance associée à ce cancer justifie la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons évalué l'implication de la protéine survivine dans la physiopathologie du MM. La survivine est un membre de la famille des IAP (inhibiteurs de l'apoptose) qui révèle une expression aberrante dans la plupart des cancers et se place au carrefour de processus souvent dérégulés dans le cancer : cycle cellulaire et survie. Nous avons montré une corrélation entre l'expression de la survivine et la progression de la maladie dans le MM. Son expression augmente à la rechute et dans les formes extramédullaires. De plus, son expression chez les patients au diagnostic est associée à un mauvais pronostic. La modulation de son expression par ARN interférence ou par surexpression ectopique démontre l'implication de la survivine dans la croissance de la tumeur myélomateuse en terme de prolifération, survie, chimiorésistance, tumorigénicité et dépendance à l'IL6. Enfin, une forte expression de la survivine entraîne la diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim qui est impliquée dans la mort des plasmocytes myélomateux notamment au cours de la privation en IL6. Nous avons aussi démontré l'existence de la corrélation inverse entre les ARNm *survivine* et *bim* chez une cohorte de patients au diagnostic.

Mots clés : myélome multiple, cycle cellulaire, apoptose, survivine, Bim, pronostic, cible thérapeutique

EXPRESSION AND FUNCTION OF PROTEIN SURVIVIN IN MULTIPLE MYELOMA: CLINICAL AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS

Multiple myeloma (MM), which represents 20% of malignant hemopathies, is characterised by important chromosomal instability, residual proliferation and disruption of apoptosis. The large chemoresistance observed in MM justifies the research of new therapeutic targets. We have investigated the involvement of the protein survivin in MM pathophysiology. Survivin is a member of IAP family (inhibitors of apoptosis) that shows aberrant expression in most cancers and locates at the crossroad of processes often deregulated in cancer: cell cycle and survival. We have found a strong correlation between survivin expression and clinical course of MM. Its expression increases on the relapse and in extramedullary forms of MM. In addition, its expression in patients at diagnosis is associated with a bad prognosis. The modulation of its expression by interference RNA or by ectopic overexpression demonstrates the involvement of survivin in myeloma cell growth: proliferation, survival, chemoresistance, tumorigenicity and IL6-dependence. Finally, a high survivin expression leads to the decreased expression of the pro-apoptotic protein Bim, which has already been involved in myeloma cell death especially upon IL6-deprivation. Interestingly, an inverse correlation between *survivin* and *bim* mRNA is also observed in a cohort of patients at diagnosis.

Keywords: multiple myeloma, cell cycle, apoptosis, survivin, Bim, prognosis, therapeutic target

ROMAGNOLI Mathilde

7 allée Cassard, 44000 Nantes