

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2014-2015

n° 02

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie – Santé

par

Cyrille Touzeau

né le 7 avril 1980

présentée et soutenue publiquement le 4 février 2015

**BH3 mimétiques ciblant Bcl-2 : évaluation préclinique dans le
myélome multiple et le lymphome à cellules du manteau.**

Membres du Jury

Directeur de thèse : Pr Steven Le Gouill
Co-directeur de thèse : Dr Martine Amiot

Rapporteur : Pr Bertrand Arnulf
Rapporteur : Pr Fabrice Jardin

Examineur : Dr Abdel Aouacheria

Président du Jury : Pr Philippe Moreau

Je dédie cette thèse à ma sœur Camille

REMERCIEMENTS

Je tiens sincèrement à remercier :

Martine Amiot,

Pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour son aide et son soutien constant au cours de ces années passées au sein de la famille Bcl-2.

Steven Le Gouill,

Pour avoir accepté de diriger ce travail, pour m'avoir accompagné et guidé depuis mon premier jour d'internat.

Philippe Moreau,

Pour avoir accepté de juger ce travail, pour son soutien constant, son enseignement et la confiance qu'il m'accorde.

Anthony Letai,

Pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour ses conseils, pour m'avoir permis de vivre cette formidable expérience Bostonienne

Bertrand Arnulf, Fabrice Jardin et Abdel Aouacheria

Pour avoir accepté de juger et de rapporter ce travail de thèse

Catherine Pellat et l'ensemble de l'équipe 10 : Christelle, Sophie, David, Géraldine, Patricia, Charlotte, Sylvanie, Emmanuelle

Pour votre aide, pour m'avoir aussi bien accueilli au sein de votre équipe

Tous mes collègues du service d'hématologie clinique

Ma famille,

Hélène, la femme de ma vie. Louis, tu es le plus merveilleux petit garçon dont on puisse rêver. Mes parents, je vous dois tout. Benoit, mon « cher vieux complice »

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I- L' APOPTOSE	2
A) L' APOPTOSE, UN PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE SPECIFIQUE	2
B) LES CASPASES : EFFECTEUR DE LA MORT PAR APOPTOSE.....	4
C) LES VOIES D' ACTIVATION DE L' APOPTOSE	6
1) <i>La voie extrinsèque</i>	7
2) <i>La voie mitochondriale</i>	8
D) LES INHIBITEURS DE L' APOPTOSE.....	8
1) <i>Les protéines inhibitrices de l'apoptoses (IAP)</i>	9
2) <i>Les protéines c-FLIP</i>	10
II- LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 :	10
A) CLASSIFICATION STRUCTURELLE ET FONCTIONNELLE DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 ...	11
1) <i>Classification structurelle</i>	11
2) <i>Classification fonctionnelle</i>	12
B) LES PROTEINES PRO-APOPTOTIQUES A PLUSIEURS DOMAINES BAX ET BAK	12
C) LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2	15
1) <i>Structure des protéines anti-apoptotiques</i>	16
2) <i>Bcl-2</i>	17
a) Rôle de Bcl-2 dans la survie cellulaire.	17
b) Rôle de Bcl-2 dans le cycle cellulaire	18
c) Régulation de Bcl-2	19
3) <i>Mcl-1</i>	22
a) Structure, expression et fonctions de MCL-1	22
b) Régulation de Mcl-1	23
4) <i>Bcl-X_L</i>	25
5) <i>Bcl-w</i>	25
6) <i>Bfl-1</i>	25
D) LES PROTEINES PRO-APOPTOTIQUES A UN SEUL DOMAINE BH3	26
1) <i>Les BH3-only activatrices</i>	26
a) Bim.....	26
b) Bid	27
2) <i>Les BH3-only sensibilisatrices</i>	27
a) Bad.....	28
b) Hrk.....	28

c) Puma	28
d) Noxa.....	29
e) Bik.....	29
f) Bmf.....	29
E) LE BH3 PROFILING	29
1) Description de la technique	30
2) Différents types de blocages dans le processus d'apoptose des cellules tumorales	31
3) Priming mitochondrial ou proximité du seuil apoptotique.....	32
4) Dépendance spécifique aux différentes protéines anti-apoptotiques.....	33
III- BH3 MIMETIQUES : MOLECULES CIBLANT BCL-2	33
A) CIBLER BCL-2 : NEUTRALISER LA FONCTION <i>VERSUS</i> INHIBER L'EXPRESSION	33
B) ABT-737 ET ABT-263	34
a) Structure et efficacité pré-clinique.....	34
b) Facteurs de résistance à l'ABT-737.....	38
c) Développement clinique de l'ABT-263.....	38
C) ABT-199	40
D) AUTRES MOLECULES BH3 MIMETIQUES OU APPARENTÉES.....	41
1) GX15-070 ou Obatoclax	41
2) Gossypol et AT-101.....	42
3) SI.....	42
4) Marinopyrrole A ou maritoclax.....	42
5) WEHI-539	43
IV- LE MYELOME MULTIPLE ET LE LYMPHOME A CELLULES DU MANTEAU.....	43
A) LE MYELOME MULTIPLE	43
1) Oncogenèse	43
a) Le plasmocyte : étape ultime de la différenciation lymphoïde B	43
b) Événements oncogéniques primaires.....	45
c) Événements oncogéniques secondaires	47
d) Classification moléculaire du myélome multiple	47
e) Perturbation de l'apoptose dans le MM.....	48
f) Evolution clonale.....	49
g) Interactions avec le microenvironnement.....	49
2) Aspects diagnostiques	51
a) Critères diagnostiques	51
b) Cytologie et immuno-phénotype	52
c) Cytogénétique	53
3) Présentation clinique	53
4) Aspects pronostiques.....	54
5) Prise en charge thérapeutique.....	55

a) Abstention – surveillance.....	55
b) Traitement de première ligne.....	56
c) Traitement de la rechute	57
B) LE LYMPHOME A CELLULES DU MANTEAU.....	57
1) <i>Oncogenèse</i>	58
a) Cellule d'origine et modèle d'oncogenèse.....	58
b) La translocation t(11;14)	60
c) Inhibition de l'apoptose	61
d) Activation de la voie du BCR.....	61
f) Anomalies de réparation des dommages à l'ADN	63
2) <i>Aspects diagnostiques</i>	63
a) Anatomico-pathologie	63
b) Cytologie et immunophénotype.....	64
c) Cytogénétique	65
3) <i>Présentation clinique</i>	66
4) <i>Aspects pronostiques</i>	67
5) <i>Prise en charge thérapeutique</i>	67
a) Abstention – surveillance.....	67
b) Traitement de première ligne.....	68
c) Traitement de la rechute	68
RESULTATS.....	70
<i>ARTICLE 1 : L'ABT-737 induit l'apoptose des cellules tumorales de LCM présentant un profil Bcl-2^{fort}/Mcl-1^{faible} et agit en synergie avec d'autres agents antitumoraux</i>	<i>72</i>
<i>ARTICLE 2 : L'ABT-199, molécule BH3 mimétique Bcl-2 spécifique, une drogue prometteuse pour les patients atteints de myélome multiple avec translocation t(11 ;14).....</i>	<i>83</i>
<i>ARTICLE 3 : La technique de BH3 profiling permet de déterminer la dépendance à Bcl-2 des cellules de myélome multiple et prédit la sensibilité aux BH3 mimétiques.</i>	<i>89</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	108
I- EVALUATION PRE-CLINIQUE DE L'ABT-737 DANS LE LYMPHOME A CELLULES DU MANTEAU...	109
II- EVALUATION PRE-CLINIQUE DE L'ABT-199 DANS LE MYELOME MULTIPLE.....	113
III- APTITUDE DU <i>BH3 PROFILING</i> A IDENTIFIER LA DEPENDANCE A BCL-2 DES CELLULES DE MYELOME MULTIPLE ET A PREDIRE LA SENSIBILITE AUX BH3 MIMETIQUES	115
CONCLUSION.....	119
ANNEXE.....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	146

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

FIGURE 1 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE LA MORT PAR APOPTOSE.....	3
FIGURE 2: STRUCTURE DES CASPASES	5
FIGURE 3: SCHEMA GENERAL DE L'APOPTOSE	6
FIGURE 4: STRUCTURE DES IAP	9
FIGURE 5: STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	11
FIGURE 6: FONCTION DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	13
FIGURE 7: STRUCTURE DE BAX ET BAK.....	14
FIGURE 8: ACTIVATION ET OLIGOMERISATION DE BAX.....	15
FIGURE 9: STRUCTURE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES.....	16
FIGURE 10: ROLES DE BCL-2 DANS LA SURVIE CELLULAIRE	18
FIGURE 11: ROLES DE BCL-2 DANS LE CYCLE CELLULAIRE	19
FIGURE 12: MECANISMES DE LA REGULATION DE BCL-2	22
FIGURE 13: SCHEMA DE LA TECHNIQUE DE BH3 PROFILING.....	31
FIGURE 14: DIFFERENTS BLOCAGES DE L'APOPTOSE PRECISES PAR LE BH3 PROFILING.....	32
FIGURE 15: STRUCTURE DE L'ABT-737	35
FIGURE 16: STRUCTURE DE L'ABT-263	36
FIGURE 17: MECANISME D'ACTION DE L'ABT-737	37
FIGURE 18: DONNEES D'EFFICACITE ET DE TOXICITE DE L'ABT-263 CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE	39
FIGURE 19: STRUCTURE DE L'ABT-199	40
FIGURE 20: INITIATION ET PROGRESSION DU MYELOME MULTIPLE.....	45
FIGURE 21: RUPTURE DE LA BALANCE OSTEOGENESE/OSTEOLYSE DANS LE MYELOME	50
FIGURE 22: ASPECTS CYTOLOGIQUES DES PLASMOCYTES.....	52
FIGURE 23: IMPACT PRONOSTIC DES ANOMALIES CYTOGENETIQUES	55
FIGURE 24: PROPOSITION DE MODELE D'ONCOGENESE DU LCM.....	59
FIGURE 25: CONSEQUENCE DE LA TRANSLOCATION T(11;14) SUR LE CYCLE CELLULAIRE DANS LE LYMPHOME A CELLULES DU MANTEAU	60
FIGURE 26: ASPECT CYTOLOGIQUE DES CELLULES DE LCM.....	65
FIGURE 27: STRATEGIE THERAPEUTIQUE SELON LE PROFIL D'EXPRESSION DE BCL-2 ET MCL-1 DES CELLULES DE LCM ...	110
FIGURE 28: INFLUENCE DE LA MCL-1 DEPENDANCE SUR LA SENSIBILITE AUX BH3 MIMETIQUES	116
FIGURE 29: SCHEMA BILAN DES ECHANTILLONS PRIMAIRES TESTES A L'ABT-199	117
FIGURE 30: REPONSE CLINIQUE A L'ABT-199 OBTENUE CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE MYELOME REFRACTAIRE	118

TABLEAUX

TABLEAU 1: ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES DIFFERENTS MODES DE MORT CELLULAIRE	4
TABLEAU 2: PHOSPHORYLATIONS DE MCL-1	24
TABLEAU 3: AFFINITES DES BH3-ONLY POUR LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES	27
TABLEAU 4 : SEQUENCES DES PEPTIDES BH3 ET EFFETS ATTENDUS.....	30
TABLEAU 5: AFFINITE DE L'ABT-199 POUR LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES	40
TABLEAU 6: DEFINITION D'UNE MOLECULE BH3 MIMETIQUE	41
TABLEAU 7: TRANSLOCATIONS RECURRENTES DANS LE MYELOME MULTIPLE	46
TABLEAU 8: EVENEMENTS ONCOGENIQUES SECONDAIRES RETROUVES DANS LE MYELOME MULTIPLE.....	48
TABLEAU 9: CRITERES DIAGNOSTIQUES DES GAMMAPATHIES MONOCLONALES.....	51
TABLEAU 10: IMMUNO-PHENOTYPE DES PLASMOCYTES NORMAUX OU ANORMAUX.....	53
TABLEAU 11: INTERNATIONAL STAGING SYSTEM	54
TABLEAU 12: FORMES MORPHOLOGIQUES DU LCM	64

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN : acide désoxyribonucléique

AIF : *apoptosis inducing factor*

Apaf-1 : *apoptotic protease activating factor 1*

ARN : acide ribonucléique

B

BAD : *Bcl-2-associated agonist of cell death*

BAK : *Bcl-2 antagonist/killer 1*

BAX : *Bcl-2-associated X protein*

BCL-2 : *B cell lymphoma 2*

BCR : *B cell receptor*

BH : *Bcl-2 homology*

BID : *BH3-Interacting Domain death agonist*

BIK : *Bcl-2 Interacting Killer*

BIM : *Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*

BLIMP-1 (*B Lymphocyte Induced Maturation Protein-1*)

BMF : *Bcl-2 Modifying Factor*

BOK : *Bcl-2-related ovarian Killer*

BTK : *Bruton Tyrosin Kinase*

C

CARD : *caspase activation and recruiting domain*

CDK : *cyclin dependent kinase*

c-FLIP : *cellular FADD-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE) inhibitory proteins*

CHK-1 : *checkpoint 1 protein*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

D

DED : *death Effector domain*

DISC : *death inducing signalig complex*

DL₅₀ : *dose létale 50, soit la dose induisant la mort de 50% des cellules*

E

ERK : *extracellular-signal-regulated kinase*

F

FADD : *fas-associated death domain*

FGFR3 : *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*

FISH : *Fluorescence in situ Hybridization*

H

HECT : *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*

HIF : *hypoxia inducing factor*

HRK : *Harakiri*

Hsp70 : *Heat shock protein 70*

I

IAP : *inhibotor of apoptosis protein*

IGF : *insulin growth factor*

INrf2 : *inhibitor of nuclear respiratory factor 2*

I3PR : *récepteur de l'inositol triphosphate*

IRF-4 : *Interferon Regulatory Factor-4*

IRM : *imagerie par résonnance magnétique nucléaire*

ISS : *international staging system*

J

JNK : *c-Jun N-terminal protein Kinase*

L

LCM : lymphome à cellules du manteau

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LNH : lymphome non-hodgkinien

M

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MCL-1 : myeloid cell leukemia 1

MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée (*monoclonal gammopathy of unknown significance*)

miRNA : micro ARN

MM : myélome multiple

MME : membrane mitochondriale externe

MMSET : *Multiple Myeloma SET*

mTOR : mammalian target of rapamycin

N

NAF-1 : *Nutrient deprivation Autophagy Factor 1*

NFκ-B : *nuclear factor kappa B*

P

Pax5 : *paired box gene*

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR : *polymerase chain reaction*

PKC : *Protein Kinase C*

PUMA : *P53 upregulated modulator of apoptosis*

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

R

RANK : *Receptor Activator of NF-κB*

RING : *Really Interesting New Gene*)

S

SERCA : *Sarcoplasmic./Endoplasmic Reticulum Calcium ATP ase*

\$ICAD : *Inhibitor of Caspase Activated DNase*

SMAC : *Second mitochondria-derived activator of caspase*

SMM : *myélome indolent (smoldering multiple myeloma)*

T

TM : *transmembranaire*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRADD : *TNF-associated Death Domain*

TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

V

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VLA-4 : *very late antigen 4*

X

XBP-1 : *x box binding protein-1*

Introduction bibliographique

I- L' APOPTOSE

Le terme « apoptose » apparaît en 1972 pour décrire un mode de mort cellulaire observé dans de nombreux tissus et partageant des caractéristiques morphologiques communes, distinctes de celles observées lors du processus de mort par nécrose. (Kerr *et al*, 1972) L'apoptose désigne le processus physiologique régulé par lequel une cellule déclenche son auto-destruction en réponse à un signal de mort. Cette mort cellulaire programmée est essentielle au développement et à l'homéostasie des organismes pluricellulaires en permettant l'élimination des cellules anormales, endommagées ou surnuméraires. L'altération de ce phénomène d'apoptose est une caractéristique commune des cellules tumorales, promouvant ainsi leur survie et la résistance aux traitements. (Hanahan & Weinberg, 2000)

A) L'apoptose, un processus de mort cellulaire spécifique

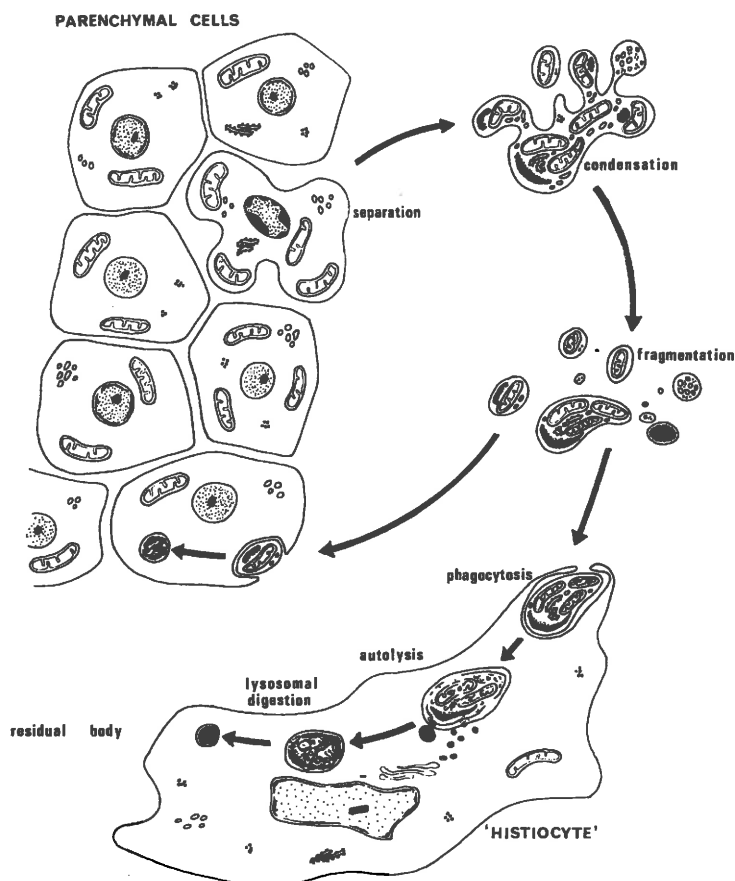
Selon les recommandations du groupe d'expert *Nomenclature Committee on Cell Death*, la classification des différentes modalités de mort cellulaire repose essentiellement sur des critères morphologiques. (Galluzzi *et al*, 2007) Ainsi, la mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire de type 1) se caractérise par une pycnose nucléaire (condensation de la chromatine) puis une karyorrhexie (fragmentation nucléaire). Il se forme ensuite les corps apoptotiques, entourés de membranes plasmiques et contenant des organelles cytoplasmiques ou des fragments nucléaires. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés. (Kerr *et al*, 1972) (Figure 1). L'apoptose se distingue des autres modes de mort cellulaire : l'autophagie, la nécrose et la catastrophe mitotique (Tableau 1).

De manière opposée à l'apoptose qui est un processus rapide, l'autophagie est un processus lent, spatialement limité, au cours duquel les parties du cytoplasme sont séquestrées dans des vacuoles à double membranes, puis digérées par les hydrolases lysosomales. La mort cellulaire par autophagie (mort cellulaire de type 2) se définit par cette vacuolisation massive du cytoplasme. (Levine & Yuan, 2005)

La nécrose (ou mort cellulaire de type 3) est généralement définie de façon négative, comme un type de mort cellulaire avec rupture de la membrane plasmique sans les caractéristiques de l'apoptose (pycnose, karyorrhexie, corps apoptotiques) et sans vacuolisation massive autophagique. (Golstein & Kroemer, 2007) Les principales caractéristiques de la

nécrose comprennent un gain de volume cellulaire (oncoses) qui entraîne à terme la rupture de la membrane plasmique.

Figure 1 : Caractéristiques morphologiques de la mort par apoptose



issu de Kerr et al, 1972

Légende : La figure illustre les caractéristiques morphologiques de l'apoptose au niveau de cellule parenchymateuses (*parenchymal cells*). Après une phase pycnose nucléaire (condensation de la chromatine) puis de karyorrhexie (fragmentation nucléaire), la cellule se fragmente en corps apoptotiques (fragments cellulaires entourés de membranes plasmiques et contenant des organelles cytoplasmiques ou nucléaires). Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés.

Les cellules nécrotiques ont la capacité de promouvoir une réponse inflammation locale. La nécrose a longtemps été opposée à l'apoptose de par son caractère non programmé. Il est maintenant démontré que la nécrose peut être enclenchée par des voies moléculaires déterminées. Cette mort par « nécrose programmée » est nommée nécroptose et est impliquée dans de nombreux processus pathologiques : infarctus du myocarde, pancréatite aigue, athérosclérose *etc* (Linkermann & Green, 2014)

Tableau 1: Aspects morphologiques des différents modes de mort cellulaire

Mode de mort cellulaire	Caractéristiques Morphologiques	Notes
Apoptose (type 1)	- Arrondissement de la cellule - Réduction du volume cellulaire et nucléaire (pynose) - Rétraction des pseudopodes - Fragmentation nucléaire (karyorrhexie) - Modification des organites cytoplasmiques - Bourgeonnement de la membrane plasmique	«Apoptose» est le terme initial présenté par Kerr <i>et al.</i> pour définir une mort cellulaire avec caractéristiques morphologiques spécifiques
Autophagie (type 2)	- Absence de condensation de la chromatine - Vacuolisation massive du cytoplasme	«Autophagie » définit la mort cellulaire survenant avec autophagie
Nécrose (ou onchose) (type 3)	- Gonflement cytoplasmique - Rupture de la membrane plasmique - Gonflement des organites cytoplasmiques - Condensation modérée de la chromatine	« nécrose » identifie, de manière négative, une mort cellulaire ne remplissant pas les critères d'apoptose ou d'autophagie
Catastrophe mitotique	- micronucléation - multinucléation	La catastrophe mitotique désigne une mort cellulaire faisant suite à un échec de mitose

d'après Galluzzi et al, 2007

La catastrophe mitotique désigne la mort cellulaire survenant pendant, ou peu de temps après une mitose échouée. (Castedo *et al*, 2004) Ce processus s'accompagne de micronucléation et multi-nucléation qui se produisent avant la mort de la cellule. La catastrophe mitotique est la conséquence d'anomalies de points de contrôle du cycle cellulaire ou de dommages cellulaires.

B) Les caspases : effecteur de la mort par apoptose

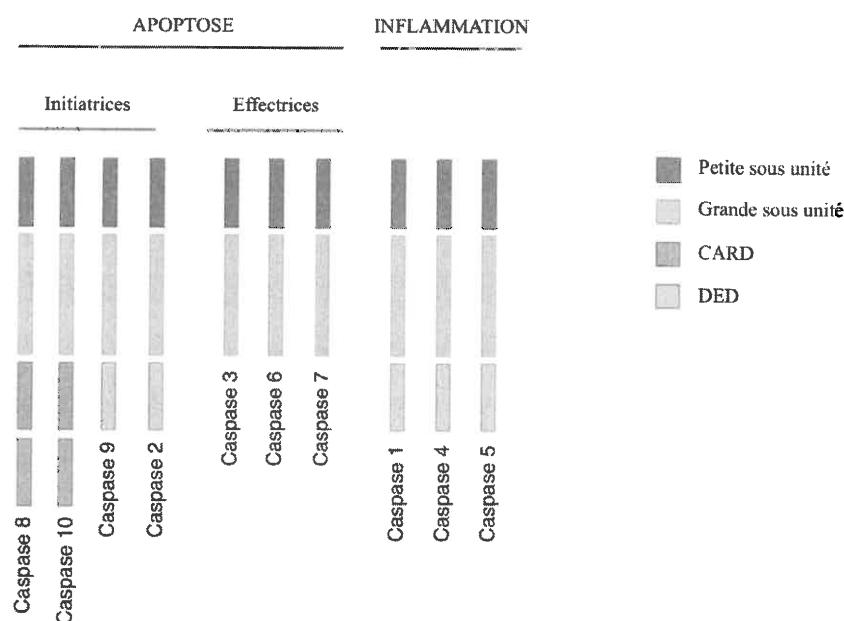
Quelque soit le mode d'activation du programme apoptotique, la conséquence commune est l'activation des caspases, véritable effecteur de la mort cellulaire. (Degterev *et al*, 2003) Les caspases sont des endoprotéases appartenant à la famille des cystéines protéases. Elles ont pour caractéristique commune et spécifique l'aptitude de pouvoir cliver leur substrat après un résidu aspartate. Chez l'humain elles sont au nombre de 11: caspases 1 à 10 et caspase 14. Les caspases

Les caspases sont synthétisées sous forme de pro-formes inactives, constituées d'un pro-domaine et de deux sous-unités, p17 et p21. L'activation des caspases est médiée par une série de clivages séparant les deux sous-unités ainsi que la grande sous-unité et le pro-domaine.

La forme active de l'enzyme correspond à un tétramère constitué de l'association de deux petites et de deux grandes sous-unités.

D'un point de vue fonctionnel, on distingue les caspases initiateuses (caspase 2, 8, 9, 10 et 12) et les caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7). A noter que les caspases 1, 5 et 11 constituent un sous-groupe de caspases initiateuses impliquées dans l'inflammation. (McIlwain *et al*, 2013) (Figure 2) Les *caspases initiateuses* sont caractérisées par la présence au sein du pro-domaine des motifs d'interactions protéine-protéine DED (*Death Effector Domain*) ou CARD (*Caspase Activation and Recruiting Domain*). Ces motifs permettent le recrutement des caspases initiateuses au sein de complexes multi-protéiques induisant leur activation. Les *caspases effectrices* (caspases 3, 6 et 7) sont activées principalement par les caspases initiateuses. Elles ont un pro-domaine plus court que les caspases initiateuses et ne possèdent pas de domaine de recrutement. Les caspases effectrices peuvent également activer des caspases en amont grâce à une boucle d'amplification.

Figure 2: Structure des caspases



d'après McIlwain, 2013

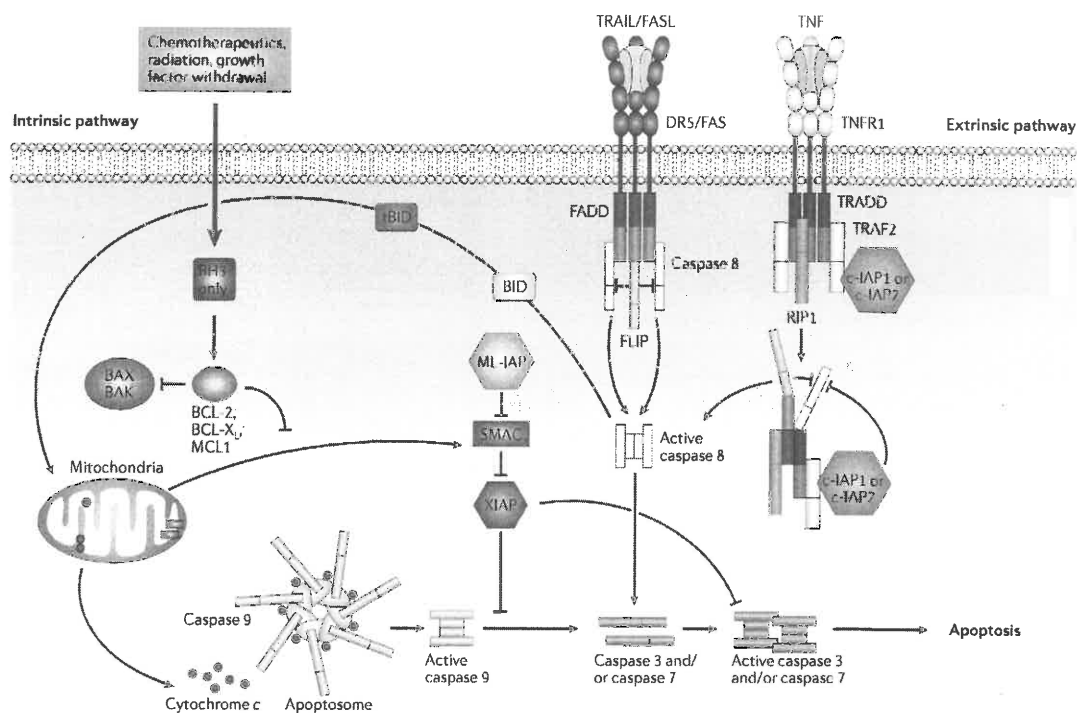
La caspase 3 représente la caspase située le plus en aval de cette cascade d'activation et représente un point de non retour dans le processus apoptotique. Les caspases effectrices orchestrent la destruction des diverses structures cellulaires par clivage de substrats spécifiques. Par exemple, la fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose est médiée par le clivage

d'ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*), l'inhibiteur de l'endonuclease CAD qui clive l'ADN en fragments oligomériques caractéristiques. (Nagata, 2000)

C) Les voies d'activation de l'apoptose

La cascade d'activation des caspase conduisant à la mort cellulaire peut être engagée par deux principales voies : la voie extrinsèque et la voie mitochondriale de l'apoptose. La figure 3 schématise ces deux principales voies de l'apoptose. (Fulda & Vucic, 2012)

Figure 3: Schéma général de l'apoptose



d'après Fulda & Vucic, 2012

Légende : La *voie intrinsèque* de l'apoptose est engagée par différents signaux de morts (i.e chimiothérapie, irradiation, baisse de facteur de croissance) qui activent les protéines *BH3 only* pro-apoptotiques, activant à leur tour BAX et BAK. La polymérisation de ces derniers va induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et donc la libération du cytochrome c, induisant l'activation des caspases et la mort cellulaire par apoptose. Les protéines anti-apoptotiques dont Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 inhibe la voie intrinsèque. La *voie extrinsèque* est engagée par l'activation des récepteurs de mort (DR5, TNFR1) par leur ligand. Cette activation induit le recrutement de complexes protéiques (FADD, TRADD) activant la caspase 8 puis les caspases effectrices 3 et 7. Le clivage de BID en t-BID peut également activer la voie intrinsèque. Les protéines inhibant l'apoptose (IAP) (telles XIAP, c-IAP) inhibent l'apoptose principalement *via* la voie extrinsèque.

1) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose désigne le déclenchement du programme apoptotique par l'activation des récepteurs de morts. Les récepteurs de mort appartiennent à la super-famille des récepteurs du *Tumor Necrosis Factor* (TNF), qui comprend plus de 20 membres impliqués dans des fonctions cellulaires diverses : régulation de la mort cellulaire, de l'immunité et de la différenciation. (Ashkenazi, 2002)

Cette famille est divisée en trois sous-groupes en fonction de la structure de leur partie cytoplasmique et des voies de signalisation induites. (Dempsey *et al*, 2003) Seuls les récepteurs du premier groupe sont capable d'induire un signal de mort, et possèdent un domaine cytoplasmique appelé *Death Domain*, impliqué dans la transmission du signal de mort de la membrane de la cellule aux voies de signalisations intracellulaires. Les récepteurs de morts les mieux caractérisés sont le CD95 (APO-1/Fas), le TNF receptor-1 (TNFR1), *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1* (TRAIL-R1) et TRAIL-R2. Ces différents récepteurs sont respectivement activés par leur interaction avec les ligands suivants : CD95L, TNF- α et lymphotoxine- α , TRAIL.

La voie CD95/CD95L est principalement impliquée dans la régulation de l'apoptose des cellules du système immunitaire. (Krammer, 2000) CD95L est produit par les lymphocytes T activés et induit ainsi de manière autocrine ou paracrine le suicide cellulaire. L'expression aberrante de CD95L par les cellules tumorales a été impliquée dans le mécanisme d'échappement immunitaire des cancers. (Krammer, 2000)

La fixation des ligands sur leurs récepteurs respectifs induit la polymérisation des récepteurs de mort et le regroupement de leur *Death Domain*. Cette étape induit le recrutement de molécules adaptatrices, *Fas-associated Death Domain* (FADD) ou *TNF-associated Death Domain* (TRADD) qui recrutent à son tour la caspase 8, permettant la formation du complexe *Death Inducing Signaling Complex* (DISC). (Kischkel *et al*, 1995) Ce complexe induit l'oligomérisation et l'activation par auto-clivage de la caspase 8, qui va à son tour activer les caspases effectrices 3 et 7. Cependant, la caspase 8 peut également activer la voie mitochondriale de l'apoptose en clivant la molécule Bid, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. (Danial & Korsmeyer, 2004)

2) La voie mitochondriale

La voie mitochondriale de l'apoptose est engagée à la suite de signaux de morts : dommages à l'ADN, privation en facteurs de croissance, activation d'oncogène, dérégulation du cycle cellulaire, de certaines voies de signalisation *etc.* L'engagement dans cette voie de l'apoptose est gouverné par les interactions entre les membres de la famille Bcl-2, qui seront décrites dans la partie II de la thèse. Le point de non retour du déclenchement de l'apoptose via la voie mitochondriale est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME). (Green & Kroemer, 2004) Cette perméabilisation requiert l'activation et la polymérisation de BAX et BAK, deux membres de la famille Bcl-2 indispensables à cette étape décisive de l'induction d'apoptose. (Wei *et al*, 2001) Ainsi, en réponse à un dommage ou à un stress cellulaire, les protéines BAX et BAK sont activées. Elles subissent une modification conformationnelle, constituent des homo-oligomères et forment de pores au sein de la MME. (Westphal *et al*, 2011) Cette perméabilisation entraîne le relargage de médiateurs pro-apoptotiques tels le cytochrome c, Smac (appelé également DIABLO), Apoptosis Inducing Factor (AIF), endonuclease G. (Saelens *et al*, 2004) Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c se lie à la molécule Apaf-1, une molécule possédant un domaine CARD (Zou *et al*, 1997). Ce complexe permet le recrutement et l'activation de la caspase 9, constituant ainsi l'apoptosome, structure multi-protéique induisant à son tour l'activation des caspases effectrices de l'apoptose. (Riedl & Salvesen, 2007)

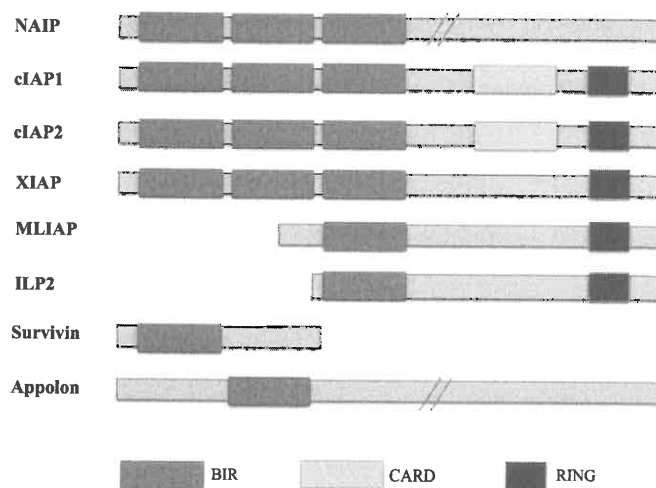
D) Les inhibiteurs de l'apoptose

L'apoptose, processus fondamental déterminant la survie cellulaire, est soumis à une régulation complexe. Trois groupes de protéines sont impliqués dans la régulation négative de l'apoptose : (i) les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (décrites dans la partie II de la thèse), (ii) les protéines inhibitrices de l'apoptoses (IAP), (iii) les protéines c-FLIP (cellular FADD-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE) inhibitory proteins).

1) Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (*inhibitors of apoptosis proteins*, IAP) sont les membres d'une famille hétérogène de protéines partageant un élément structural commun, le *baculoviral IAP Repeat* (BIR) domain. (Fulda, 2014) Huit IAP sont décrites chez l'humain (Figure 3) : *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* (NAIP), , *cellular IAP1* (cIAP1), cIAP2, X-linked IAP (XIAP), IAP like protein 2 (ILP2), *melanoma IAP* (MLIAP), survivin and appolon (Figure 4).

Figure 4: Structure des IAP



Les domaines BIR sont nécessaires aux interactions protéines – protéines médiant l'effet inhibiteur des caspases des IAP. Certaines IAP possèdent un domaine carboxy-terminal RING (*Really Interesting New Gene*) leur conférant une activité E3 ubiquitin ligase médiant la dégradation protéasomale de nombreux substrats, incluant les caspases. Enfin, cIAP1 et cIAP2 possèdent un domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*), permettant l'auto/hétéro-dimerisation avec d'autres protéines possédants un domaine CARD. (Fulda, 2014)

XIAP est considéré comme l'IAP le plus puissant en raison de sa capacité à inhiber simultanément les caspases 9, 3 et 7. (Eckelman *et al*, 2006) De plus, grâce à son domaine à activité E3 ubiquitin-ligase, XIAP induit la dégradation par le protéasome de molécules pro-apoptotiques, dont Smac et les caspases. (Vucic *et al*, 2011)

Le rôle anti-apoptotique des protéines cIAP1 et cIAP2 s'exerce principalement sur la voie extrinsèque de l'apoptose, via l'ubiquitination de RIP-1, enzyme clé à l'interface de

l'apoptose, de la nécroptose et de la voie NFκ-B. (Ofengeim & Yuan, 2013; Newton *et al*, 2014)

2) Les protéines c-FLIP

Le gène c-FLIP (*cellular FADD-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE) inhibitory proteins*) se situe sur le chromosome 2. Il est traduit, par épissage alternatif, en deux principales protéines : c-FLIP_S et c-FLIP_L. (Krueger *et al*, 2001) La protéine c-FLIP_L contient un domaine caspase-like et deux domaines DED, tandis que c-FLIP_S ne contient que les deux domaines DED.

L'effet anti-apoptotique de c-FLIPs est lié à une inhibition de la formation du complexe DISC ainsi qu'une inhibition directe de la caspase 8. Le rôle de c-FLIP_L dépend de son niveau d'expression : anti-apoptotique par inhibition de la caspase 8 si forte expression, pro-apoptotique à faible expression par activation de la caspase 8. (Krueger *et al*, 2001)

II- LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 :

Le gène BCL2 (B Cell Lymphoma 2) a initialement été cloné à partir du point de cassure de la translocation t(14;18), anomalie chromosomique caractéristique du lymphome folliculaire, un lymphome à cellules B de bas grade de malignité. (Tsujimoto *et al*, 1984; Bakhshi *et al*, 1985) Il a été démontré que l'expression de BCL2 inhibait la mort cellulaire. (McDonnell *et al*, 1989) Le rôle oncogénique de BCL2 a également été démontré, par son aptitude à induire, après une phase d'hyperplasie lymphoïde, un lymphome dans un modèle de souris transgénique. (McDonnell *et al*, 1989; McDonnell & Korsmeyer, 1991) Alors que les oncogènes précédemment décrits avaient pour caractéristique de favoriser la prolifération cellulaire, la découverte de BCL2 a fondé une nouvelle famille de gène inhibant la mort cellulaire par apoptose. Au cours des années ayant suivi la découverte de BCL2, plusieurs protéines partageant une analogie structurelle et l'aptitude de réguler l'apoptose ont été identifiées et constituant les protéines de la famille Bcl-2.

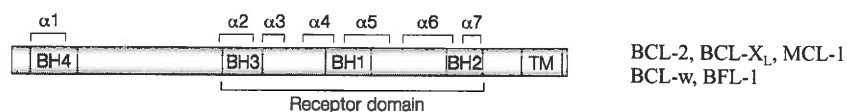
A) Classification structurelle et fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2

1) Classification structurelle

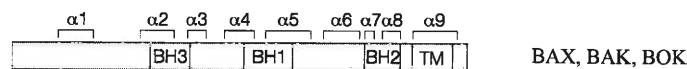
Les protéines de la famille Bcl-2 partagent une homologie de structure avec la présence de domaines BH (*Bcl-2 Homology domain*). Les différents membres de la famille Bcl-2 sont caractérisés par la présence d'au moins un domaine BH3, motif d'acides aminés conservé défini par la séquence LxxxGD. (Youle & Strasser, 2008)

Figure 5: Structure des protéines de la famille Bcl-2

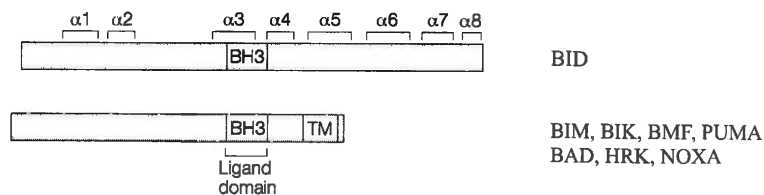
Protéines anti-apoptotiques à plusieurs domaines BH:



Protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines BH:



Protéines pro-apoptotiques à un seul domaine B (ou BH3 only):



d'après (Cory & Adams, 2002)

Ainsi, on distingue trois groupes de protéines de la famille Bcl-2 (Figure 5):

- les protéines anti-apoptotiques à quatre domaines BH : Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w et Bfl-1. Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment une poche hydrophobe qui est responsable de la fonction anti-apoptotique.
- les protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines BH: Bax, Bak et Bok.
- les protéines à un seul domaine BH3 (ou *BH3 only*) : Bim, Bid, Bik, Bmf, Puma, Bad, Hrk, Noxa.

2) Classification fonctionnelle

D'un point de vue fonctionnel, on distingue les protéines à plusieurs domaines BH anti-apoptotiques, les protéines à plusieurs domaines BH pro-apoptotiques et les protéines *BH3 only*, soit activatrices, soit sensibilisatrices de l'apoptose. (Figure 6) (Letai, 2008)

La réponse initiale aux signaux de morts activant la voie mitochondriale de l'apoptose est l'activation des protéines *BH3 only*. Cette activation fait intervenir des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles (modification de conformation). (Puthalakath & Strasser, 2002) Les protéines *BH3 only* Bim et Bid sont appelés activateurs et ont la capacité d'activer directement BAX et BAK. Les protéines à plusieurs domaines BH Bax et Bak sont les effecteurs de l'apoptose et donc pro-apoptotiques : leur activation par les *BH3 only* activateurs conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, point de non retour de l'apoptose. Les protéines à 4 domaines BH ont un rôle anti-apoptotique en séquestrant, au sein de la fente hydrophobe créée par les domaines BH, les protéines Bax et Bak et les *BH3 only* activateurs. Certaines protéines *BH3 only* sont appelées sensibilisatrices et n'ont pas la capacité d'activer directement Bax ou Bak. (Letai *et al*, 2002) Cependant, elles se lient avec affinité aux protéines anti-apoptotiques au sein du domaine hydrophobique constituée par les domaines BH. Ainsi, elles antagonisent l'action des protéines anti-apoptotiques en libérant, par liaison compétitive, les protéines *BH3 only* activatrices.

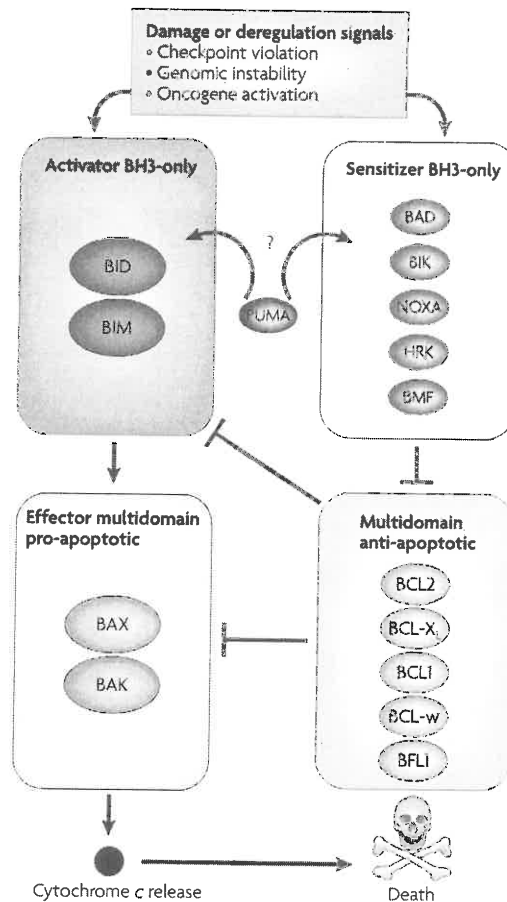
B) Les protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines Bax et Bak

Les protéines pro-apoptotiques Bax (*BCL-2-associated X protein*) et Bak (*BCL-2 antagonist/killer 1*) sont essentielles à l'induction d'apoptose via la voie mitochondriale. (Wei *et al*, 2001) Si l'expression de Bax et Bak est ubiquitaire, l'expression de Bok (*BCL-2-related ovarian Killer*) est restreinte aux tissus reproducteurs. (Hsu *et al*, 1997)

Les gènes codant pour Bax et Bak sont respectivement localisés sur le chromosome 19 (19q13) et 6 (6q21). Les protéines Bax et Bak sont des protéines de respectivement 21kDa et 23 kDa, comprenant 9 structures en hélice α formant les domaines BH1, BH2 et BH3. Leur

structure tridimensionnelle leur confère une forme globulaire proche de celle des membres anti-apoptotiques. (Suzuki *et al*, 2000; Westphal *et al*, 2011) (Figure 7). L'hélice α 9 constitue le domaine trans-membranaire (TM) et, chez Bax, est piégée dans la fente hydrophobique ce qui explique sa situation principalement cytosolique.

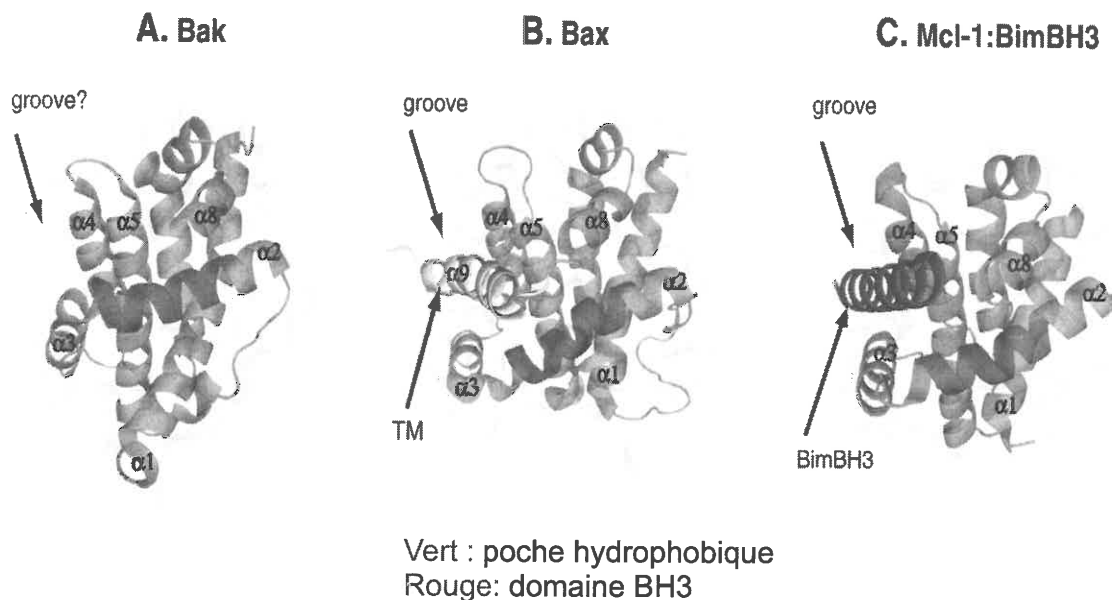
Figure 6: Fonction des protéines de la famille Bcl-2



d'après Letai, 2008

Légende : Les protéines *BH3 only* activatrices (boîte bleue) activent directement les protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines BAX et BAK (boîte violette). L'activation de ces dernières crée des pores dans la MME et libère ainsi le cytochrome c, qui active les caspases et déclenche la mort cellulaire. Les protéines anti-apoptotiques à plusieurs domaines (boîte orange) inhibent l'apoptose en séquestrant les *BH3 only* activatrices et ainsi que BAX et BAK. Les protéines *BH3 only* sensibilisatrices (boîte rouge) restaurent l'apoptose en inhibant la séquestration des protéines pro-apoptotiques par les protéines anti-apoptotiques. La protéine *BH3 only* Puma (vert) a été rapportée à la fois activatrice et sensibilisatrice.

Figure 7: Structure de Bax et Bak



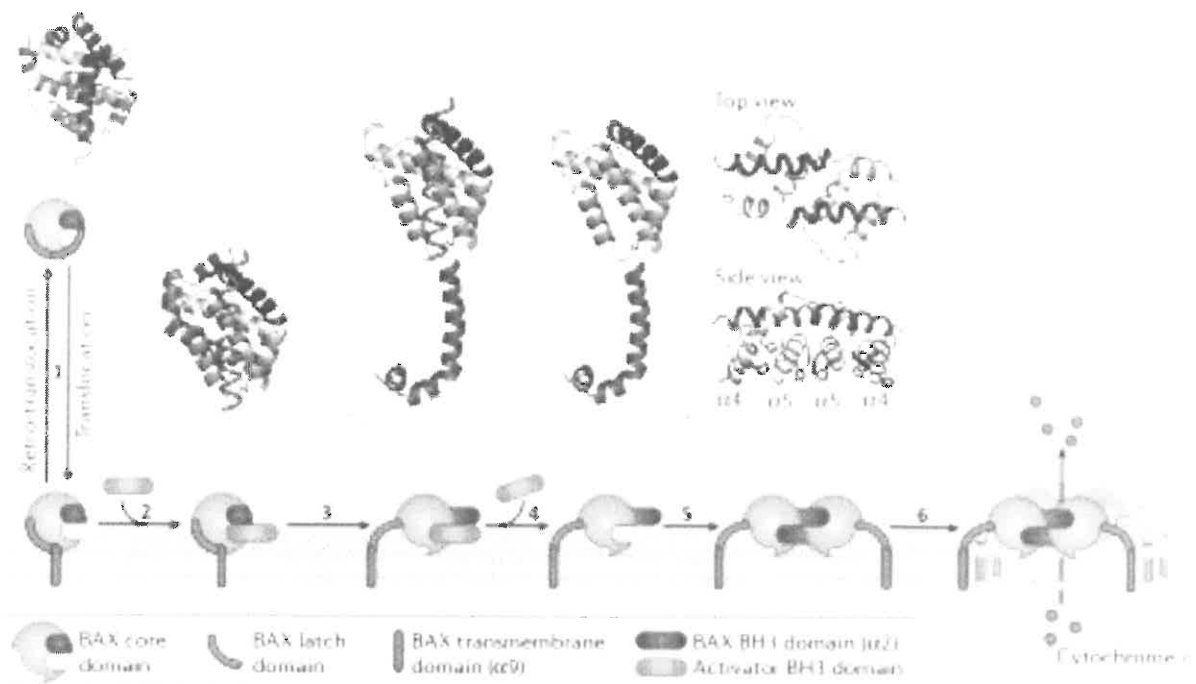
issu de Westphal et al, 2011

En situation normale, Bax est localisée dans le cytoplasme et maintenue sous forme inactive par liaison à des protéines chaperonnes, Ku70 et 14-3-3. En condition de stress apoptotique, Bax est libérée de ces chaperonnes par acétylation de Ku70 et phosphorylation de 14-3-3. (Cohen *et al*, 2004; Tsuruta *et al*, 2004). Bak est localisée à la membrane mitochondriale externe via, son hélice $\alpha 9$ trans-membranaire, où elle est maintenue sous forme inactive par une interaction avec VDAC2 (Cheng *et al*, 2003) ou avec des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-X_L ou Mcl-1. (Danial, 2007)

C'est la rupture de ces complexes par les protéines *BH3 only* activatrices Bim et Bid qui induit la libération et l'activation de Bax et Bak. Il a récemment été montré que Bim active préférentiellement Bax tandis que Bif active préférentiellement avec Bak. (Sarosiek *et al*, 2013) Une voie d'activation alternative de Bax et Bak, indépendante des *BH3 only* activatrices, est également décrite. Ainsi, il a été montré que p53 peut induire l'apoptose par activation directe de Bax. (Chipuk *et al*, 2004) Il a également été montré sur des lignées cellulaires que la chaleur pouvait également activer directement Bax et Bak. (Pagliari *et al*, 2005)

L'activation de Bax et Bak induit leur changement de conformation et leur homo-oligomérisation, détaillée en Figure 8. L'exposition des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 9$ permet la translocation de ces protéines à la mitochondrie. La formation du complexe avec les *BH3 only* activatrices entraîne l'oligomérisation et l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans la MME permettant ainsi la formation de pores. (Westphal *et al*, 2011)

Figure 8: Activation et oligomérisation de BAX



issu de (Czabotar et al, 2014)

Légende : L'activation de Bax induit un changement conformationnel avec exposition des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 9$ permettant la translocation à la mitochondrie. Après translocation à la MME, l'activation de Bax induit son homo-oligomérisation. La formation du complexe avec les *BH3 only* activatrices entraîne l'oligomérisation et l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans la MME permettant ainsi la formation de pores et la libération du cytochrome c.

Ainsi, l'activation de Bax et Bak perméabilise la membrane externe mitochondriale conduisant à la libération dans le cytoplasme de molécules déclenchant l'activation des caspases (cytochrome c, SMAC, endonuclease G, etc) présentes initialement dans l'espace inter-membranaire mitochondrial.

C) Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

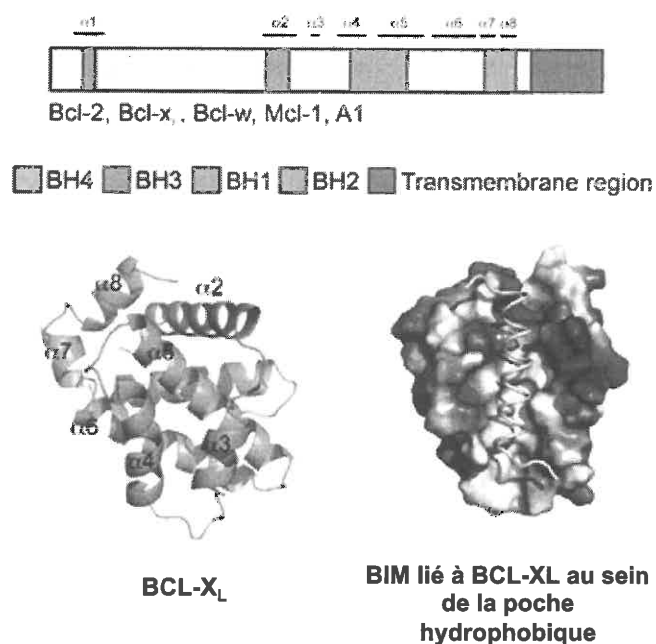
Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w et Bfl-1 régulent négativement la voie mitochondriale de l'apoptose *via* deux mécanismes principaux : (a) la liaison et la séquestration des *BH3-only* activatrices, empêchant ainsi l'activation par ces dernières de Bax et Bak ; (b) l'inhibition directe de Bax et Bak par interactions directes de ces

protéines avec les protéines anti-apoptotiques. (Certo *et al*, 2006; Cheng *et al*, 1996, 2001; Letai *et al*, 2002; Letai, 2008)

1) Structure des protéines anti-apoptotiques

Les protéines anti-apoptotiques sont caractérisées par une structure tridimensionnelle similaire. En effet, les protéines anti-apoptotiques présentent une structure globulaire composée de 9 hélices α formant les domaines TM et BH (BH1 à BH4) (Figure 9). Les domaines BH1, BH2 et BH3 interagissent entre eux pour former une poche hydrophobe à la surface de la protéine. Cette structure confère à la protéine son rôle anti-apoptotique en séquestrant en son sein les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les données de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que les structures tridimensionnelles de Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-w sont très proches. (Petros *et al*, 2001; Denisov *et al*, 2003) Le domaine BH4 est absent de certaines protéines anti-apoptotiques, dont Mcl-1. Ce domaine, localisé dans la partie N-terminale des protéines anti-apoptotiques, est impliqué dans l'activité anti-apoptotique. (Aouacheria *et al*, 2005) En effet, la suppression du domaine BH4 inactive les protéines Bcl-2 et de Bcl-X_L. (Huang *et al*, 1998) De plus, il a été montré que le clivage du domaine BH4 peut convertir Bcl-2 en une protéine pro-apoptotique. (Cheng *et al*, 1997)

Figure 9: Structure des protéines anti-apoptotiques



d'après (Lee & Fairlie, 2012)

2) Bcl-2

Bcl-2 est le membre fondateur de la famille Bcl-2. Son gène est localisé en 18q21 et a été découvert en 1984 comme étant le partenaire impliqué dans la translocation t(14;18), anomalie cytogénétique caractéristique du lymphome folliculaire. (Tsujimoto *et al*, 1984; Bakhshi *et al*, 1985) La protéine Bcl-2 joue un rôle majeur dans le contrôle de deux processus cellulaires majeurs : la survie cellulaire et la prolifération. (Vaux *et al*, 1988; Bonnefoy-Berard *et al*, 2004) L'importance capitale de ces fonctions implique une régulation très contrôlée.

a) Rôle de Bcl-2 dans la survie cellulaire.

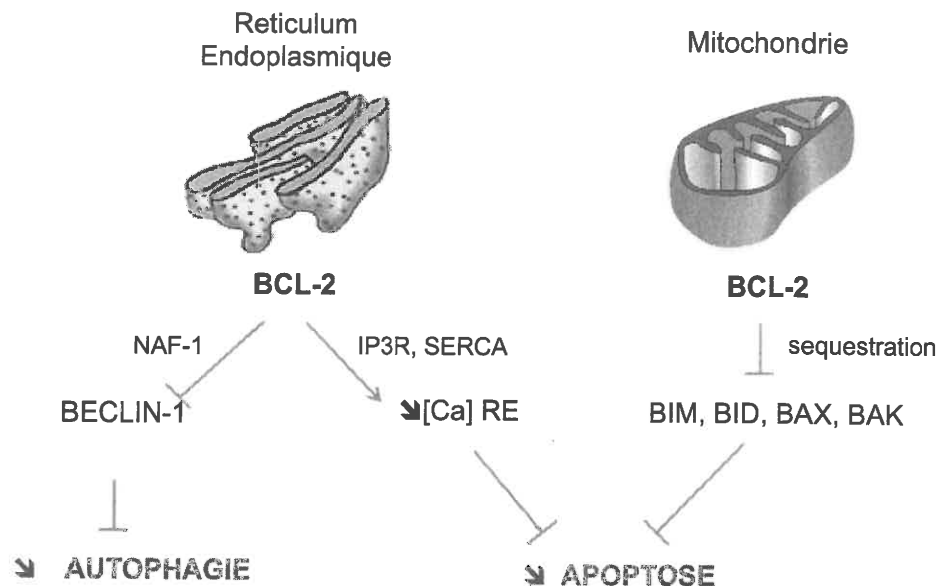
La fonction anti-apoptotique de Bcl-2 s'exerce principalement au niveau de la membrane mitochondriale externe, par ses interactions avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, la poche hydrophobique de Bcl-2 inhibe, en les séquestrant *via* leur domaine BH3, les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et les *BH3 only* activatrices Bim et Bid (Yin *et al*, 1994; Letai *et al*, 2002).

Le rôle anti-apoptotique de Bcl-2 s'exerce également en dehors de la mitochondrie. Ainsi, Bcl-2 peut également inhiber l'apoptose en aval de la mitochondrie par l'inhibition directe des caspases. (Swanton *et al*, 1999; Lin *et al*, 2005) Bien que Bcl-2 soit principalement localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe, Bcl-2 est également retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique (RE), où elle régule le flux du calcium du RE vers le cytosol. (Palmer *et al*, 2004) Il a été montré que Bcl-2 se lie avec la pompe à calcium SERCA (*Sarcoplasmic./Endoplasmic Reticulum CALcium ATP ase*) et l'inactive. (Dremina *et al*, 2004) Bcl-2 induit également une fuite de Ca du RE vers le cytosol en régulant le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R). (Pinton & Rizzuto, 2006) Ainsi, plusieurs groupes ont montré que Bcl-2 promouvait la survie cellulaire en diminuant les signaux de stress du RE via la diminution du pool calcique au sein du RE. (Oakes *et al*, 2006)

Enfin, Bcl-2, est un élément clé d'un autre processus de mort cellulaire, l'autophagie. Ainsi, il a été montré que Bcl-2 interagit avec la protéine Beclin-1 et inhibe l'autophagie. (Pattingre *et al*, 2005) Ce processus semble faire intervenir essentiellement la fraction de BCL-2 localisée au RE, et est favorisé par la protéine NAF-1 (*Nutrient deprivation Autophagy Factor 1*). (Pattingre *et al*, 2005; Chang *et al*, 2010)

Les rôles de Bcl-2 dans la survie cellulaire sont résumés dans la figure 10.

Figure 10: Rôles de Bcl-2 dans la survie cellulaire



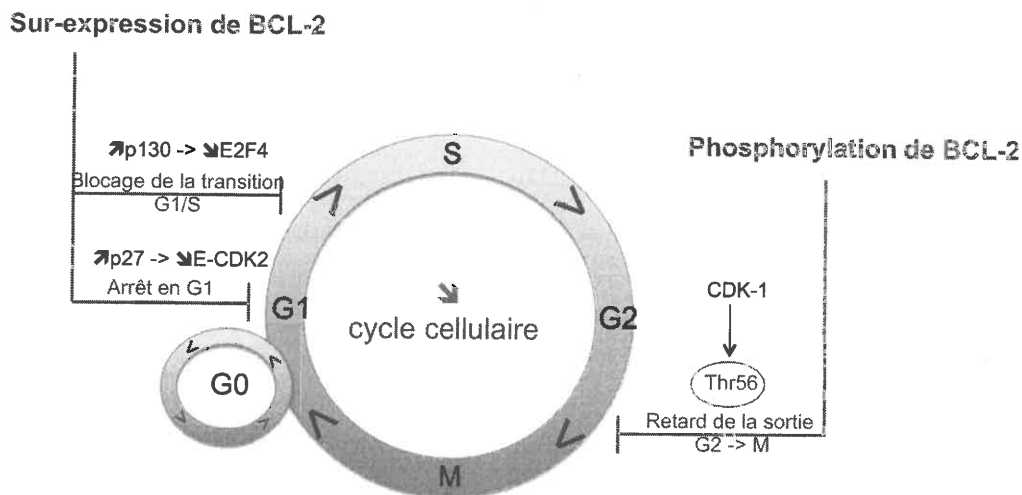
NAF-1 : Nutrient deprivation Autophagy Factor 1 ; IP3R : récepteur de l'inositol 3 phosphate ; SERCA : Sarcoplasmic./Endoplasmic Reticulum Calcium ATP ase ; CA : calcium ; RE : reticulum endoplasmique.

b) Rôle de Bcl-2 dans le cycle cellulaire

En addition de son rôle clé dans la survie cellulaire, Bcl-2 est également impliqué dans la prolifération cellulaire. (Bonnefoy-Berard *et al*, 2004) Il a été démontré dans un modèle de souris Bcl-2 transgénique que le renouvellement des thymocytes était ralenti, et que les cellules B et T exprimant le transgène BCL-2 entraient plus lentement dans le cycle cellulaire que les lymphocytes contrôles. (Linette *et al*, 1996; Mazel *et al*, 1996; O'Reilly *et al*, 1997, 1996) De manière inverse, les lymphocytes T ou B Bcl-2 déficients progressent plus rapidement dans le cycle cellulaire. (Linette *et al*, 1996) Bien que BCL-2 retarde la progression du cycle cellulaire, Bcl-2 n'affecte pas la croissance des lignées cellulaires ou des cellules primaires en culture. Parmi les mécanismes impliqués, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 induisait l'augmentation de p130 et p27, deux inhibiteurs du cycle cellulaire. (Vairo *et al*, 2000) L'accumulation de p130 induit l'inhibition d'E2F4 qui ne peut alors plus jouer son rôle de facteur de transcription des gènes impliqués dans la fin de la phase G0 et dans le point de contrôle de la phase G1, ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire. P27 inhibe le complexe cycline E/CDK2 qui permet le passage du point de restriction de la phase G1. Ainsi, l'accumulation de p27, au travers l'augmentation de son expression et la diminution de sa dégradation, induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Le rôle de Bcl-2 dans la régulation du cycle cellulaire est régulé par des modifications post traductionnelles. Ainsi, il a été montré qu'en réponse à certains agents, l'enzyme *cyclin dependent kinase* (CDK) 1 phosphoryle BCL-2 au niveau d'une thréonine en position 56, ce qui induit l'accumulation des cellules en phase G2/M et le retard du passage de la phase M à la phase G0/G1. (Furukawa *et al*, 2000) Cette phosphorylation n'affecte pas l'action anti-apoptotique de Bcl-2. Les rôles de Bcl-2 dans la régulation du cycle cellulaire sont résumés dans la figure 11.

Figure 11: Rôles de Bcl-2 dans le cycle cellulaire



d'après (Bonnefoy-Berard *et al*, 2004)

c) Régulation de Bcl-2

La régulation de l'expression et de la fonction de BCL-2 a lieu au niveau (i) transcriptionnel, (ii) post-transcriptionnel, (iii) post-traductionnel et (iv) par le système ubiquitine/protéasome. Ces mécanismes sont résumés dans la figure 12.

(i) **Régulation transcriptionnelle.** Le gène codant pour Bcl-2 est composé de trois exons (dont un non traduit) et deux introns. Deux régions promotrices sont décrites, P1 et P2. P2 est localisée au niveau de l'exon II et contient une CAAT et une TATA box, tandis que P1 est localisée au niveau de l'exon 1, au niveau d'une zone riche en paires GC. (Seto *et al*, 1988) P1 possède un site de liaison de Piel qui régule négativement la transcription de Bcl-2 et qui a été rapportée comme étant important dans la sélection des cellules pré-B. (Bigelow *et al*, 2004) Plusieurs facteurs de transcriptions ont été identifiés comme induisant la transcription de BCL-

2 : Brn3a dans les cellules neuronales, WT1, Aiolos dans les cellules T, HIV tat, Gli1 et Pax8. (Bigelow *et al*, 2004) La transcription du gène de Bcl-2 peut être induite par différentes cytokines : l'IL-7, l'IL-15, l'IGF-1 et le VEGF. (von Freeden-Jeffry *et al*, 1997; Kurowska *et al*, 2002; Beierle *et al*, 2002a, 2002b)

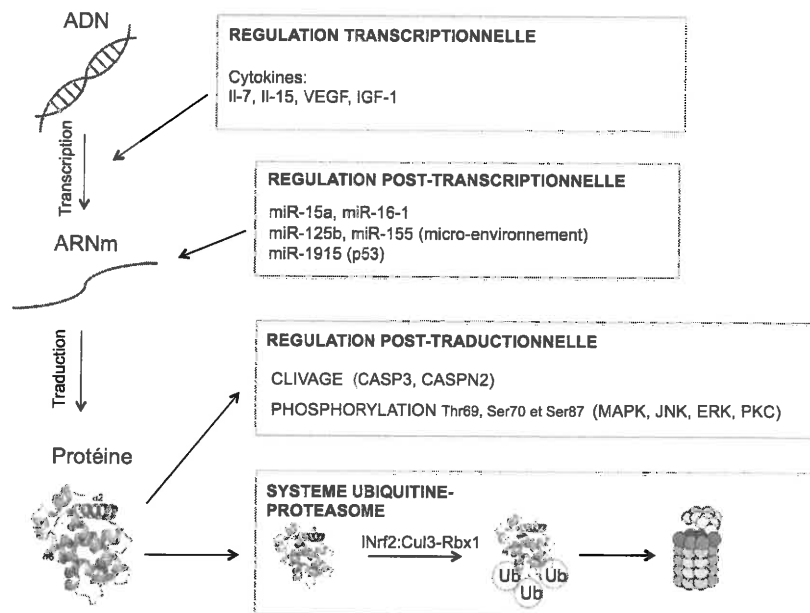
(ii) **Régulation post-transcriptionnelle.** La régulation post-transcriptionnelle de Bcl-2 est médiée par les micro-ARN (*miRNA*), fragments d'ARN courts, en épingle à cheveu, jouant un rôle majeur dans l'expression de nombreux gènes, dont des gènes impliqués dans l'apoptose ou la prolifération. L'ARN messager de Bcl-2 a été démontré comme étant la cible des miRNA miR-15a et miR-16-1. (Cimmino *et al*, 2005) Il est montré dans cette étude que l'expression de BCL-2 au niveau des cellules de LLC est corrélée à l'expression des miRNA miR-15a et miR-16-1. De plus, la surexpression de ces miRNA par une lignée cellulaire de leucémie réduit significativement l'expression de Bcl-2. Il a également été montré que le microenvironnement tumoral pouvait induire l'expression des miR-125b et miR-155 par des cellules leucémiques B, et réprimer ainsi l'expression Bcl-2. (Willimott & Wagner, 2012) Enfin, il a récemment été montré qu'en réponse à des dommages à l'ADN, p53 induisait l'expression d'un autre miRNA ciblant BCL-2 : miR-1915. (Nakazawa *et al*, 2014)

(iii) **Régulation post-traductionnelle.** Certaines modifications post-traductionnelles de Bcl-2 peuvent modifier sa fonction. Les deux principales modifications décrites sont la phosphorylation et le clivage de Bcl-2. Plusieurs protéines, parmi lesquelles CASP3 et CASPN2, ont la capacité de cliver Bcl-2 au niveau de résidus proche de l'extrémité N terminale. Ce clivage entraîne un effet pro-apoptotique : soit par la diminution de la quantité de Bcl-2, soit par une action pro-apoptotique directe du fragment clivé de Bcl-2, agissant tel une molécule BH3 activatrice. (Cheng *et al*, 1997; Gil-Parrado *et al*, 2002) La phosphorylation est un mécanisme de modification protéique rapide et réversible, induisant des conséquences fonctionnelles majeures telle la localisation cellulaire, la structure tri-dimensionnelle, la stabilité, les interactions protéines-protéines etc. La phosphorylation de Bcl-2 favorise la survie cellulaire tandis que la déphosphorylation favorise l'apoptose. (Deng *et al*, 2004; Willimott & Wagner, 2010) La régulation de ce processus de phospho-déphosphorylation est intimement liée au cycle cellulaire. En position Ser70 (soit au niveau de la FLD (*Flexible Loop Domain*) située entre les domaines BH3 et BH4), la phosphorylation de Bcl-2 stabilise l'interaction Bcl-2/Bax, inhibe la dégradation de Bcl-2 et bloque la liaison à p53. (Deng *et al*, 2000; Dimmeler *et al*, 1999) Les protéines kinases impliquées dans cette phosphorylation de Bcl-2 sont la MAPK

(*Mitogen Activated Protein Kinase*), ERK 1/2 (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*), JNK-1 (*c-Jun N-terminal protein Kinase*) et PKC (*Protein Kinase C*). (Deng *et al*, 2000, 2001; Ruvolo *et al*, 1998) Enfin, il a été montré que lorsque les cellules sont en phase de transition G2/M, Bcl-2 est physiologiquement phosphorylé en positions Thr69, Ser70 et Ser87, et ceci sous le contrôle de la voie ASK1-JNK. (Yamamoto *et al*, 1999) Ce processus de phosphorylation est également présent lors de traitement bloquant les cellules en G2/M, tel le paclitaxel. A ce niveau, la phosphorylation de Bcl-2 altère sa fonction anti-apoptotique. L'hypothèse avancée est que cette diminution du seuil apoptotique favorise l'élimination des cellules présentant des aberrations de ségrégation chromosomique. (Yamamoto *et al*, 1999)

(iv) **Régulation par le système ubiquitine-protéasome.** Le peptide ubiquitine (Ub) agit tel un marqueur dirigeant les protéines vers la dégradation par le protéasome. (Hershko & Ciechanover, 1998) Le procédé d'ubiquitylation des protéines fait intervenir les enzymes Ub-activating (E1), Ub-conjugating (E2) et Ub-ligating (E3). Les enzymes E3 sont classées en 2 familles : les enzymes E3 avec domaine HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*), et les enzymes E3 avec domaine RING (*Really Interesting New Gene*). Ce phénomène est équilibré par un phénomène inverse de déubiquitylation (Neutzner *et al*, 2012) Ces mécanismes de dégradation Ub-dépendante intéressent de nombreuses protéines de la famille Bcl-2, dont Bcl-2 elle-même. Ainsi, il a été montré que le complexe INrf2 :Cul3-Rbx1 conduisait à l'ubiquitylation et à la dégradation de Bcl-2. (Niture & Jaiswal, 2011) De manière intéressante, la phosphorylation de Bcl-2 est impliquée dans sa dégradation. Ainsi, la phosphorylation en position Ser70 empêche l'interaction entre INrf2 et Bcl-2. (Niture & Jaiswal, 2011) Enfin, il a été rapporté que la S-Nitrosylation sur les résidus cystéines 158 et 229 inhibe la dégradation de Bcl-2 par le protéasome. (Azad *et al*, 2006)

Figure 12: Mécanismes de la régulation de Bcl-2



3) Mcl-1

a) Structure, expression et fonctions de MCL-1

Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*) est une protéine anti-apoptotique à plusieurs domaines BH de la famille Bcl-2. Il s'agit du deuxième membre de cette famille identifié après Bcl-2. (Kozopas *et al*, 1993) Le gène Mcl-1 est localisé chez l'homme sur le chromosome 1. La protéine Mcl-1 diffère des autres membres anti-apoptotique par une taille plus importante (350 résidus, versus 239 pour Bcl-2) et par l'existence de trois domaines BH (Bcl-2 et Bcl-X_L en possèdent 4). (Thomas *et al*, 2010) Au niveau de cellules non tumorales, la demi-vie de la protéine Mcl-1 est très courte, inférieure à 3 heures. (Yoon *et al*, 2002) L'analyse de la structure tridimensionnelle de Mcl-1 démontre une structure globulaire similaire à celle des autres membre anti-apoptotiques, avec une fente hydrophobique permettant la liaison aux protéines possédant un domaine BH3. (Day *et al*, 2005) Comme Bcl-2, la localisation intracellulaire de Mcl-1 est principalement membranaire, *via* son domaine TM, et principalement au niveau mitochondrial. (Akgul *et al*, 2000a; Yang *et al*, 1995) L'étude par immunohistochimie de la localisation tissulaire montre que Mcl-1 est largement exprimée, mais avec des différences significatives avec BCL-2, suggérant des spécificités tissulaires du rôle

anti-apoptotique de ces protéines. (Krajewski *et al*, 1995) Au niveau lymphocytaire, il a été démontré que Mcl-1 était indispensable au développement et à la maintenance des lymphocytes B et T matures. (Opferman *et al*, 2003) Ce rôle essentiel de Mcl-1 dans la survie des lymphocytes B matures et des plasmocytes a été récemment confirmé. (Peperzak *et al*, 2013; Vikstrom *et al*, 2010) Enfin, la délétion totale de Mcl-1 est létale durant le développement embryonnaire chez la souris (Rinkenberger *et al*, 2000), tandis que la délétion de Bcl-2 ne l'est pas.

La principale fonction de Mcl-1 est son action anti-apoptotique *via* la séquestration et l'inhibition des membres pro-apoptotiques Bax et Bak, mais également les BH3-only activateurs BIM et BID. (Chen *et al*, 2005; Certo *et al*, 2006) Comme décrit pour Bcl-2, Mcl-1 est également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, Mcl-1 retarde la progression du cycle cellulaire en inhibant CDK-1 (*cyclin dependent kinase 1*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), et CHK-1 (checkpoint 1 protein). (Jamil *et al*, 2005; Fujise *et al*, 2000; Jamil *et al*, 2008)

b) Régulation de Mcl-1

L'expression et l'action de Mcl-1 sont soumises à une régulation complexe. Comme pour Bcl-2, cette régulation a lieu au niveau (i) transcriptionnel, (ii) post-transcriptionnel, (iii) post-traductionnel et (iv) par le système ubiquitine/protéasome.

(i) Régulation transcriptionnelle. La région promotrice du gène Mcl-1 contient des zones de liaison à des facteurs de transcription, parmi lesquelles : site de liaison à STAT3 (*consensus stat response element*) , site de liaison à l'AMP cyclique (*cAMP response element* (CRE)), site de liaison à NFκB. (Akgul *et al*, 2000b) Via STAT3, il a entre autre été montré, dans la leucémie lymphoïde chronique, et le myélome multiple que l'Il-6 et le VEGF augmentent la transcription de MCL-1. (Lee *et al*, 2005; Le Gouill *et al*, 2004; Puthier *et al*, 1999a)

(ii) Régulation post-transcriptionnelle. Mcl-1 est également soumise à une régulation post transcriptionnelle. Tout d'abord, un mécanisme d'épissage alternatif conduit à la formation d'une forme courte de Mcl-1, nommée Mcl-1s, ne comprenant pas les domaines BH1, BH2 et le domaine TM. Une seconde forme courte, nommée Mcl-1_{ES}, est également identifiée. Ces

deux transcrits alternatifs perdent leur fonction anti-apoptotique, et ont même un effet pro-apoptotique en se liant à la forme classique de Mcl-1. L'autre mécanisme de régulation post-transcriptionnelle est l'inhibition par les micro ARN. Ainsi, plusieurs micro ARN (miR-29b, miR-125b, miR-204) ont été identifiés comme régulant négativement l'expression de Mcl-1. (Mott *et al*, 2007; Chen *et al*, 2013; Gong *et al*, 2013)

(iii) **Régulation post traductionnelle.** La fonction de Mcl-1 est également régulée par de phosphorylations survenant en différents sites de la protéine. Ces phosphorylations et leurs conséquences fonctionnelles sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2: Phosphorylations de MCL-1

Site	Kinase(s) impliquée(s)	Conséquence fonctionnelle
Threonine 92	ERK-1	En conjugaison avec la phosphorylation en Thr163. Stabilise MCL-1, requis pour la fonction anti-apoptotique
Threonine 163	ERK, GSK-3, JNK	Phosphorylation « initiatrice » d'autres phosphorylations.
Serine 64	CDK1, CDK2, JNK	Pas d'effet sur la stabilité de MCL-1. Nécessaire pour la fonction anti-apoptotique et la dimérisation avec les autres protéines de la famille BCL-2.
Serine 121	JNK, P38	En conjugaison avec la phosphorylation en Thr163. Stabilise MCL-1. Favorise l'effet anti-apoptotique contre l'apoptose induite par le TNF.
Serine 155	GSK-3	En conjugaison avec la phosphorylation en Thr163. Déstabilise MCL-1, altère sa fonction anti-apoptotique.
Serine 159	GSK-3	Déstabilise MCL-1, altère sa fonction anti-apoptotique en altérant la dimérisation avec Bim

d'après Thomas et al, 2010

Un autre mécanisme de régulation post-traductionnelle est le clivage caspase-dépendant. (Thomas *et al*, 2010) Ce clivage peut être spontané ou induit par des drogues. Il a notamment été démontré dans le myélome multiple que le fragments clivé Mcl-1(128-350) exerçait une action pro-apoptotique, soit par activation directe de Bax (Ménoret *et al*, 2010), soit par de manière indirecte par l'activation de la voie c-JUN. (Fan *et al*, 2014)

(iv) **Régulation par le système ubiquitine-protéasome.** L'ubiquitylation de Mcl-1 conditionne sa dégradation par le protéasome. MCL-1 est la cible de deux enzymes ubiquitine-

ligases : MULE (*MCL-1 Ubiquitin Ligase E3*) et β TrCP (*β Transducin Containing Protein*). A l'inverse, l'enzyme deubiquitinase USP9X limite la dégradation par le protéasome de Mcl-1. (Schwickart *et al*, 2010) Enfin, la molécule *BH3-only* Noxa intervient dans cette régulation en contrôlant l'interaction Mcl-1/USP9X. (Gomez-Bougie *et al*, 2011)

4) Bcl-X_L

Le gène BCL-X_L (ou BCL2L1) est situé chez l'humain sur le chromosome 20. La protéine BCL-X_L possède les quatre domaines BH et le domaine TM. Bcl-X_L exerce sa fonction anti-apoptotique en séquestrant les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 : Bax, (Sedlak *et al*, 1995) Bak, (Sattler *et al*, 1997) Bim, (Liu *et al*, 2003) ou Bid. (Yao *et al*, 2009) Tel que décrit pour Bcl-2, Bcl-X_L peut également inhiber l'apoptose en aval de la mitochondrie en se liant de façon directe à APAF-1 et ainsi former un complexe protéique inhibant l'activation de la caspase 9. (Hu *et al*, 1998) Les mécanismes de la régulation de BCL-X_L sont très proches de ceux décrits pour Bcl-2 et Mcl-1. De manière intéressante, Bcl-X_L est la protéine clé de la survie des plaquettes. (Mason *et al*, 2007) Cette dépendance aura une implication forte sur la toxicité hématologique des BH3 mimétiques ciblant Bcl-X_L, comme il le sera décrit ci dessous.

5) Bcl-w

Bcl-w, ou encore BCL2L2, possède tous les domaines d'homologie avec les membres de la famille de Bcl-2 ainsi qu'un domaine TM en C-terminal. Bcl-w interagit et séquestre les membres pro-apoptotiques suivants : Bim, Bax et Bak. (Holmgren *et al*, 1999)

6) Bfl-1

Bfl-1 (ou BCL2A1) est localisé sur le chromosome 15. BFL-1 comprend 4 domaines BH mais son domaine transmembranaire forme une hélice α 9 qui lui confère une double conformation tridimensionnelle. (Choi *et al*, 1995) Ainsi, lorsque l'hélice α 9 est présente dans la poche hydrophobe, la molécule est rigidifiée et l'accès aux domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques est limité. Bfl-1 exerce son rôle anti-apoptotique en séquestrant les membres pro-

apoptotiques de la famille Bcl-2. Cependant, dans un contexte de cellules humaines, Bfl-1 se lie à Bak, Bim et Bid, mais non à Bax. (Certo *et al*, 2006; Simmons *et al*, 2008) En physiologie, BFL-1 est principalement exprimé dans le système hématopoïétique et favorise la survie de certains leucocytes (lymphocytes, macrophages) et joue un rôle important lors de l'inflammation. (Vogler, 2012) Par contre, BFL-1 n'est pas exprimé par les plasmocytes. (Tarte *et al*, 2004) L'expression de BFL-1 est fortement régulée par les voies CD40 et NF-κB. (Zong *et al*, 1999; Lee *et al*, 1999)

D) Les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3

Les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 (ou *BH3-only*) sont classées, d'un point de vue fonctionnel, en protéines activatrices sensibilisatrices.

1) Les *BH3-only* activatrices

Les BH3-only Bim et Bid sont dites activatrices car ont la capacité d'activer directement Bax et Bak. (Letai *et al*, 2002)

a) Bim

Le gène Bim (*BCL-2 Interacting Mediator of cell death* ou BCL2L11) se situe sur le chromosome 2. Par un mécanisme d'épissage alternatif, ce gène conduit à la formation de 3 protéines différentes ; Bim_{EL} (196 aa), Bim_L (140 aa) et Bim_S (110 aa). (O'Connor *et al*, 1998) Ces trois isoformes comprennent le domaine BH3 et le domaine TM permettant l'insertion membranaire. L'analyse par immuno-histochimie a révélé que les isoformes Bim_{EL} et Bim_L sont exprimés par la plupart des tissus et des lignées cellulaires, tandis que l'expression de Bim_S est beaucoup plus restreinte, possiblement en raison de son fort pouvoir pro-apoptotique. (O'Reilly *et al*, 2000) Bim est un acteur clé de l'homéostasie lymphoïde, notamment de l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs. (Bouillet *et al*, 1999, 2002)

b) Bid

Le gène Bid (*BH3-Interacting Domain death agonist*) se situe sur le chromosome 22. D'un point de vue structurel, Bid est proche de Bax et Bak. (Chou *et al*, 1999) La fonction pro-apoptotique de BID est principalement assurée par la forme tronquée de la protéine, tBid (*truncated Bid*). En effet, l'activation de la caspase 8 via la voie extrinsèque de l'apoptose conduit au clivage de Bid en tBid, qui est transloqué à la MME où il conduit à l'activation de Bax et Bak. (Li *et al*, 1998; Luo *et al*, 1998)

2) Les BH3-only sensibilisatrices

Les *BH3-only* sensibilisatrices ne peuvent pas directement activer Bax et Bak. Par contre, elles se lient, *via* leur domaine BH3, à la poche hydrophobique des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. (Certo *et al*, 2006; Kuwana *et al*, 2005; Letai *et al*, 2002; Kim *et al*, 2006). De cette manière, elles antagonisent la fonction de ces protéines en dissociant les *BH3-only* activatrices et/ou en empêchant les *BH3-only* libres de se fixer sur les protéines anti-apoptotiques. De manière importante, l'affinité des différentes *BH3-only* sensibilisatrices pour les protéines anti-apoptotiques est très variable. Ainsi, chaque protéine anti-apoptotique interagit avec seulement certaines *BH3-only*. (Certo *et al*, 2006; Kuwana *et al*, 2005; Chen *et al*, 2005). Le tableau 3 résume les affinités des différentes *BH3-only* pour les protéines anti-apoptotiques. (Certo *et al*, 2006) Les valeurs indiquées sont les constantes de dissociation (avec écart-type). L'absence de valeur signifie une $K_d > 2500$ nM.

Tableau 3: Affinités des BH3-only pour les protéines anti-apoptotiques

Protéines anti-apoptotiques	BH3-only							
	Activatrices		Sensibilisatrices					
	BID	BIM	BAD	HRK	NOXA	PUMA	BIK	BMF
BCL-2	66 (6)	<10	11 (3)	-	-	18 (1)	151 (2)	24 (1)
BCL-X _L	12 (9)	<10	<10	92 (11)	-	<10	10 (2)	<10
BCL-w	<10	38 (7)	60 (19)	-	-	25 (12)	17 (12)	11 (3)
MCL-1	<10	<10	-	-	19 (2)	<10	109 (33)	23 (2)
BFL-1	33 (3)	73 (3)	-	-	-	59 (11)	-	-

(Vert : $K_d < 100$ nM, orange : $100\text{nM} < K_d < 2500$ nM, rouge : >2500 nM)

d'après Certo et al, 2006

Ainsi, Hrk se lie spécifiquement à Bcl-X_L, tandis que Noxa se lie spécifiquement à Mcl-1. Bad se lie avec affinité avec Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-w. Comme il le sera décrit ce dessous, ce profil d'affinités spécifiques est utilisé par la technique du *BH3 profiling* pour déterminer de quelles protéines anti-apoptotiques dépend la survie de la cellule.

a) Bad

BAD (*BCL-2-associated Agonist of cell Death*) est localisé sur le chromosome 11. La protéine Bad antagonise les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-w en se fixant avec affinité, par son domaine BH3, au niveau de leur fente hydrophobique. Les souris BAD^{-/-} ont un phénotype normal mais développent avec l'âge un lymphome B à grandes cellules. (Ranger *et al*, 2003) A noter également que les souris BAD ^{-/-} présentent une thrombocytose vraisemblablement liée au défaut d'inhibition de BCL-X_L. (Kelly *et al*, 2010) En réponse à une stimulation par l'Il-3, Bad est phosphorylé par AKT ce qui conduit à sa séquestration par la protéine 14-3-3. (del Peso *et al*, 1997)

b) Hrk

Le gène HRK (*Harakiri*) est localisé sur le chromosome 12. Hrk se lie et inhibe spécifiquement Bcl-X_L. Il est principalement exprimé par les cellules du système nerveux central et périphérique, et par les cellules hématopoïétiques. (Coultas *et al*, 2007) Cependant Hrk n'est pas indispensable à la survie des cellules hématopoïétiques.

c) Puma

Le gène PUMA (*P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*) est localisé sur le chromosome 19. Puma se lie avec affinité avec toutes les protéines anti-apoptotiques et son effet pro-apoptotique est donc majeur. (Yu & Zhang, 2003) PUMA est une cible transcriptionnelle importante de P53. (Nakano & Vousden, 2001) Ainsi, les lymphocytes PUMA ^{-/-} sont fortement résistants aux dommages à l'ADN, chimio ou radio-induits. (Jeffers *et al*, 2003) L'expression de Puma est également induite par le facteur de transcription E2F1.

(Hershko & Ginsberg, 2004) Certaines données plaident pour classer Puma parmi les *BH3-only* activatrices. En effet, plusieurs travaux menés avec la protéine entière (et non uniquement avec le domaine BH3) ont montré que Puma pouvait se lier directement à Bax et Bak. (Cartron *et al*, 2004; Kim *et al*, 2006)

d) Noxa

Le gène NOXA (ou PMAIP1) (Noxa signifie « menace » en latin) est localisé sur le chromosome 18. Noxa se lie spécifiquement à la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Comme Puma, Noxa est une cible transcriptionnelle de P53, et est donc un médiateur de l'apoptose P53 dépendante, (Oda *et al*, 2000) ainsi que du facteur de transcription E2F1. (Hershko & Ginsberg, 2004) L'expression de Noxa est également induite par HIF1- α . (Kim *et al*, 2004)

e) Bik

Bik (*BCL-2 Interacting Killer*) est la première BH3-only à avoir été identifiée. (Boyd *et al*, 1995) Son gène est localisé sur le chromosome 22. Alors que Bik est exprimée par la majorité des tissus, les souris BIK $-/-$ ne présentent pas d'anomalies phénotypiques significatives. (Coultas *et al*, 2004) L'expression de Bik est également régulée par P53 et E2F1. (Chinnadurai *et al*, 2008)

f) Bmf

Le gène BMF (*BCL-2 Modifying Factor*) est localisé sur le chromosome 15. Bmf est régulé négativement par séquestration dans le cytosquelette, par liaison au complexe actine-myosine. (Puthalakath *et al*, 2001) Bmf est également régulée par phosphorylation par JNK. (Lei & Davis, 2003) Les souris bmf $-/-$ développent une hyperplasie lymphoïde B, montrant que BMF régule l'homéostasie lymphocytaire B. (Labi *et al*, 2008)

E) Le BH3 profiling

Le *BH3 profiling* est un test fonctionnel permettant de mesurer l'effet d'une quantité donnée de peptide dérivé du domaine BH3 des protéines de la famille Bcl-2 sur la

perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, point de non retour de l'induction d'apoptose. Cette technique permet de déterminer (1) la proximité des cellules étudiées du seuil apoptotique (ou priming mitochondrial) et (2) de quelles protéines anti-apoptotiques dépendent la cellule.

1) Description de la technique

La base de la technique est d'exposer les mitochondries à une quantité donnée de peptides BH3 et de mesurer ensuite la perméabilisation de la MME qui en résulte. La technique a initialement été développée sur des mitochondries préalablement isolées. (Certo *et al*, 2006) Cependant, cette technique nécessite une quantité importante de cellules (10^7 à 10^9). Ainsi, pour des questions évidentes de faisabilité, le *BH3 profiling* est actuellement réalisé sur cellules entières. (Ryan & Letai, 2013)

Les cellules d'intérêt (lignées tumorales ou cellules primaires) sont perméabilisées avec de la digitonine et incubées pendant 45 à 90 minutes avec une quantité donnée de peptide BH3. Ces peptides ont une séquence déterminée reproduisant la partie du domaine BH3 des protéines *BH3-only* impliquée dans la liaison à la poche hydrophobique des protéines anti-apoptotiques (Tableau 4).

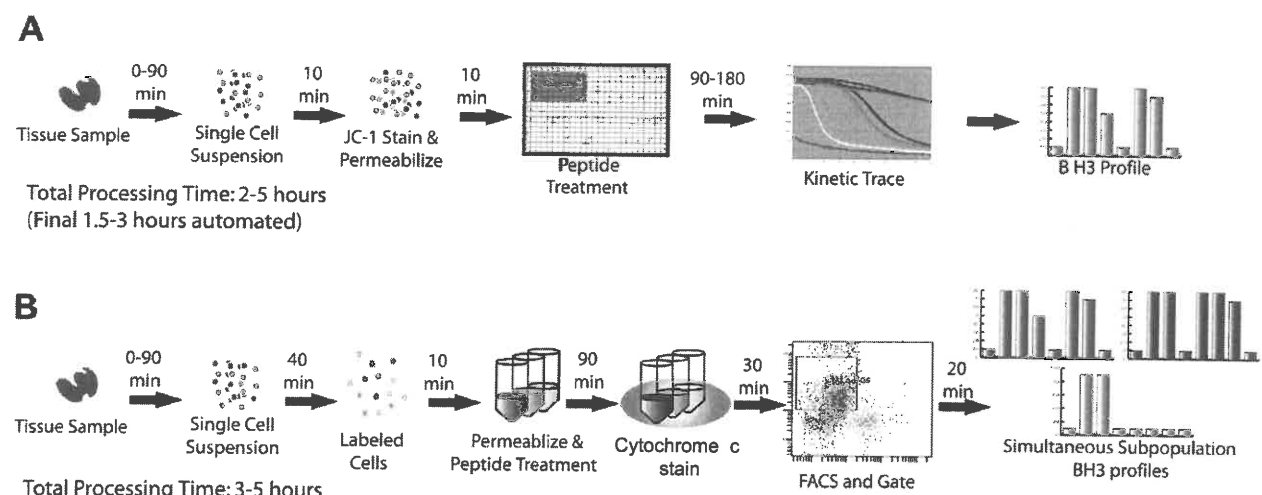
Tableau 4 : Séquences des peptides BH3 et effets attendus

Peptide	Séquence	Classification	Effet attendu
BIM	MRPEIWIAQELRRIGDEFNA	Activateur	Dépolarisation rapide quand BAX/BAK présents/fonctionnels
BID-Y	EDIIRNIARHLAQVGDSMDRY		
PUMA	EQWAREIGAQLRRMADDLNA	Sensibilisateur	Dépolarise les cellules primées.
BMF-Y	HQAEVQIARKLQLIADQFHR		Pan sensibilisateurs
BAD	LWAAQRYGRELRMSDEFEGSFKGL		Dépolarise les cellules BCL-2, BCL-X _L et BCL-w dépendantes
NOXA	AELPPEFAAQLRKIGDKVYC		Dépolarise les cellules MCL-1 dépendantes
MS1	RPEIWMQTGLRRLGDENA		
W-HRK	WSSAAQLTAARLKALGDELHQ		Dépolarise les cellules BCL-X _L dépendantes
PUMA2A	EQWAREIGAQARRMAADLNA	Contrôle	Peptide mutant- Pas de dépolarisation

d'après (Ryan & Letai, 2013) et (Foight *et al*, 2014)

La perméabilisation de la MME résultante de l'exposition aux peptides peut être mesurée par deux techniques. La première est la mesure de la fluorescence émise par la sonde JC-1, sonde ayant la propriété d'émettre en vert lorsqu'elle est contenue dans les mitochondries intactes, et en rouge lorsque la MME est perméabilisée. L'autre moyen de mesurer la perméabilisation de la MME est d'effectuer un marquage au cytochrome c après l'exposition aux peptides et de mesurer le signal en cytométrie en flux. Les cellules dont les mitochondries ont été perméabilisées apparaîtront cytochrome c négatives, tandis que les cellules aux mitochondries intactes apparaîtront positives. (Figure 13)

Figure 13: Schéma de la technique de BH3 profiling



A : Technique par lecture de fluorescence. B : Technique par lecture en cytométrie de flux.

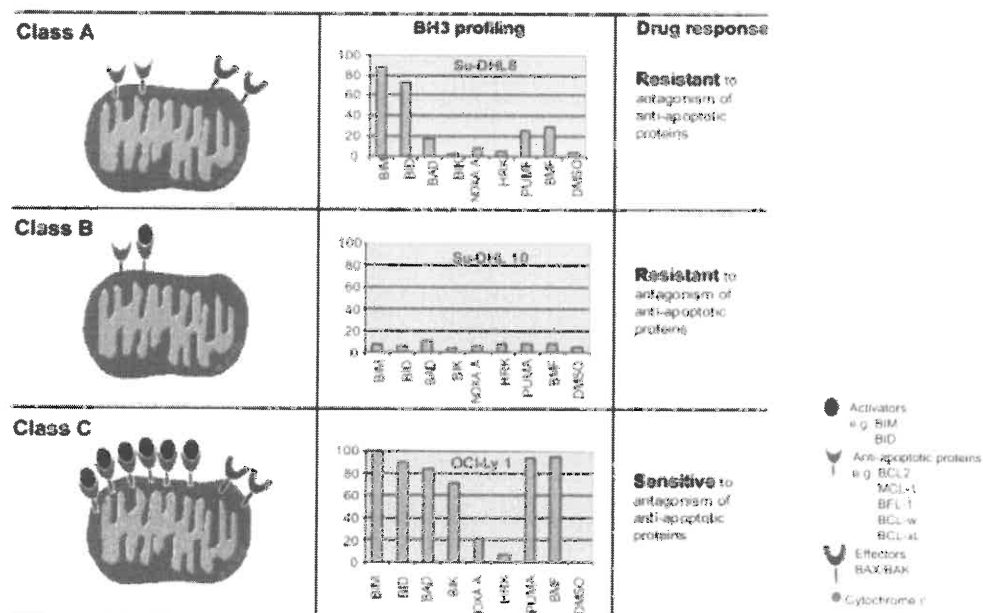
Issu de (Ryan & Letai, 2013)

2) Différents types de blocages dans le processus d'apoptose des cellules tumorales

Les cellules tumorales développent au cours de leur évolution l'aptitude de survivre à différents stress (anomalies génétiques, métaboliques, thérapies anti-néoplasiques), témoignant de blocages dans le processus normal d'apoptose. L'analyse par *BH3 profiling* d'un panel de lignées de lymphome à grandes cellules B a permis de caractériser trois types de blocages du processus d'apoptose dans les cellules tumorales. (Deng *et al*, 2007) Le premier blocage (classe A) est le défaut de *BH3-only* activatrices. Le deuxième type de blocage (classe B) est l'absence des activateurs Bax et Bak. Le troisième type de blocage (classe C), le plus fréquemment

retrouvé, est représenté par la surexpression des protéines anti-apoptotiques, séquestrant les BH3-only activatrices. De manière intéressante en terme d'implication thérapeutique, ce bloc peut-être contourné par l'utilisation de molécules BH3 mimétiques neutralisant les protéines anti-apoptotiques. Ces 3 différents blocages apoptotiques sont schématisés au niveau de la Figure 14.

Figure 14: Différents blocages de l'apoptose précisés par le BH3 profiling



issu de (Deng et al, 2007)

3) *Priming* mitochondrial ou proximité du seuil apoptotique

L'analyse par *BH3 profiling* de cellules normales ou tumorales permet de déterminer la proximité mitochondriale du seuil apoptotique. En effet, certaines cellules proches du seuil apoptotique (*primed for death*), perméabilisent leur MME avec de faibles doses de peptides, en comparaison avec des cellules éloignées du seuil apoptotique (*unprimed*), qui nécessiteront de plus fortes doses de peptides pour perméabiliser la MME.

Il est démontré que le *priming* mitochondrial, déterminé par *BH3 profiling*, conditionne la chimio-sensibilité des cellules tumorales et constitue un facteur pronostique important de la réponse au traitement et de la survie des patients. Cette forte implication pronostique du *priming* mitochondrial a été démontrée aussi bien pour des tumeurs solides que pour des

hémopathies malignes, notamment le myélome multiple et la leucémie aigue myéloïde. (Ni Chonghaile *et al*, 2011; Vo *et al*, 2012)

4) Dépendance spécifique aux différentes protéines anti-apoptotiques

De par la possibilité d'utiliser des peptides BH3 se liant spécifiquement à certains membres de la famille BCL-2, le *BH3 profiling* permet de mesurer la dépendance des cellules tumorales à ces protéines anti-apoptotiques. Ainsi, des cellules tumorales déclenchant la perméabilisation de la MME après exposition au peptide Bad, mais pas après exposition aux peptides Hrk et Noxa, seront identifiées comme Bcl-2 dépendantes. A l'inverse des cellules tumorales déclenchant la perméabilisation de la MME uniquement après exposition au peptide Noxa (ou MS1) seront identifiées comme Mcl-1 dépendantes.

Comme il le sera décrit, la détermination de la Bcl-2 dépendance a une implication thérapeutique importante car prédit la réponse aux molécules BH3 mimétiques ciblant Bcl-2. (Deng *et al*, 2007; Pan *et al*, 2014)

III- BH3 MIMETIQUES : MOLECULES CIBLANT Bcl-2

A) Cibler Bcl-2 : neutraliser la fonction versus inhiber l'expression

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont des acteurs majeurs de la régulation de l'apoptose et sont surexprimées par la plupart des cellules tumorales, contribuant à leur initiation, à leur progression et à la résistance aux traitements. (Kirkin *et al*, 2004) Ainsi, ces protéines, notamment Bcl-2, constituent des cibles thérapeutiques prometteuses. La première stratégie thérapeutique ciblant Bcl-2 utilisée fut basée sur une molécule d'ADN antisens complémentaire de Bcl-2, l'oblimersen, conduisant à l'extinction de son expression. (Jansen *et al*, 1998) Cependant, beaucoup d'essais cliniques ayant testé cette molécule n'ont pas atteint les objectifs de réponse attendus. (Tolcher *et al*, 2005; Chanan-Khan *et al*, 2009; Pro

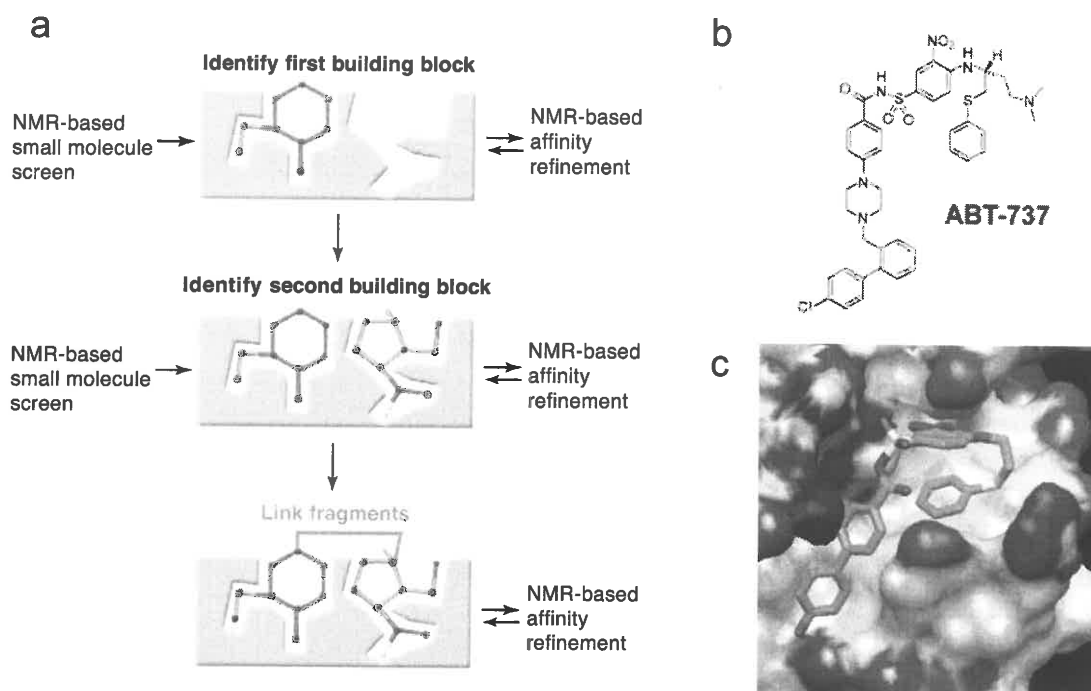
et al, 2008; Marcucci *et al*, 2005; O'Brien *et al*, 2005) Seul un essai clinique de phase 3 a retrouvé un bénéfice de survie lié à l'addition de l'oblimersen à une chimiothérapie par fludarabine et cyclophosphamide, chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, maladie majoritairement Bcl-2 dépendante. (O'Brien *et al*, 2009b) Cette déception soulève néanmoins une question importante relative au mode d'action de cette molécule : la réduction du niveau d'expression de Bcl-2 est elle équivalente à la neutralisation de la fonction de cette protéine ? En effet, il a été montré que la réduction de l'expression de Bcl-2 entraîne l'induction de l'expression d'autres protéines anti-apoptotiques, neutralisant l'effet thérapeutique attendu. (Konopleva *et al*, 2000) De plus, il est difficile de connaître le niveau de réduction de Bcl-2 obtenu *in vivo* au cours d'un traitement par antisens anti Bcl-2. Une autre approche ciblant Bcl-2 a été développée, basée sur la neutralisation de sa fonction de séquestration des *BH3-only* pro-apoptotiques par de petites molécules, appelées BH3 mimétiques.

B) ABT-737 et ABT-263

a) Structure et efficacité pré-clinique

En utilisant une technique de screening par résonance magnétique nucléaire basée sur la relation structure/activité (« *SAR by NMR* ») (Figure 15a), les laboratoires Abbott ont identifié et généré une petite molécule, l'ABT-737 (Figure 15b), sélectionnée sur sa capacité à se lier à avec une forte affinité à la fente hydrophobique de Bcl-X_L (Figure 15c) (Oltersdorf *et al*, 2005)

Figure 15: Structure de l'ABT-737

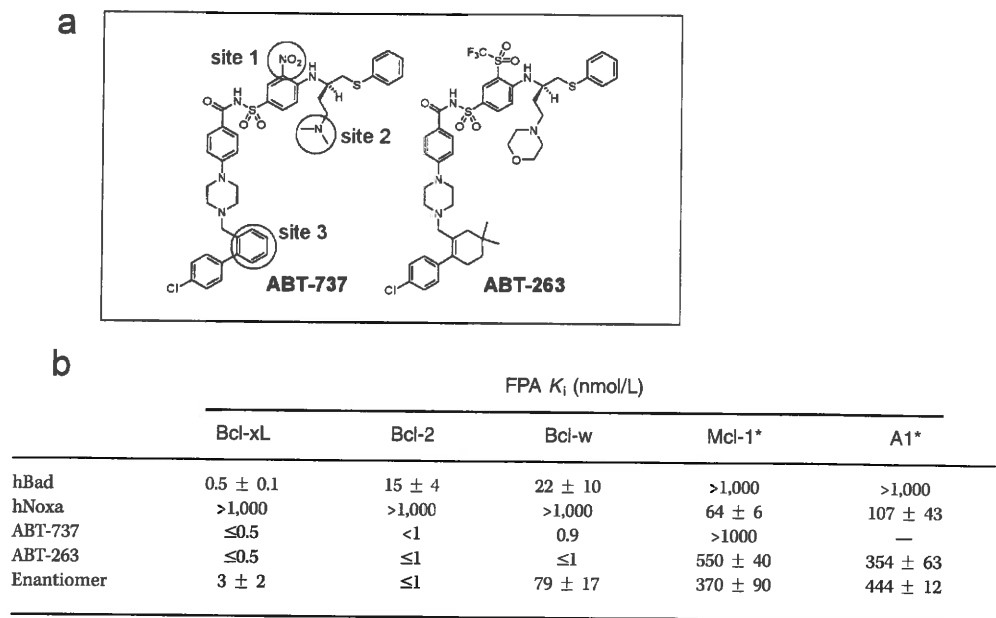


issu de (Letai, 2005) (Fig.15a) et (Oltersdorf *et al*, 2005) (Fig.15b et 15c)

L'ABT-737 se lie avec très forte affinité (constante d'inhibition (K_i) < 1nM) à la fente hydrophobique des protéines Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-w. A l'inverse, l'affinité de l'ABT-737 pour les protéines Mcl-1 et Bfl-1 est très faible (K_i > 1 μ M). Ainsi, l'ABT-737 reproduit le profil d'affinité de la protéine BH3-only BAD. L'ABT-737 induit l'apoptose de cellules tumorales de LLC et de lymphome folliculaire à très faible concentration (Dose létale (DL)₅₀ <10 nM) mais également, à plus forte concentration de tumeurs solides (cancer pulmonaire à petites cellules). (Oltersdorf *et al*, 2005) Cette même étude a confirmé l'effet anti-tumoral de l'ABT-737 *in vivo* dans plusieurs modèles murins de tumeurs solides et hémopathies malignes.

Pour des raisons physicochimiques liées à la structure de la molécule, l'ABT-737 n'est pas bio-disponible par voie orale et sa non-solubilité dans l'eau rend difficile son administration parentérale. Afin de corriger ces propriétés limitant le développement clinique de la molécule, Abbott a développé un BH3 mimétique de 2^e génération appelé ABT-263.. L'ABT-263 est une molécule très proche de l'ABT-737 (Figure 16a) et présente le même profil d'affinité pour les protéines anti-apoptotiques que l'ABT-737, (Figure 16b) cependant sa structure le rend bio-disponible par voie orale. (Tse *et al*, 2008) L'ABT-263 induit l'apoptose via la voie mitochondriale d'un large panel de lignées tumorales solides et hématologiques, *in vitro* et *in vivo*. (Tse *et al*, 2008)

Figure 16: Structure de l'ABT-263

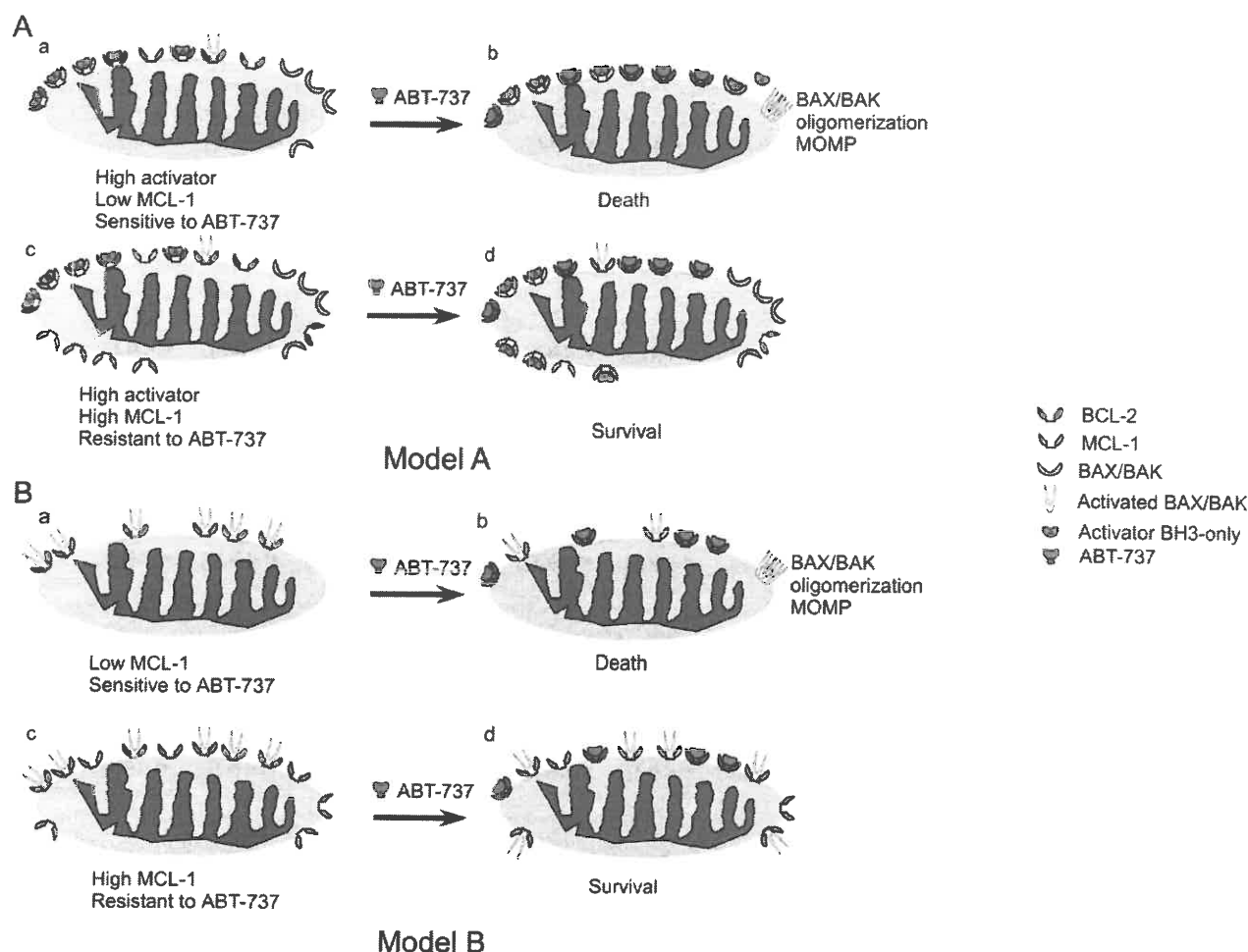


FPA : technique de polarisation de fluorescence (*fluorescence polarization assay*)

issu de (Tse et al, 2008)

Bcl-2 inhibe l'apoptose en séquestrant les BH3-only activatrices (Bim, Bid) (Figure 17, modèle A) et les molécules pro-apoptotiques Bax et Bak (Figure 17, modèle B). L'ABT-737, en se liant avec affinité à la poche hydrophobique de BCL-2, dissocie ces molécules pro-apoptotiques ce qui conduit à l'activation et à la polymérisation de Bax et Bak et à la cascade apoptotique : perméabilisation de la MME, libération de cytochrome c, activation des caspases, mort cellulaire. (Letai, 2006)

Figure 17: Mécanisme d'action de l'ABT-737



issu de (Letai, 2006)

Légende : Modèle A. La cellule tumorale présente une forte quantité de BH3-only activatrices séquestrés par Bcl-2 et un faible niveau de Mcl-1 (a). Dans cette situation, l'ABT-737 induit l'apoptose en dissociant les complexes Bcl-2/BH3-only activant Bax/Bak (b). En cas de forte expression de Mcl-1 (c), les BH3-only activatrices dissociées par l'ABT-737 sont captées par Mcl-1, ce qui empêche le déclenchement de l'apoptose (d). Modèle B. La cellule tumorale présente une forte quantité de complexes Bcl-2/Bax et/ou Bcl-2/Bak et un faible niveau de Mcl-1 (a). Dans cette situation, l'ABT-737 induit l'apoptose en dissociant les complexes Bcl-2/ Bax ou Bcl-2/Bak qui se polymérisent et induise la perméabilisation de la MME (b). En cas de forte expression de Mcl-1 (c), Mcl-1 séquestre les protéines Bax ou Bak dissociées par l'ABT-737, ce qui empêche le déclenchement de l'apoptose (d).

L'ABT-737 a démontré une efficacité anti-tumorale à très faible concentration (DL₅₀ de l'ordre du nanomolaire) pour les cellules tumorales d'hémopathies maligne variées : leucémie lymphoïde chronique (Del Gaizo Moore *et al*, 2007; Certo *et al*, 2006), leucémie aigue lymphoblastique (Del Gaizo Moore *et al*, 2008) et myéloblastique (Konopleva *et al*, 2006), lymphomes malins non hodgkiniens (Deng *et al*, 2007; Vogler *et al*, 2008; Beltran *et al*, 2011),

myélome multiple. (Bodet *et al*, 2011; Morales *et al*, 2011) Les cellules de tumeurs solides sont dans l'ensemble moins sensibles à l'ABT-737 (DL₅₀ de l'ordre du micromolaire). (Tse *et al*, 2008; Shoemaker *et al*, 2008; Oakes *et al*, 2012; Lucas *et al*, 2012) Cependant, il existe une forte hétérogénéité de sensibilité à l'ABT-737/263 au sein d'une même entité tumorale, interrogeant sur les mécanismes de résistance à cette molécule.

b) Facteurs de résistance à l'ABT-737

Les facteurs influençant la sensibilité à l'ABT-737/263 est lié au mode d'action unique et ciblé de cette molécule et fait intervenir les protéines de la famille Bcl-2. L'expression de MCL-1, protéine anti-apoptotique non ciblée par l'ABT-737, est un facteur important lié à la résistance à cette drogue. (van Delft *et al*, 2006; Konopleva *et al*, 2006; Tahir *et al*, 2007; Bodet *et al*, 2011) En effet, l'extinction de l'expression de Mcl-1 sensibilise les cellules à l'ABT-737. Le niveau de complexes Bcl-2/BH3-only pro-apoptotique, dissociés par l'ABT-737, constitue également un bio-marqueur de sensibilité à cette drogue. (Del Gaizo Moore *et al*, 2007; Morales *et al*, 2011)

Il a été démontré que le microenvironnement tumoral ganglionnaire participait à la résistance à l'ABT-737 des cellules de LLC en favorisant l'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-X_L ou Bfl-1. (Tromp *et al*, 2012; Vogler *et al*, 2009a)

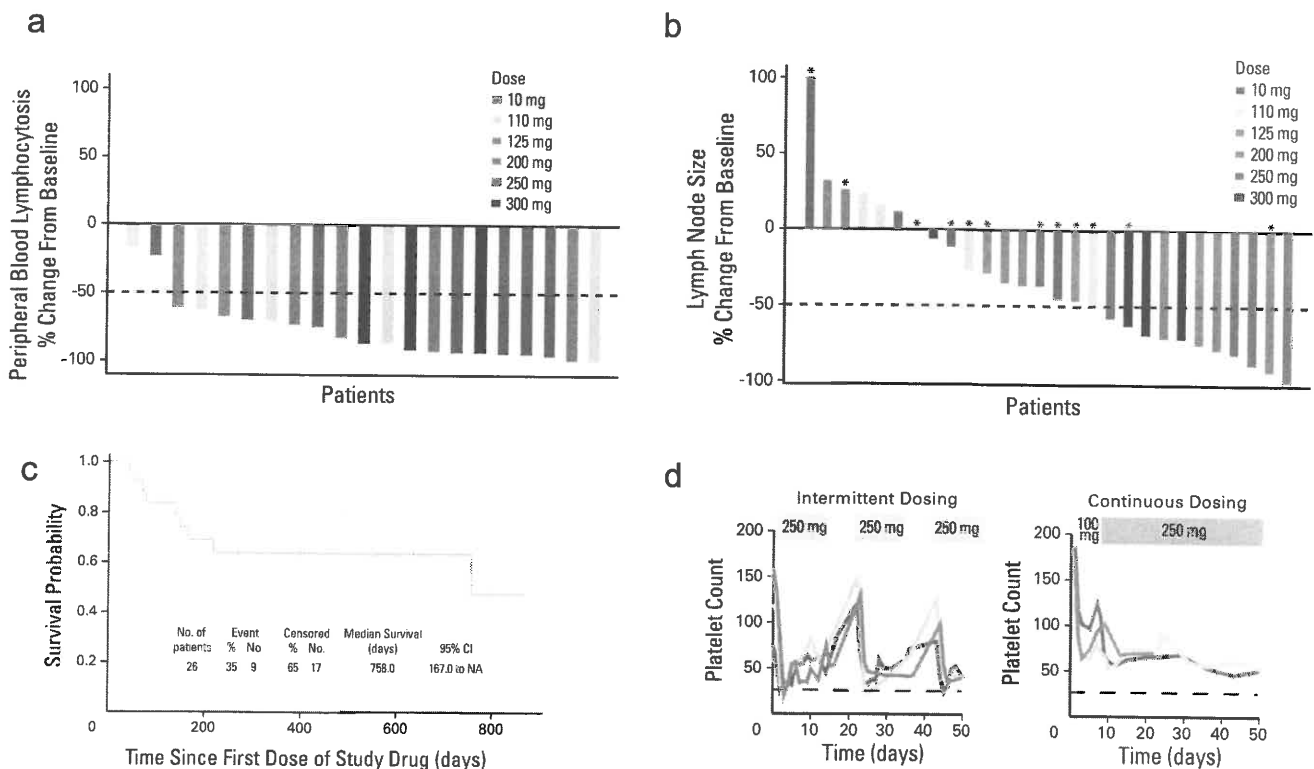
Enfin, il a été montré que l'exposition prolongée à l'ABT-737 induit une surexpression par les cellules tumorales de Mcl-1 et Bfl-1 conduisant à la résistance à cette drogue. (Yecies *et al*, 2010)

c) Développement clinique de l'ABT-263

L'ABT-263 (Navitoclax) a été évalué dans le cadre d'un essai clinique de phase 1 avec escalade de dose chez des patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs (LLC, lymphomes folliculaires, Lymphomes B diffus à grandes cellules B, lymphomes T). (Wilson *et al*, 2010) L'essai révèle un taux de réponse favorable, surtout chez les patients atteints de LLC, mais une thrombopénie et une lymphopénie attribuées respectivement à la neutralisation de Bcl-X_L et Bcl-2. Un autre essai de phase 1 a été mené spécifiquement chez des patients atteints de LLC en rechute (n=29). (Roberts *et al*, 2012) Chez ces patients très évolués (nombre médian de précédentes traitements : 4,5), le taux de réponse (Fig.18a et b) et la durée de réponse (Fig.18c)

sont très favorables. Cependant, il est confirmé dans cet essai une toxicité plaquettaire limitant l'utilisation de l'ABT-263 à la dose anti-tumorale optimale (Figure 18d).

Figure 18: Données d'efficacité et de toxicité de l'ABT-263 chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique



d'après (Roberts et al, 2012)

Légende : a. Evaluation de la réponse basée sur la diminution de la lymphocytose périphérique. b. Evaluation de la réponse basée sur la diminution du volume ganglionnaire. c. Survie sans progression. d. Illustration de la thrombopénie induite par les schémas posologiques intermittent ou continu d'ABT-737.

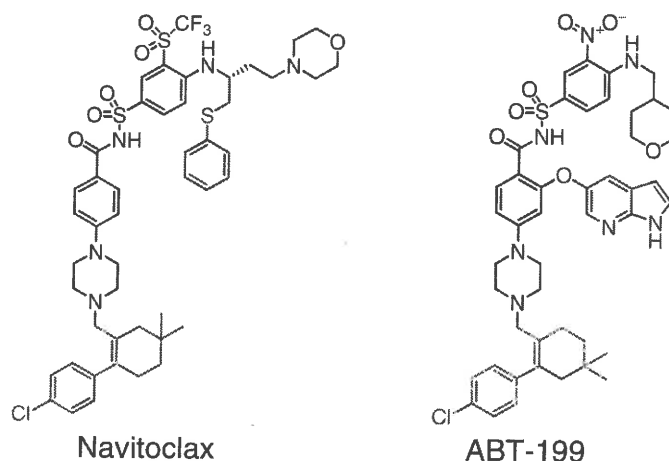
Cette toxicité plaquettaire liée spécifiquement à l'inhibition de BCL-X_L et grevant le développement clinique de l'ABT-263 a conduit au développement d'un BH3 mimétique BCL-2 spécifique, l'ABT-199.

L'ABT-263 a également été évalué chez des patients atteints de tumeurs solides, notamment de cancer pulmonaire à petites cellules. (Gandhi *et al*, 2011; Rudin *et al*, 2012) Ces essais ont révélé une efficacité décevante et la même toxicité plaquettaire limitant l'utilisation à la dose optimale.

C) ABT-199

Afin de s'affranchir de la toxicité plaquettaire liée à l'inhibition de Bcl-X_L, les laboratoires Abbvie (anciennement Abbott) ont développé un BH3 mimétique Bcl-2 spécifique : l'ABT-199. (Souers *et al*, 2013) La structure de l'ABT-199 est très proche de celle de l'ABT-263 et permet également une biodisponibilité orale (Figure 19).

Figure 19: Structure de l'ABT-199



d'après (Souers et al, 2013)

L'ABT-199 se distingue cependant car il se lie avec très forte affinité exclusivement à Bcl-2 (Tableau 5).

Tableau 5: Affinité de l'ABT-199 pour les protéines anti-apoptotiques

	Bcl-2	Bcl-X_L	Mcl-1	Bcl-w
ABT-263	0,044	0,055	> 224	7
ABT-199	< 0,01	48	> 244	245

Les valeurs indiquent les K_i (nM) déterminées par technique de TR-FRET

d'après (Souers et al, 2013)

Dans cette étude princeps, il est confirmé une activité anti-tumorale à très faible concentration sur des lignées de lymphomes malins et des cellules primaires de LLC, sans toxicité plaquettaire significative. (Souers *et al*, 2013)

Le développement clinique de l'ABT-199 est très rapide et a déjà démontré dans le cadre d'essai cliniques de phase I/II des taux de réponses impressionnants en monothérapie chez des patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs chroniques, LLC et lymphomes B de bas grade. (ABT-199 Shows Effectiveness in CLL, 2014; Tam, 2013; Davids, 2013; Davids *et al*, 2012) Dans la LLC, on notera un taux de réponse excellent, notamment chez les patients atteints de délétion du chromosome 17. (Tam, 2013) Chez les patients atteints de lymphomes B, le taux de réponse semble particulièrement impressionnant chez les patients atteints de lymphome à cellules du manteau. (Davids *et al*, 2012) La réponse anti-tumorale est rapide et des cas de syndromes de lyse, parfois graves ont été rapportés.

D) Autres molécules BH3 mimétiques ou apparentées

Les petites molécules ABT-737, ABT-263 et ABT-199 remplissent les critères proposés par Lessene *et al*. (Lessene *et al*, 2008) définissant une drogue BH3 mimétique (Tableau 6)

Tableau 6: Définition d'une molécule BH3 mimétique

Présence de Bax et Bak indispensable à l'action anti-tumorale
Forte affinité pour la/les protéine(s) anti-apoptotique(s) (Ki de l'ordre du nanomolaire)
Cytotoxicité corrélée à l'expression des protéines anti-apoptotiques
L'évaluation <i>in vivo</i> doit révéler une toxicité liée à l'inhibition de la/des protéine(s) anti-apoptotique(s) ciblées : thrombopénie (BCL-XL), lymphopénie (Bcl-2)

D'après (Lessene *et al*, 2008)

Les molécules suivantes ne remplissent pas l'ensemble de ces critères mais sont néanmoins souvent rapportées dans la littérature comme molécules BH3 mimétiques.

1) GX15-070 ou Obatoclax

Le GX15-070 (ou obatoclax) est un dérivé synthétique d'un composé naturel progidiosin se liant aux cinq protéines anti-apoptotiques, mais avec une faible affinité (de l'ordre du micromolaire.(Nguyen *et al*, 2007) De plus, l'obatoclax également les cellules

déficientes en Bax et Bak que les cellules sauvages. (Vogler *et al*, 2009b) L'action anti-tumorale de l'obatoclax semble faire intervenir l'autophagie et le stress du reticulum, et une induction d'apoptose via l'induction de Noxa. (Albershardt *et al*, 2011; Nguyen *et al*, 2007) Sur le plan clinique, l'efficacité de l'obatoclax en monothérapie s'est avérée décevante. (O'Brien *et al*, 2009a; Paik *et al*, 2011)

2) Gossypol et AT-101

Le gossypol est un aldéhyde polyphénolique dérivé de la plante du coton, et utilisé depuis plusieurs dizaines d'années pour des propriétés thérapeutiques variées. (Dodou *et al*, 2005) Ses propriétés « BH3 mimétiques » ont été découvertes plus récemment. Le gossypol se lie également avec une faible affinité (K_i de l'ordre du micromolaire) avec Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1. (Kitada *et al*, 2003) Son énantiomère, l'AT-101 offre de meilleures propriétés pro-apoptotiques et a fait l'objet de plusieurs essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides, mais avec une efficacité très modeste. (Heist *et al*, 2010; Liu *et al*, 2009)

3) S1

La molécule S1 a également été rapportée comme étant BH3 mimétique pan Bcl-2, bien que se liant avec faible affinité avec les protéines Bcl-2 et Mcl-1. (Zhang *et al*, 2011) Il a également été montré, à l'instar de l'obatoclax, que S1 induisait l'apoptose via l'induction de Noxa. (Albershardt *et al*, 2011)

4) Marinopyrrole A ou maritoclax

Le maritoclax, dérivé d'une espèce de streptomycètes marins, a été démontré comme se liant spécifiquement à MCL-1, et dissociant les complexes Bim/Mcl-1. (Doi *et al*, 2012) Son action anti-tumorale a été testée sur des lignées de leucémies ou lymphomes Mcl-1 dépendantes. (Eichhorn *et al*, 2013) Enfin, il a récemment été montré que le maritoclax inhibait Mcl-1 en induisant sa dégradation par le protéasome, (Pandey *et al*, 2013) ce qui est un mécanisme pro-apoptotique distinct de celui d'une molécule BH3 mimétique.

5) WEHI-539

De manière intéressante, il a récemment été identifié par screening moléculaire à haut débit un authentique BH3 mimétique Bcl-X_L spécifique : WEHI-539. (Lessene *et al*, 2013) En effet, WEHI-539 se lie avec une forte affinité (nanomolaire) à Bcl-X_L, n'induit pas la mort de cellules déficientes en BAX/BAK, et induit l'apoptose des plaquettes. Bien que les implications thérapeutiques d'un tel BH3 mimétique soit limitées (en dehors éventuellement de thrombocytoses), WEHI-539 peut-être utilisé comme un outil pour étudier spécifique Bcl-X_L.

IV- LE MYELOME MULTIPLE ET LE LYMPHOME A CELLULES DU MANTEAU

A) Le myélome multiple

Le myélome multiple (MM) se définit par la prolifération clonale de plasmocytes au niveau de la moelle osseuse. Le MM représente 1% des cancers et 10% des hémopathies malignes. L'incidence de la maladie est d'environ 5 cas pour 100 000 habitants / an en Europe. L'incidence de la maladie augmente nettement avec le vieillissement et l'âge médian au diagnostic de 70 ans. (Moreau *et al*, 2013) En dépit de progrès considérable dans la compréhension de la biologie du myélome et dans le traitement, le MM reste une maladie incurable. (Kumar *et al*, 2014)

1) Oncogenèse

a) Le plasmocyte : étape ultime de la différenciation lymphoïde B

Le plasmocyte correspond à la forme la plus mature et la plus différenciée de la cellule lymphoïde B. Les plasmocytes normaux sont le pilier de l'immunité humorale en assurant la fonction de sécrétion des immunoglobulines.

Après le réarrangement VDJ des gènes codant pour les immunoglobulines lui conférant un BCR fonctionnel, la cellule B naïve quitte la moelle osseuse. Après rencontre avec l'antigène, la cellule B activée gagne le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires. A ce niveau, les cellules ayant un BCR reconnaissant avec affinité l'antigène présenté par le CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigènes, en présence de signaux de co-stimulation, dont la liaison CD40/CD40 ligand, sont engagés dans le processus de différenciation. La différenciation plasmocytaire peut également être initiée par l'activation des récepteurs de l'immunité innée (*Toll-Like Receptors*, TLR). La cellule B activée gagne ensuite la zone sombre des follicules lymphoïdes et subit prolifération et maturation. A ce niveau, les cellules B subissent le phénomène d'hypermutations somatiques (HMS), sous le contrôle de l'enzyme AID (*activation induced deaminase*), pour favoriser la diversité du répertoire. Le phénomène de commutation isotypique (CI) survient également, aboutissant à l'expression des immunoglobulines G, A D ou E. Les cellules vont ensuite se différencier en plasmablastes (plasmocytes immatures), ou en cellules B mémoires. Les plasmablastes vont poursuivre leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et migrent dans la moelle osseuse. (Boyle *et al*, 2014)

Ce processus de différenciation est sous le contrôle de différents facteurs de transcription. Ainsi, l'expression de BLIMP-1 (*B Lymphocyte Induced Maturation Protein-1*), IRF-4 (*Interferon Regulatory Factor-4*) et XBP-1 (*x box binding protein-1*) est essentielle à ce processus. (Nutt *et al*, 2011) Ce phénomène s'accompagne également de la diminution de l'expression de pax5 (*paired box gene 5*) et de BCL-6.

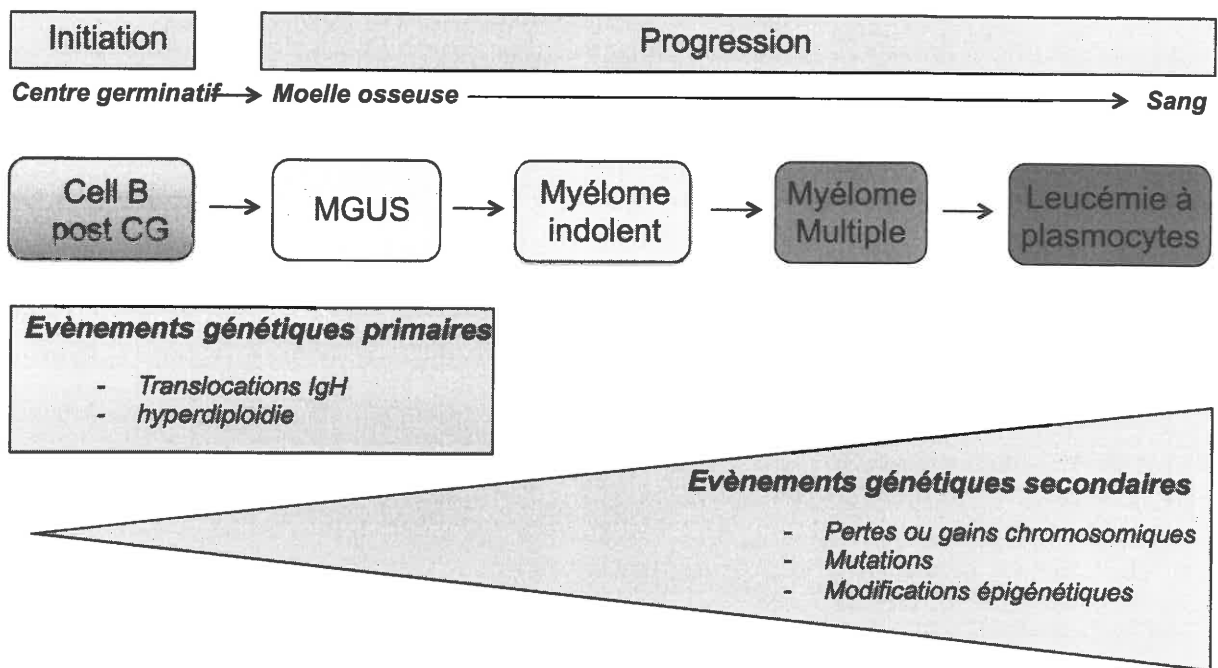
De manière intéressante, il a été démontré que la survie des plasmocytes matures est fortement dépendante de la protéine anti-apoptotique MCL-1. (Peperzak *et al*, 2013) À l'inverse, les cellules B mémoires et les plasmocytes migrant vers la moelle osseuse ont été montré BCL-2/BCL-XL dépendants, et donc sensibles à l'ABT-737. (Carrington *et al*, 2010)

L'équivalent normal du plasmocyte tumoral est le plasmablaste post centre germinatif à longue durée de vie. Ceci est notamment supporté par la présence d'hypermutations somatiques du gène des immunoglobulines au niveau des cellules de MM. (Bakkus *et al*, 1992) La survenue d'erreurs durant le processus de différenciation plasmocytaire va constituer les évènements oncogéniques aboutissant à l'initiation de la cellule myélomateuse.

b) Évènements oncogéniques primaires

L'oncogenèse du myélome multiple est un processus multi-étapes. Il est démontré maintenant que le myélome multiple est constamment précédé de phases asymptomatiques de la maladie, gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ou myélome indolent (SMM). Enfin, le myélome évolue classiquement à terme vers une forme plus agressive, où les cellules deviennent indépendantes et quittent l'environnement médullaire (leucémie à plasmocytes). (Morgan *et al*, 2012) Cette oncogenèse multi-étape, schématisée dans la figure 20, est sous-tendue par des événements oncogéniques primaires, initiant le passage cellule saine/cellule tumorale, puis par des événements oncogéniques secondaires, apportant au plasmocyte tumoral les avantages sélectifs nécessaires à sa survie.

Figure 20: Initiation et progression du myélome multiple



d'après (Morgan et al, 2012)

Ainsi, certains événements oncogéniques, dits primaires, sont retrouvés dès le stade de MGUS et participent à l'initiation de la cellule myélomateuse : (i) les translocations chromosomiques impliquant le gène des immunoglobulines, et (ii) l'hyperdiploïdie.

(i) *Translocations chromosomiques impliquant le gène des immunoglobulines*

Une translocation chromosomique impliquant le gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH), localisé en 14q32 est retrouvée chez près d'un malade sur deux. Ces translocations semblent provenir d'erreurs lors des processus à haut- risque d'erreur génétique que constituent l'HMS et la CI. (Bergsagel & Kuehl, 2001)

Ces translocations, résumées dans le Tableau 7, juxtaposent le gène IgH et trois grands groupes d'oncogènes ainsi surexprimés : cycline D (CCND1 en 11q13 ; CCND2 en 12p13 ; CCND3 en 6p25), MAF (c-MAF en 16q23 ; MAFA en 8q24; MAFB en 20q12) et MMSET/FGFR3 (4p16). (Bergsagel & Kuehl, 2001)

L'hyperexpression des cyclin D conduit à la dérégulation de la transition G1/S du cycle cellulaire. La translocation t(4 ;14) conduit à la surexpression de deux oncogènes, MMSET (*Multiple Myeloma SET*) et FGFR3 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3*). Si MMSET est constamment retrouvé surexprimé en cas de t(4 ;14), FGFR3 n'est retrouvé surexprimé que dans les deux tiers des cas. MMSET a une activité méthyltransférase induisant une modification de méthylation des histones promouvant la survie cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN. (Brito *et al*, 2009; Pei *et al*, 2011) Enfin, la surexpression de MAF conduit également à promouvoir la prolifération cellulaire (en induisant notamment la cyclin D2). (Hurt *et al*, 2004)

Tableau 7: Translocations récurrentes dans le myélome multiple

Type de partenaire	Translocation	Oncogène	Fréquence
CYCLINE	t(11 ;14)	CCND1	15%
	t(12 ;14)	CCND2	<1%
	t(6 ;14)	CCND3	2%
MAF	t(16 ;14)	c-MAF	5%
	t(8 ;14)	MAF-A	<1%
	t(20 ;14)	MAF-B	2%
MMSET	t(4 ;14)	MMSET/FGFR3	15%

d'après (Bergsagel & Kuehl, 2001)

Dans la forme particulière de myélome multiple que constitue la leucémie à plasmocytes primaire, la fréquence de ces translocations récurrentes est significativement plus

importante (près de 80%) avec notamment une surreprésentation de la t(11 ;14, retrouvée en médiane selon les séries dans 40% des cas. (Fernández de Larrea *et al*, 2013)

(ii) Hyperdiploïdie

L'autre grande classe d'anomalie oncogénique primaire retrouvée dans le myélome multiple est l'hyperdiploïdie, retrouvée chez près de 50% des patients. Elle est définie par un gain de nombre des chromosomes impairs : 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21. Le mécanisme aboutissant à cette hyperdiploïdie est encore inconnu. Une hypothèse empruntée à la leucémie aigue lymphoblastique fait intervenir une catastrophe mitotique avortée. (Onodera *et al*, 1992)

c) Evènements oncogéniques secondaires

La survenue des anomalies primaires que sont les translocations récurrentes ou l'hyperdiploïdie ne suffit pas à expliquer la progression de la cellule myélomateuse à travers les différents stades de la maladie. Ainsi, de nombreux évènements oncogéniques secondaires sont décrits, et résumés dans le tableau suivant.

d) Classification moléculaire du myélome multiple

L'analyse du profil d'expression génique a permis de classer les patients atteints de myélome multiple en sept groupes moléculaires distincts. (Zhan *et al*, 2006)

Parmi ces groupes, quatre sont fortement influencés par la translocation récurrente sous-jacente: *le groupe MS* (forte expression de MMSET +/- FGFR3), *le groupe MF* (forte expression des gènes MAF et MAFB), *les groupes CD1 et CD2* (forte expression des gènes CCND1 ou CCND3, D1 et D2 se distinguant par l'expression de certains gènes, notamment le CD20). Un cinquième *groupe HY*, correspond aux patients avec hyperdiploïdie chromosomique. Enfin, les deux derniers groupes ne correspondent pas à une anomalie oncogénique primaire sous-jacente mais à une signature fonctionnelle d'expression de gène. Le *groupe PR* correspond au groupe de patients sur-exprimant certains gènes du cycle ou de la prolifération. Le *groupe LB* (*low bone disease*) se définit moins par une signature d'expression que par une absence clinique de lésion osseuse chez les patients de ce groupe. Les groupes MF, MS et PR sont associés à un pronostic défavorable.

Tableau 8: Evènements oncogéniques secondaires retrouvés dans le myélome multiple

Mécanisme	Chromosome / gène impliqué	Fréquence
Gains chromosomique	1q (CKS1B, ANP32E)	40%
	12p (LTBR)	-
	17q (NIK)	-
Pertes chromosomiques	1p (CDKN2C, FAF1, FAM46C)	30%
	6q	33%
	8p	25%
	11q (BIRC2, BIRC3)	7%
	13 (RB1, DIS3)	45%
	14q (TRAF3)	38%
	16q (CYLD, WWOX)	35%
	17p (TP53)	8%
Translocations secondaires	t(8 ;14)	-
Evènements épigénétiques	Hypométhylation globale	-
Mutations	NRAS	21%
	KRAS	28%
	BRAF	4%
	MYC	1%
	NFkB activating mutations	-
	PI3K/Akt dysregulation	-

d'après (Morgan et al, 2012)

e) Perturbation de l'apoptose dans le MM

A l'instar de la majorité des cancers, la surexpression des protéines anti-apoptotiques est retrouvée dans le myélome multiple et participe à la progression tumorale et à la résistance au traitement.

Ainsi, il a été montré tant au niveau protéique qu'au niveau ARN que Mcl-1 est surexprimée par les plasmocytes tumoraux en comparaison avec les plasmocytes normaux. (Wuillème-Toumi *et al*, 2005; Munshi *et al*, 2004) Par technique d'ARN interférence, il a été montré que la survie des cellules de myélome était compromise par une extinction de Mcl-1, mais non par une extinction de Bcl-2 ou Bcl-X_L. (Derenne *et al*, 2002) L'expression de Mcl-1

s'accroît avec la progression de la maladie et confère un pronostic défavorable. (Wuillème-Toumi *et al*, 2005) Enfin, l'expression de Mcl-1 est associée à la résistance au bortezomib, une drogue majeure du traitement du myélome. (Podar *et al*, 2008)

Si Mcl-1 tient un rôle majeur dans la pathogénie du MM, il a été montré que certaines lignées tumorales ou échantillons primaires de MM sur-expriment Bcl-2. (Bodet *et al*, 2010) L'expression de Bcl-2 est corrélée à l'expression de la protéine *BH3 only* BIK. Cette dernière induit l'apoptose des cellules de MM en dissociant les complexes Bcl-2/Bim ou Bim/Bcl-X_L. Comme il le sera détaillé dans les parties résultats et discussion, il est démontré que les plasmocytes d'un sous-groupe de patients sont Bcl-2 dépendant, et sensibles à l'ABT-737 ciblant Bcl-2. (Bodet *et al*, 2011; Morales *et al*, 2011)

f) Evolution clonale

La sensibilité actuelle des techniques de séquençage du génome ou de l'exome ont confirmé que le myélome multiple était une maladie très complexe génétiquement. Chaque échantillon de patient présente en moyenne 35 mutations impliquant une modification de séquence d'acides aminés et 21 réarrangements chromosomiques. (Chapman *et al*, 2011)

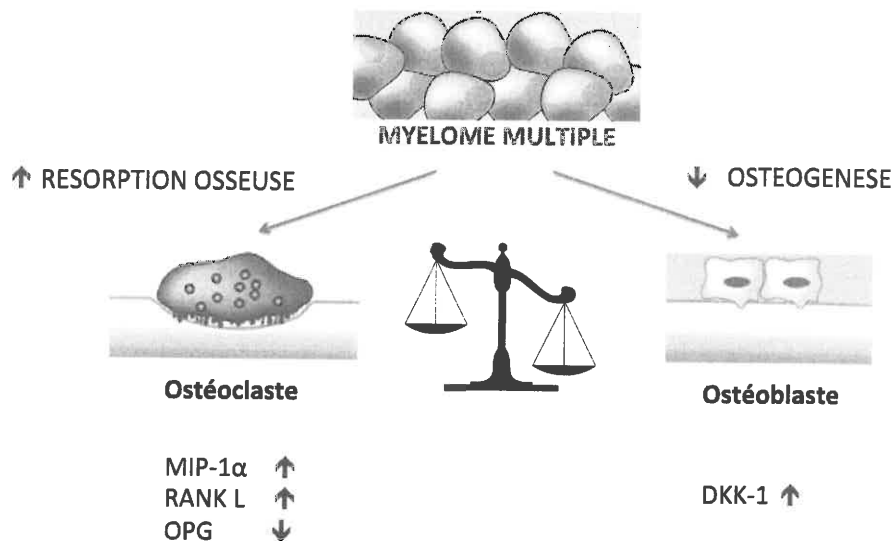
Ces techniques ont également confirmé la coexistence chez un même patient de sous-clones distincts génétiquement. La sélection clonale au cours de la progression de la maladie et des différents traitements s'effectue par embranchements de manière darwinienne, par laquelle le sous-clone le plus adapté à la pression de sélection devient majoritaire. (Egan *et al*, 2012; Keats *et al*, 2012; Magrangeas *et al*, 2013)

g) Interactions avec le microenvironnement

(i) *Destruction osseuse via la rupture de la balance ostéogénèse/ostéolyse.* La lyse osseuse est l'une des caractéristiques cliniques du myélome multiple symptomatique. En physiologie, il existe un équilibre entre l'ostéogénèse (assurée par les ostéoblastes) et la résorption osseuse (assurée par les ostéoclastes). Les ostéoclastes sont notamment activés par leur récepteur RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*) après fixation du RANK ligand. Cette activation est régulée négativement par la protéine ostéoprotégérine qui limite la fixation du RANK ligand sur son récepteur. Chez les patients atteints de myélome, les cellules tumorales induisent une augmentation de la synthèse de RANK ligand et une diminution de la synthèse

d'ostéoprotégérine aboutissant à une augmentation de l'activité ostéoclastique. (Giuliani *et al*, 2001) On note de plus une inhibition de l'activité ostéoblastique via la synthèse de DKK-1 par les plasmocytes. (Oshima *et al*, 2005) Enfin, l'augmentation de synthèse de la cytokine MIP1- α favorise ce déséquilibre et ainsi la lyse osseuse. (Raje & Roodman, 2011)

Figure 21: Rupture de la balance ostéogénèse/ostéolyse dans le myélome



adapté de raje & Roodman, 2011

(ii) *Rôle de support du microenvironnement médullaire.* Les interactions avec les cellules stromales sont essentielles à la survie, à la prolifération et à la résistance aux drogues des plasmocytes tumoraux. Ainsi, les interactions directes entre les molécules d'adhésion des plasmocytes (Syndecan-1 (ou CD138), VLA-4 (*very late antigen 4*)) et le tissu conjonctif ou les cellules stromales (via VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)) activent des voies de signalisation promouvant le cycle cellulaire et la survie tumorale. (Manier *et al*, 2012) Deux facteurs de croissances majeurs des plasmocytes tumoraux sont l'interleukine-6 (Il-6) et l'*Insulin like Growth Factor-1* (IGF-1). L'Il-6 est majoritairement produite par les cellules stromales médullaires et induit notamment l'expression de protéines anti-apoptotiques, dont MCL-1. (Puthier *et al*, 1999b) L'IGF-1, produit à la fois par les cellules stromales et les plasmocytes se lie au récepteur de l'IGF-1 (IGF-1 R) exprimé par les plasmocytes. Cette boucle autocrine et/ou paracrine IGF-1/IGF-1 R est critique pour la survie des cellules myélomateuses. (Sprynski *et al*, 2009) Enfin, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), synthétisé par le microenvironnement, est également une cytokine impliquée dans la survie des plasmocytes tumoraux, via notamment l'expression de Mcl-1. (Le Gouill *et al*, 2004)

2) Aspects diagnostiques

a) Critères diagnostiques

Selon les critères internationaux, le diagnostic de myélome multiple symptomatique est défini par la présence d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10%, d'une sécrétion d'immunoglobuline monotypique et de l'existence d'une atteinte d'organe (CRAB) attribuée à la maladie : hypercalcémie (C), insuffisance rénale (R), anémie (A), lésions osseuses (B). (Dimopoulos *et al*, 2011) L'immunoglobuline monoclonale est détectée par électrophorèse des protéines du serum ou des urines et caractérisée par immuno-fixation. En cas de myélome à chaînes légères, il sera réalisé un dosage des chaînes légères libres sériques. Les stades de MGUS et SMM sont caractérisés par l'absence de signes CRAB. Les critères diagnostiques sont rappelés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Critères diagnostiques des gammopathies monoclonales

	MGUS	Myélome Multiple indolent	Myélome Multiple symptomatique
Composant monoclonal	< 30 g/L ET	≥30 g/L ET / OU	Présent ET
Plasmocytose médullaire	<10%	≥10%	≥10%
Atteinte d'organe = « CRAB »	Absente	Absente	Présente



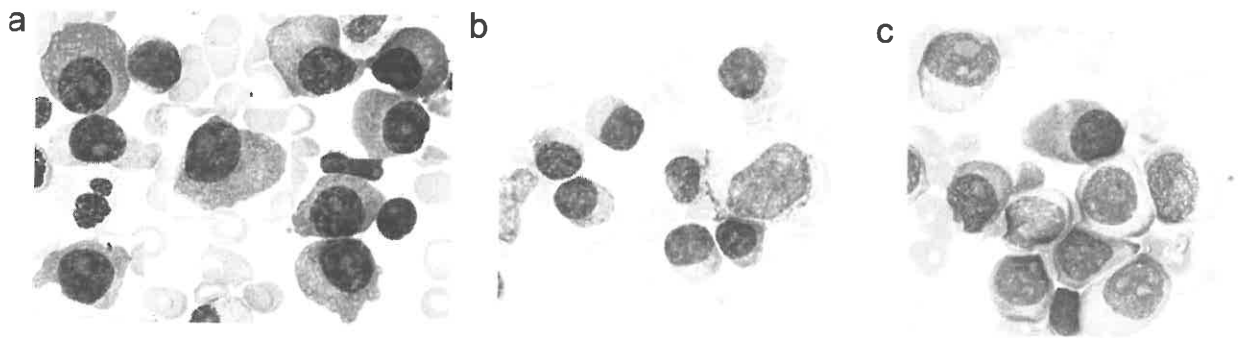
- C** HyperCalcémie: calcémie > 11,5 mg/dL ou 2,65 mmol/L
R Insuffisance Rénale: créatininémie > 2 mg/dL ou > 160 µmol/L
A Anémie: taux d'hémoglobine < 10 g/dL ou >2 g/dL en dessous de la valeur habituelle
B Lésion osseuse (Bone lesion): lyse osseuse, ostéopénie sévère, fracture pathologique

Enfin, l'entité particulière qu'est la leucémie à plasmocyte se définit par la présence d'une plasmocytose sanguine supérieure à 2000 plasmocytes/mm³, ou supérieure à 20% des leucocytes sanguins. (Fernández de Larrea *et al*, 2013)

b) Cytologie et immuno-phénotype

Sur le plan cytologique, les plasmocytes ont souvent un aspect normal, avec un cytoplasme basophile et un noyau excentré en raison de l'important appareil de Golgi. Les plasmocytes tumoraux sont parfois dystrophiques : présence de nucléoles, cellules bi-nuclées. Les immunoglobulines apparaissent parfois dans le cytoplasme sous forme de multiples vacuoles (cellules de Mott), d'une grande sphère homogène (corps de Russell) ou de bâtonnets. L'aspect morphologique fait parfois évoquer certaines anomalies cytogénétiques sous-jacentes : morphologie lympho-plasmocytoïde évoquant une t(11,14) ou morphologie plasmablastique avec chromatine lâche évoquant une t(4,14). (Garand *et al*, 2003) La plasmocytose médullaire doit être supérieure ou égale à 10% pour le diagnostic de myélome multiple symptomatique.

Figure 22: Aspects cytologiques des plasmocytes



Avec la permission du Dr Richard Garand. Coloration May Grunwald Giemsa. a : type mature, b : type lymphoplasmocytoïde, c : type immature plasmablastique.

Sur le plan phénotypique, les plasmocytes sont caractérisés par la co-expression du CD38 et du CD138. Dans le myélome, des marqueurs de surface sont anormalement exprimés (CD28, CD56) ou perdus (CD27). (Bataille *et al*, 2006) De plus, les plasmocytes tumoraux présentent une restriction isotypique de l'immunoglobuline, soit kappa soit lambda. Enfin, une expression aberrante du CD20 est essentiellement retrouvée dans les cas de myélome avec translocation t(11 ;14). (Robillard *et al*, 2003)

Tableau 10: Immuno-phénotype des plasmocytes normaux ou anormaux

	Plasmocytes Normaux	Plasmocytose Réactionnelle	Myélome Multiple	Leucémie à plasmocytes
CD138	+++	+++ et -	+++	+++
CD38	+++	+++	+++	+++
CD28	-	-	+	+
CD56	-	-	+++	-
CD19	+	+	-	-
CD27	+	+	+ /-	-
CD45	+	+	-	-

- : non exprimé, + : exprimé, +++ : fortement exprimé

Issu de (Bataille et al, 2006)

c) Cytogénétique

En pratique clinique, le caryotype standard est souvent un échec (près de 80% des cas) en raison de la difficulté d'obtenir un nombre suffisant de mitoses analysables. Il permet néanmoins d'obtenir l'information de l'hyperdiploïdie. La technique la plus sensible recommandée est l'hybridation par fluorescence in situ (*FISH*), ciblée sur les anomalies chromosomiques ayant un impact pronostic connu : translocation t(4 ;14), t(14 ;16) et délétion du chromosome 17. (Dimopoulos *et al*, 2011)

3) Présentation clinique

Il est maintenant établi que le myélome multiple est constamment précédé d'une phase asymptomatique indolente ou MGUS. (Weiss *et al*, 2009) Le risque de progression de MGUS vers le stade myélome est d'environ 1% par an. Le risque de progression du stade de myélome indolent vers le stade de myélome symptomatique et plus hétérogène : il est de 10%/an les 5 premières années, 3% / an les 5 suivantes puis rejoint le risque des MGUS, soit environ 1% par an. (Kyle *et al*, 2007).

Les principaux symptômes du myélome multiple symptomatique sont les douleurs osseuses et le syndrome anémique. Les lésions osseuses sont présentes chez près de 80% des patients au diagnostic. (Kyle *et al*, 2003) En dehors de la douleur, les risques majeurs liés aux lésions osseuses et mettant en jeu le pronostic vital ou fonctionnel sont l'hypercalcémie et le risque de fracture vertébrale avec compression médullaire. Le bilan osseux est systématique et comprend au minimum des radiographies du squelette axial et des os longs et au mieux une imagerie par résonance magnétique nucléaire. Une autre complication, rarement symptomatique, est l'insuffisance rénale présente dans 20% des cas au diagnostic. En dehors du risque vital lié à cette complication, sa persistance compromet l'utilisation de certains traitements du myélome, tel le melphalan. Enfin, le déficit immunitaire constant (immunoparésie, lié aux traitements etc) entraîne un risque élevé de complications infectieuses, constituant la première cause de mortalité chez ces patients.

4) Aspects pronostiques

En dehors des critères liés au patient (âge, comorbidités), plusieurs critères biologiques liés au myélome influencent fortement la survie des patients.

Le index pronostic international ISS (*International Staging System*) est un score pronostic simple, basé sur la dosage de l'albumine et de la β_2 microglobuline sériques, qui identifie trois groupes de patients au pronostic très différent. (Greipp *et al*, 2005) (Tableau 11)

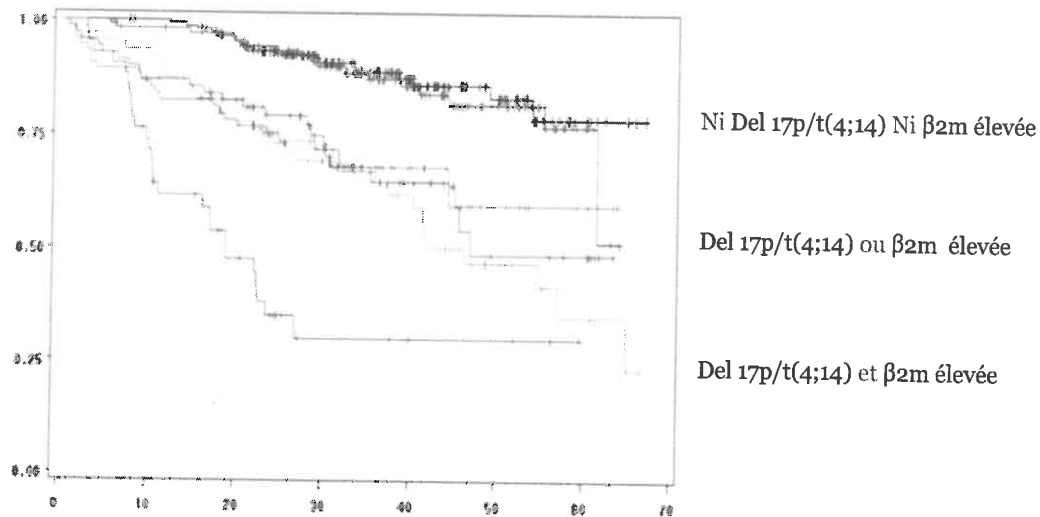
Tableau 11: International Staging system

Stade ISS	Critères	Survie (mois)
I	Albumine > 35 g/L β_2 microglobuline < 3,5 mg/L	62
II	Ni I ni III	44
III	β_2 microglobuline > 5,5 mg/L	29

Les anomalies cytogénétiques ont également un fort impact pronostique. Ainsi, la translocation t(4 ;14) et la délétion 17p, recherchées par technique de FISH, sont associées à une survie défavorable. (Avet-Loiseau *et al*, 2007)

La combinaison de l'ISS, de ces anomalies cytogénétiques, et du taux de LDH permet d'identifier un sous groupe de patient au pronostic très défavorable malgré un traitement intensif. (Moreau *et al*, 2014) Plus récemment, l'impact négatif de la délétion du chromosome 1p a été démontrée.

Figure 23: Impact pronostic des anomalies cytogénétiques



Abscisse : mois, Ordonnée : % de patients vivants. Cohorte de patients traités de manière intensive (autogreffe)

d'après (Avet-Loiseau et al, 2007)

L'analyse des différents profils d'expression génique apporte également des informations pronostiques, mais d'utilisation en routine plus difficile. (Zhan *et al*, 2006; Decaux *et al*, 2008)

Enfin, et de manière assez classique en onco-hématologie, la qualité de la réponse obtenue après traitement est également un puissant facteur pronostic. (Harousseau *et al*, 2009)

5) Prise en charge thérapeutique

a) Abstention – surveillance

A ce jour, seul le myélome multiple symptomatique relève d'un traitement. Pour les

patients atteints de MGUS ou de myélome indolent, une attitude d'abstention-surveillance est justifiée. Cependant, pour le stade de myélome indolent, certains critères basés sur l'imagerie (IRM), le % de plasmocytes médullaires, la cytométrie (rapport plasmocytes normaux / anormaux), ou sur un ratio de chaîne légères libres très déséquilibré, permettent d'identifier un sous groupe de patient à très haut-risque de progression (temps médian avant progression inférieur à un an). (Dispenzieri *et al*, 2013) Une étude a récemment démontré le bénéfice d'un traitement précoce pour ces patients SMM à haut risque. (Mateos *et al*, 2013)

b) Traitement de première ligne

La survie des patients a significativement augmentée au cours des dernières années. Le premier gain significatif en survie a été lié à l'utilisation du melphalan (agent alkylant) à forte dose avant greffe de cellules souches autologues au cours des années 1990. Le deuxième bond significatif de la survie a eu lieu au début des années 2000, grâce à l'utilisation des « nouvelles molécules » : le bortezomib (premier inhibiteur du protéasome), et le thalidomide (agent immunomodulateur aux propriétés anti-inflammatoires, anti angiogéniques et antitumorales). Le lenalidomide a également été développé, molécule analogue du thalidomide, mais présentant une plus grande efficacité anti-tumorale et une absence de neurotoxicité.

Le traitement actuel du myélome multiple repose sur ces trois piliers : inhibiteur du protéasome (bortezomib), agent immunomodulateur (thalidomide, lenalidomide, pomalidomide), agent alkylant (cyclophosphamide, melphalan), en association avec une molécule corticostéroïde (prednisone ou dexaméthasone).

En dépit des progrès majeurs dans la connaissance de la biologie du myélome et des critères pronostics, le choix du traitement repose encore essentiellement sur l'âge du patient et ses comorbidités.

Chez les patients de moins de 65 ans, le traitement de première ligne repose actuellement sur un traitement d'induction à trois drogues (inhibiteur du protéasome, agent immunomodulateur ou endoxan, dexaméthasone) suivie d'une autogreffe conditionnée par du melphalan forte dose puis d'un traitement de consolidation calqué sur la phase d'induction. (Moreau & Touzeau, 2013)

Chez les patients de plus de 65 ans ou inéligibles à une autogreffe, plusieurs traitements peuvent être recommandés en première ligne : la combinaison melphalan-prednisone-thalidomide (Facon *et al*, 2007), la combinaison melphalan-prednisone-bortezomib (San

Miguel *et al*, 2008), ou la combinaison lenalidomide-dexaméthasone jusqu'à progression. (Benboubker *et al*, 2014)

c) Traitement de la rechute

Lors de la rechute, la reprise d'un traitement comprenant des molécules données en première ligne est une option en fonction de la durée et de la qualité de la réponse initiale.

De nombreuses nouvelles molécules sont en cours développement, ou déjà approuvées par les instances sanitaires. Parmi les plus prometteuses on peut citer :

(i) *Le pomalidomide*. Le pomalidomide est un agent immunomodulateur de la famille du thalidomide et du lenalidomide ayant démontré un bénéfice de survie modéré mais significatif chez des malades en rechute. (San Miguel *et al*, 2013) Il s'agit d'une molécule orale.

(ii) *Le carfilzomib*. Le carfilzomib est un inhibiteur du protéasome de nouvelle génération ayant l'avantage de ne pas avoir la toxicité neurologique du bortezomib. Le carfilzomib est approuvé aux états unis pour le traitement des patients en rechute. (Moreau *et al*, 2012)

(iii) *l'ixazomib (ou MLN9708)* est également un inhibiteur du protéasome de nouvelle génération, disponible par voie orale, et ayant une faible neurotoxicité. (Richardson *et al*, 2014)

(iv) *L'elotuzumab* (anti CS-1) et le *daratumumab* (anti CD38) sont deux anticorps monoclonaux très prometteurs et aux profils de tolérance excellents actuellement en cours d'essais cliniques de phase 3. (Moreau & Touzeau, 2014)

(v) *ARRY-520*, membre d'une nouvelle classe thérapeutique : inhibiteur de KSP (*kinesin spindle protein*). ARRY-520 a démontré des taux de réponse significatifs en monothérapie chez des patients en rechute et profite actuellement d'un développement clinique rapide. (Owens, 2013)

B) Le lymphome à cellules du manteau

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) appartient aux lymphomes malin non-hodgkinien (LNH) de phénotype B. Le LCM n'est individualisé au sein des hémopathies lymphoïdes qu'en 2001. Cependant, ses particularités cytologiques, phénotypiques,

pronostiques, associées à la présence de la t(11 ;14) avaient été rapportées près de dix ans avant.

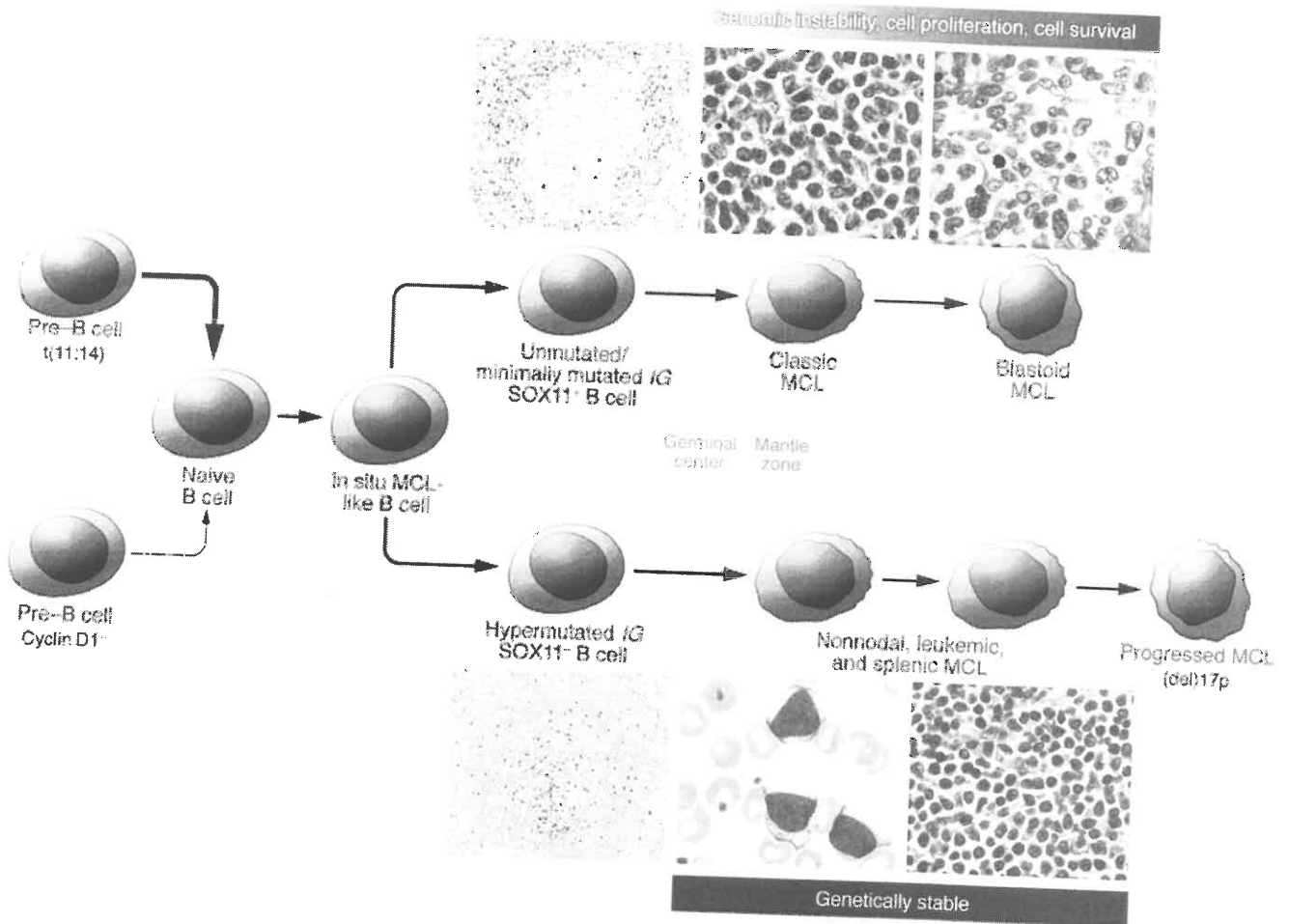
Le LCM représente environ 7% des LNH de l'adulte, avec une incidence en légère augmentation ces dernières années. (Zhou *et al*, 2008) Une étude récente de registres français a confirmé une nette prédominance masculine (environ 2/1) et un âge médian au diagnostic de 72 ans. (Leux *et al*, 2014) Initialement considéré comme un lymphome de bas-grade, le LCM est actuellement considéré, en raison de son histoire naturelle, comme un lymphome agressif. En effet, en dépit des progrès dans les traitements, la rechute reste constante, et la survie globale n'excède pas 7 ans. (Dreyling *et al*, 2014)

1) Oncogenèse

a) Cellule d'origine et modèle d'oncogenèse

La translocation t(11 ;14) est considérée comme l'évènement oncogénique primaire du LCM. Elle survient au niveau de la cellule lymphoïde pré B, au niveau de la moelle osseuse, lors du phénomène de recombinaison VDJ de la région variable du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IGVH, *ImmunoGlobulin Variable Heavy chain*). (Welzel *et al*, 2001) L'équivalent normal de la cellule tumorale du LCM était considéré être la cellule B naïve CD5 IgM/IgD +, colonisant la zone du manteau des follicules lymphoïdes. (Jares *et al*, 2012) Cette origine pré-germinative du LCM était sous-tendue par la faible fréquence de mutations somatiques du gène codant pour la partie variable de la chaîne lourde des immunoglobulines. (Jares *et al*, 2007) Cependant, des études récentes ont montré qu'une hypermutation du BCR était présente dans 15 à 40 % des cas, avec une restriction d'usage du gène IGVH, suggérant un rôle important de l'antigène dans l'oncogenèse de certains LCM. (Walsh *et al*, 2003; Hadzidimitriou *et al*, 2011) Le sous-groupe de LCM présentant un BCR muté et n'exprimant pas le facteur de transcription SOX11 semble correspondre à un modèle d'oncogenèse à part, corrélé à un pronostic favorable. (Navarro *et al*, 2012) L'oncogenèse du LCM est un processus multi-étapes, où l'accumulation d'anomalies génétiques entraîne une dérégulation du cycle et des mécanismes de mort cellulaire, sous-tendant l'évolution de formes indolentes vers des formes plus agressives de la maladie. (Figure 20)

Figure 24: Proposition de modèle d'oncogenèse du LCM



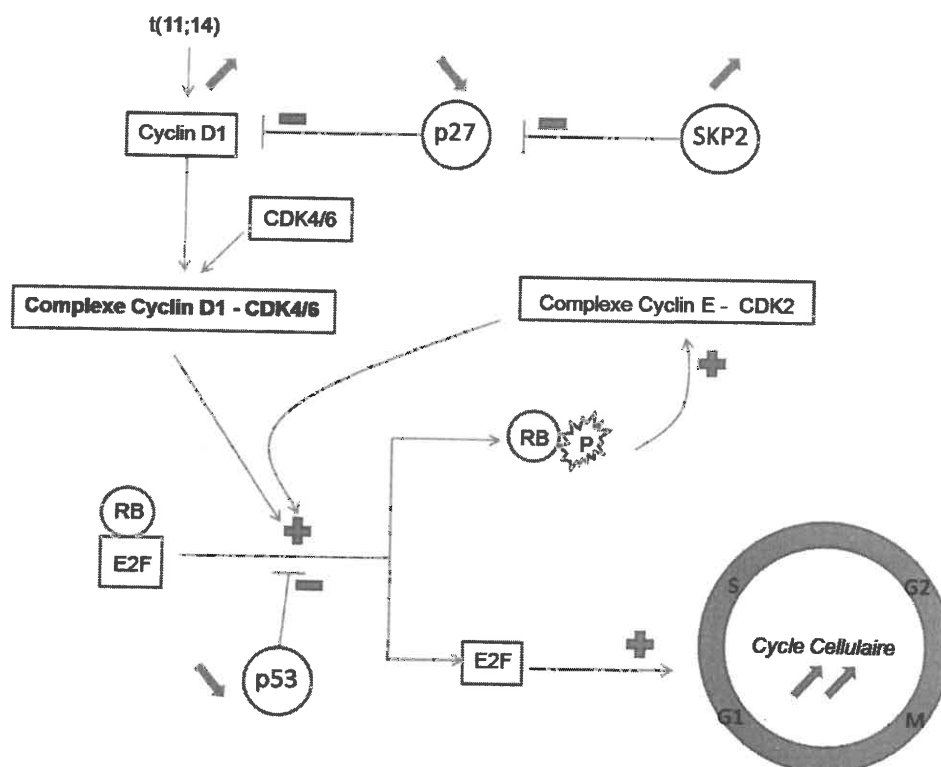
issu de (Jares *et al*, 2012)

Légende : La cellule pré-B présentant dans la grande majorité des cas une translocation $t(11;14)$ colonise la zone du manteau des follicules lymphoïdes et génèrent un LCM *in situ*. (i) La plupart des formes de MCL évoluent à partir de ces cellules ayant pas ou peu de mutations hyper-somatiques du BCR. Ces cellules sont caractérisées par une forte expression de SOX11. Ces formes sont instables génétiquement et acquièrent des anomalies du cycle cellulaire, de l'apoptose favorisant l'évolution de formes classiques vers des formes plus agressives. (ii) Certaines formes de LCM proviennent de cellules étant entrées dans le centre germinatif et ayant vécu le phénomène d'hyper-mutations somatiques. Ces formes, exprimant faiblement SOX11, sont plus stables génétiquement, et correspondent à des LCM plus indolents, classiquement à présentation médullo-sanguine.

b) La translocation t(11;14)

Le LCM est caractérisé par la translocation réciproque entre les chromosomes 11 et 14 (t(11 ;14)), qui juxtapose le gène BCL-1 (11q13) et le gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32). Cette translocation réciproque conduit à la surexpression de la protéine cycline D1, codée par BCL-1, jouant un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules de LCM. (Jares *et al*, 2007) En effet, la protéine cycline D1 se lie aux protéines kinases *Cyclin Dependant Kinase* (CDK) 4 et CDK6, formant un complexe phosphorylant la protéine du rétinoblastome 1 (RB1). Cette phosphorylation de RB1 va permettre la libération du facteur de transcription E2F, induisant le passage du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. (Jares *et al*, 2012) La libération d'E2F provoque également l'accumulation de complexe cyclin E/CDK2, inhibant de manière irréversible RB1. (Harbour and Dean 2000, Jares and Campo 2008). Les altérations géniques secondaires fréquemment retrouvées dans le LCM (altération de p53, de p27, surexpression de Skp2) contribuent à cette physiopathologie. (Figure 20)

Figure 25: Conséquence de la translocation t(11;14) sur le cycle cellulaire dans le lymphome à cellules du manteau



Légende : CDK, cyclin dépendant kinase ; RB, protéine du rétinoblastome; P, phosphorylation. Les flèches rouges indiquent les modifications retrouvées dans le LCM.

Bien que non spécifique, la translocation t(11 ;14) est retrouvée dans l'immense majorité des LCM. De manière intéressante, les rares cas de LCM sans translocation t(11;14) ont une surexpression d'une autre protéine cycline (cyclin D2 ou D3) suggérant un mécanisme alternatif de tumorigenèse. (Fu *et al*, 2005) La translocation t(11 ;14) n'explique pas à elle seule l'oncogenèse du LCM. La présence du réarrangement Bcl-1- IgH peut-être détectée par PCR jusqu'à 7% des sujets sains. (Lecluse *et al*, 2009) Ainsi, d'autres événements oncogéniques sont nécessaires à la transformation de la cellule lymphoïde en LCM.

c) Inhibition de l'apoptose

La dérégulation de l'apoptose est constante dans le LCM. Ainsi, l'analyse de profil d'expression de gène a montré que les cellules tumorales du LCM sur-expriment fortement BCL-2 en comparaison avec des cellules B normales. (Ek *et al*, 2002; Hofmann *et al*, 2001) La surexpression de BCL-2 au niveau protéique par les cellules primaires de LCM a été confirmée. (Tracey *et al*, 2005) Ces données apportent le rationnel de l'étude de l'activité de BH3 mimétiques ciblant BCL-2 dans le LCM. Le rôle de MCL-1 dans la résistance au bortezomib a également été rapporté. (Pérez-Galán *et al*, 2006) Sur le plan clinique, il a été montré que les formes agressives de LCM ont un niveau d'expression élevé de MCL-1 (Khoury, et al 2003). (Khoury *et al*, 2003) De plus, des délétions homozygotes du *BH3-only* pro-apoptotique BIM ont été retrouvées chez environ un tiers des biopsies ganglionnaires de patients atteints de LCM. (Mestre-Escorihuela *et al*, 2007) Enfin, la dérégulation de la dégradation de NOXA par le protéasome participe à la survie des cellules de LCM. (Dengler *et al*, 2014) La voie extrinsèque de l'apoptose participe également à l'oncogenèse du LCM. En effet, il a été montré une sous-expression de FADD dans le LCM. (Hofmann *et al*, 2001) Enfin, l'activation des récepteurs de TRAIL permet de déclencher l'apoptose de lignées cellulaires de LCM. (Roué *et al*, 2007)

d) Activation de la voie du BCR.

En physiologie, l'activation de la voie du BCR (*B Cell Receptor*) entraîne l'activation des enzymes clés de cette voie : SYK (Spleen Tyrosine Kinase), LYN, BTK (*Bruton Tyrosine Kinase*), PKC (*Protein Kinase C*), PLC γ 2 (*Phospholipase C- γ 2*). Cette cascade conduit à la survie et à la prolifération cellulaire notamment via l'activation des voies NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cell*), NF κ -B, RAS et PI3K/Akt. (Hendriks *et al*, 2014) La voie du BCR est activée de manière constitutionnelle dans le LCM. Ainsi, certaines enzymes clés de cette voie : SYK, LYN et PKC, sont constitutivement phosphorylées chez certains patients. (Pighi *et al*, 2011) De plus, l'enzyme BTK est fortement exprimée par les cellules de LCM. (Cinar *et al*, 2013) L'utilisation d'inhibiteurs de BTK, tel l'ibrutinib, réduit la viabilité des cellules de LCM, à la fois par une action antitumorale directe, mais également via une interaction avec le micro-environnement tumoral. (Cinar *et al*, 2013; Chang *et al*, 2013) Il a récemment été montré que l'activation classique ou alterne de la voie NF κ -B conditionne la sensibilité aux inhibiteurs de la voie du BCR. (Rahal *et al*, 2014)

e) Activation de la voie PI3K/Akt/mTOR.

La voie de signalisation phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K)/Akt joue un rôle majeur dans la division et la survie cellulaire. Cette voie de signalisation est impliquée dans l'oncogenèse de nombreuses tumeurs malignes. L'activation, par des facteurs de croissance, de protéines kinases transmembranaires déclenche l'activité catalytique de la PI3K. L'activation de la PI3K entraîne (1) une cascade de seconds messagers tel le phosphatidyl-inositol, jouant un rôle majeur dans la croissance et la survie des tumeurs, (2) l'activation de la protéine kinase Akt, régulant la prolifération et l'apoptose cellulaire et (3) l'activation de la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Il a été montré par étude de profil d'expression génique une activation de la voie PI3K/AKT dans le LCM. (Rizzatti *et al*, 2005) De plus, l'activation de la voie PI3K/AKT a été associée à la perte d'expression du gène PTEN (Rudelius, *et al* 2006). (Rudelius *et al*, 2006) L'activation anormale de la voie mTOR dans le LCM est associée à une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. (Peponi *et al*, 2006)

f) Anomalies de réparation des dommages à l'ADN

Les analyses de profil d'expression génique ont révélé que le LCM était une hémopathie de haute instabilité génomique. Les anomalies retrouvées concernent notamment les gènes impliqués dans le processus de réparation de dommages à l'ADN. Ainsi, les gènes TP53 et ATM, fortement impliqués dans, sont fréquemment retrouvés mutés chez les patients atteints de LCM. (Beà *et al*, 2013) Ces mutations confèrent un grand avantage sélectif et sont considérées comme *driver* lors de l'oncogenèse. Par ailleurs, CD4K et MDM2, régulateurs négatifs de TP53, sont également fréquemment altérés chez les patients, et sont associés à une forme agressive de la maladie. (Hernández *et al*, 2005)

2) Aspects diagnostiques

a) Anatomo-pathologie

Le diagnostic de LCM repose sur l'analyse anatomo-pathologique du tissu tumoral, au mieux du tissu ganglionnaire. La prolifération tumorale intéresse la zone du manteau des follicules. Selon l'architecture de l'envahissement tumoral, on distingue la forme de la zone du manteau, la forme nodulaire et la forme diffuse. (Swerdlow *et al*, 2008) Sur le plan cytologique, la forme classique représente 80 à 90% des cas. (Tableau 7) Elle est caractérisée par un infiltrat lymphoïde monomorphe, constitué de cellules de taille petite à intermédiaire d'aspect centrocytique. De cette forme classique se distinguent les formes blastoïde et pléomorphe. La forme blastoïde, retrouvée chez 10 à 20% des patients, est caractérisée par la présence de cellules d'aspect lymphoblastique avec un index de prolifération élevé (nombreuses images de mitoses, positivité du marquage Ki-67 >40%). La forme blastoïde est associée à un pronostic défavorable. (Bernard *et al*, 2001)

En immuno-histochimie, la présentation du LCM est caractéristique avec expression des antigènes B matures (CD19, CD20) et des antigènes CD5 et CD43. L'expression d'immunoglobuline de surface (IgM/IgD) est habituellement intense et le plus souvent associée à la chaîne légère λ . L'expression du CD23 est généralement négative. Les marqueurs du centre germinatif (CD10, BCL6, MUM-1) sont négatifs dans le LCM. Enfin, la positivité de l'antigène BCL-1 est caractéristique du LCM. L'index de prolifération, évalué par marquage de

Ki67, est généralement faible dans les formes classiques, et beaucoup plus élevé dans les formes blastoïdes et pléomorphes.

Tableau 12: Formes morphologiques du LCM

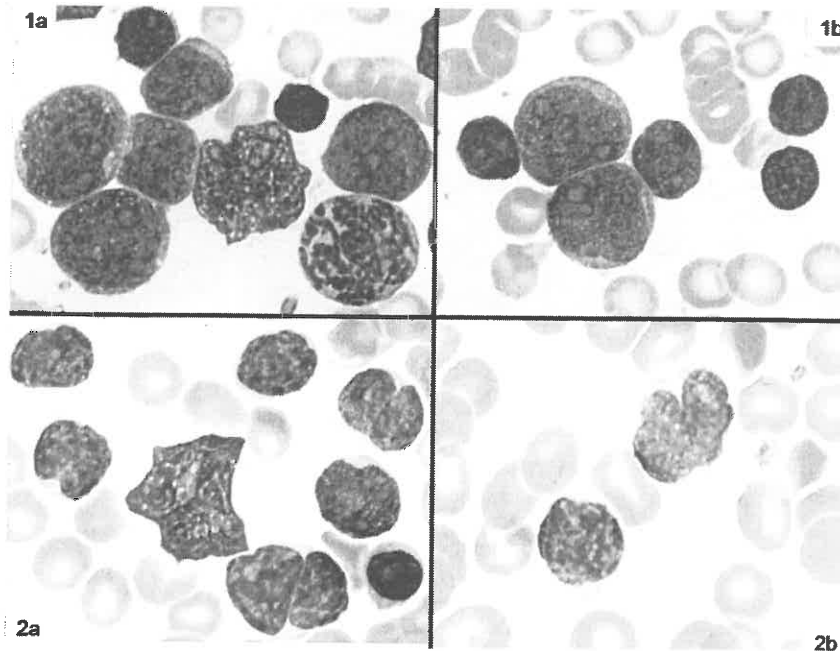
Forme cytologique	Caractéristiques
Classique	Cellules monomorphes, de taille petite à moyenne. Noyau irrégulier, encoché, plus ou moins nucléolé, à chromatine dispersée. Cytoplasme peu abondant. Présence possible de rares cellules tumorales de plus grande taille et de rares images de mitose.
Petites Cellules	Cellules tumorales rondes, monomorphes, de petite taille ressemblant aux cellules de lymphome lymphocytaire. Chromatine mottée, condensée.
Blastoïde	Cellules de taille intermédiaire à grande. Noyau plus ou moins irrégulier. Chromatine lâche à fine avec nucléoles. Cytoplasme peu abondant. Index mitotique élevé avec présence d'images de corps apoptotiques. Aspect souvent difficile à distinguer d'un lymphome à grandes cellules B ou lymphoblastique.
Pléomorphe	Nombreuses cellules de taille intermédiaire à grande avec grands nucléoles. Cytoplasme peu abondant

d'après Bertoni and Ponzoni (Bertoni & Ponzoni, 2007)

b) Cytologie et immunophénotype

Le LCM est caractérisé par la fréquence importante de cellules tumorales circulantes. La présence d'une phase leucémique de LCM (lymphocytose quantitativement ou morphologiquement anormale) est présente dans 20% à 70% des cas. (Andersen *et al*, 2002; Samaha *et al*, 1998). L'aspect cytologique retrouve la présence de cellules lymphoïdes anormales très pléomorphes, de taille petite à moyenne. Le noyau est irrégulier, encoché voir clivé. La chromatine est lâche, mal mottée, avec présence de nucléoles de taille et en nombre variables. Le cytoplasme est parfois abondant, peu basophile, sans granulations. Dans la forme blastoïde, les cellules anormales sont plus grandes, pourvues d'une chromatine plus lâche voir fine, conférant à ces cellules une allure blastique, ressemblant à celles d'une leucémie aigüe lymphoblastique ou d'un lymphomes à grandes cellules B.

Figure 26: Aspect cytologique des cellules de LCM



Aspect cytologique de cellules circulantes du LCM (avec la permission du Docteur R. Garand) 1a et 1b : forme blastoïde de LCM. 2a et 2b : forme classique de LCM. Coloration May-Grünwald- Giemsa. Objectif x40.

L'immunophénotype des lymphocytes tumoraux du LCM, bien que non spécifique est évocateur : CD19+, CD20++, CD5+, CD23-, CD10-, CD79b++, FMC7+, sIg++, CD38+. Les cellules de LCM sont CD200 négatives, ce qui contribue au diagnostic différentiel avec la LLC. (Alapat *et al*, 2012)

c) Cytogénétique

La mise en évidence de la translocation t(11 ;14) est essentielle pour poser le diagnostic de LCM. En raison d'un faible index mitotique des cellules tumorales, la sensibilité de la cytogénétique conventionnelle (réalisation du caryotype) est décevante (environ 70%). (Leroux *et al*, 1991) La technique actuelle de référence pour le diagnostic cytogénétique du LCM est l'hybridation fluorescente in situ (FISH). Il s'agit d'une technique simple, rapide, nécessitant du matériel frais ou congelé, et d'une sensibilité excellente de quasi 100%. (Avet-Loiseau *et al*, 1998) La cytogénétique conventionnelle retrouve des anomalies cytogénétiques surajoutées à la

t(11 ;14) dans près de 80% des cas. (Sarkozy *et al*, 2014) Parmi les anomalies fréquemment retrouvées, on note la délétion du chromosome 13 (25%), du chromosome 9 (40%), et la délétion du chromosome 17 (P53) (20%). Un caryotype complexe (> 3 anomalies) est retrouvé chez près de 70% des patients. Les anomalies géniques et chromosomiques ont été analysées par technique de profil d'expression génique, PCR, *CGH array*. (Jardin *et al*, 2009; Rubio-Moscardo *et al*, 2005; Rinaldi *et al*, 2006) Les principales anomalies retrouvées concernent des pertes d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs : 17p13 (TP53), 11q22-q23 (ATM), 9p21-p22 (CDKN2A). Les principaux gains d'expressions sont des régions chromosomiques siège d'oncogènes : 8q21 (MYC), 9q22 (SYC), 18q11-q23 (BCL2).

3) Présentation clinique

Les patients présentant un lymphome à cellules du manteau ont le plus souvent un état général conservé. Les symptômes B (sueurs nocturnes, fièvre, perte de poids significative) sont rares (environ 15%). La maladie est le plus souvent étendue au diagnostic : atteinte ganglionnaire diffuse dans près de 60% des cas, stade Ann Arbor III/IV dans près de 90% des cas, atteinte ostéo- médullaire dans près de 80% des cas. Une splénomégalie est retrouvée chez un patient sur deux environ, une hépatomégalie chez un patient sur six. (Bosch *et al*, 1998; Samaha *et al*, 1998) L'une des particularités cliniques du LCM est l'atteinte digestive préférentielle. La présence de symptômes digestifs (diarrhée, douleur abdominale, hémorragie digestive) est retrouvée chez environ un quart des patients. Cependant, la recherche systématique par endoscopie avec biopsies permet de documenter l'atteinte digestive du LCM dans près de 90% des cas. (Romaguera *et al*, 2003)

Sur le plan biologique, l'hémogramme retrouve anémie (<12 g/dL) et thrombopénie (<100 000/mm³) dans respectivement 35 et 10% des cas. (Samaha *et al*, 1998) Une lymphocytose > 4000/mm³ est retrouvée chez près d'un malade sur cinq. Le taux de LDH est supérieur à la normale dans 40% des cas. La β 2microglobuline est élevée dans près de 50% des cas.

4) Aspects pronostiques

De nombreux facteurs pronostiques ont été décrits dans le LCM. En 2008, Hoster et al ont publié un score pronostic basé sur des variables clinico-biologiques simples appelé MIPI (*Mantle cell lymphoma International Prognostic Index*) déterminé sur une population de 455 patients. Les paramètres du score MIPI sont l'âge, le PS, le taux de LDH et la leucocytose. Ce score permet de classer les patients en niveau de risque bas, intermédiaire et élevé avec des survies médianes respectivement non atteinte, de 51 mois et 21 mois. (Hoster *et al*, 2008) La valeur de ce score a été récemment confirmée par l'analyse de plusieurs essais prospectifs. (Hoster *et al*, 2014)

Sur le plan morphologique, la forme blastoïde est également corrélée à une survie inférieure. (Bernard *et al*, 2001)

Sur le plan cytogénétique, la présence d'anomalies de p53 est associée à un pronostic défavorable. (Hernandez *et al*, 1996; Sarkozy *et al*, 2014) Un score pronostic basé sur l'expression de cinq gènes (RAN, MYC, TNFRSF10B, POLE2, SLC29A2) a également été rapporté. (Hartmann *et al*, 2008) Enfin, des anomalies de nombre de copies de gènes (gain de CDK2/MDM2, perte de CDKN2A/TP53), analysées par technique de PCR quantitative, sont associées à un mauvais pronostic. (Jardin *et al*, 2009)

De manière assez commune aux hémopathies malignes, la qualité de la réponse au traitement influence fortement la survie des patients. Ainsi, il a été montré que l'obtention d'une maladie résiduelle moléculaire négative (recherche de réarrangement IgH par PCR) était prédictif d'une survie sans maladie plus longue après traitement intensif (Pott, et al 2006). (Pott *et al*, 2010)

5) Prise en charge thérapeutique

a) Abstention – surveillance

Etant donnée l'histoire naturelle et le pronostic du LCM, la grande majorité des patients requiert un traitement dès le diagnostic. Cependant, une attitude d'abstention-surveillance peut être justifiée pour certaines formes plus indolentes de LCM (formes médullo-sanguines, statut IgV_H muté). (Orchard *et al*, 2003) Dans étude rétrospective ayant comparé un traitement

immédiat à un traitement différé chez des patients atteints de LCM indolent, une meilleure survie globale a été retrouvée pour les patients ayant eu un traitement différé. (Martin *et al*, 2009)

b) Traitement de première ligne

Chez les patients non éligible à un traitement intensif (âgés de plus de 65 ou avec comorbidités), le traitement de première ligne repose actuellement sur une immuno-chimiothérapie à base d'anthracyclines : R-CHOP (rituximab - cyclophosphamide - doxorubicine - vincristine - prednisone) ou R-VAD-C (rituximab - vincristine - adriamycine - dexaméthasone - chloraminophène). (Kluin-Nelemans *et al*, 2012; Gressin *et al*, 2010) Un traitement de maintenance par rituximab a démontré un avantage en terme de survie globale chez cette population de sujets âgés. (Kluin-Nelemans *et al*, 2012) Des résultats intéressants, notamment en terme de tolérance, ont été rapportés avec la combinaison bendamustine - rituximab. (Rummel *et al*, 2013)

Chez les sujets éligibles à un traitement intensif, l'autogreffe reste à ce jour le traitement offrant la meilleure survie sans progression. (Touzeau *et al*, 2014) Le traitement d'induction pré-autogreffe recommandé est une chimiothérapie de l'aracytine à forte dose (R-Dexaméthasone - Aracytine - sel de platine : cisplatine ou carboplatine) (R-DHAP ou R-DHAC), en alternance avec une chimiothérapie par R-CHOP. (Hermine *et al*, 2012)

c) Traitement de la rechute

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif du LCM et la rechute reste constante. Lors de la rechute, la reprise d'une immuno-chimiothérapie reste la règle, en tenant compte de la durée de la réponse initiale et d'éventuelle résistance croisée. (Dreyling *et al*, 2014)

Pour certains patients, l'allogreffe de moelle peut être proposée, mais reste associée à une toxicité significative. (Le Gouill *et al*, 2012)

Le développement actuel de nombreuses nouvelles molécules offre des perspectives très prometteuses, en monothérapies ou en combinaison avec la chimiothérapie.

Parmi ces nouvelles molécules, on citera plus particulièrement :

(i) *inhibiteurs du protéasome*. Le LCM est l'un des syndromes lymphoprolifératifs les plus sensibles au bortezomib. En monothérapie, le bortezomib permet des taux de réponse de l'ordre de 30%. (Fisher *et al*, 2006) La toxicité est principalement neurologique. Le bortezomib est actuellement évalué en combinaison avec la chimiothérapie. (Kouroukis *et al*, 2011; Houot *et al*, 2012)

(ii) *agents immunomodulateurs*. Le lenalidomide est un analogue du thalidomide dont les mécanismes d'action reposent sur des propriétés immuno-modulatrices, antiprolifératives et anti-angiogéniques. Un essai prospectif de phase 2 sur plus de cent patients en rechute a testé le lenalidomide en monothérapie. Le taux de réponse est également de l'ordre de 30%, avec une toxicité acceptable, principalement hématologique. (Goy *et al*, 2013)

(iii) *inhibiteurs de la voie mTOR*. Le temsirolimus (inhibiteur de mTOR) a fait l'objet d'une étude prospective de phase 3 chez des patients atteints de LCM en rechute ou réfractaire. (Hess *et al*, 2009) Le temsirolimus était comparé à un traitement laissé au choix de l'investigateur. Malgré une toxicité principalement hématologique, le temsirolimus a montré sa supériorité en terme de taux de réponse et de survie globale. L'everolimus, un inhibiteur oral de la voie mTOR, a déjà démontré des taux de réponse significatifs en monothérapie. (Wang *et al*, 2014; Renner *et al*, 2012)

(iv) *inhibiteur de BTK*. L'inhibiteur de BTK oral ibrutinib représente probablement l'une des avancées récentes les plus significatives dans le traitement des patients atteints de LCM. Un taux de réponse globale de 68% a été obtenu en monothérapie chez des patients très avancés dans leur maladie, avec une excellente tolérance. (Wang *et al*, 2013)

(v) *inhibiteur de la voie PI3K*. L'idelalisib est également une molécule orale ayant démontré des taux de réponse prometteurs et une tolérance excellente dans un essai de phase 1. (Kahl *et al*, 2014)

(vi) *BH3 mimétique anti BCL-2*. Les résultats des essais en cours, très prometteurs dans le LCM, seront discutés dans la partie discussion de cette thèse.

Résultats

Le myélome multiple (MM) et le lymphome à cellules du manteau (LCM) sont les deux axes thématiques de l'équipe 10 du Centre de Recherche Centre le Cancer Nantes Angers (CRNA). Ces deux hémopathies malignes partagent des caractéristiques communes : toutes deux appartiennent aux syndromes lymphoprolifératifs B matures et restent, à l'heure actuelle, incurables. En effet, malgré des progrès significatifs dans le traitement du MM et du LCM, la rechute reste constante.

La voie mitochondriale de l'apoptose est perturbée dans le MM et le LCM, ce qui favorise la survie tumorale et la résistance aux traitements. Notamment, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est surexprimée chez la majorité des patients atteints de LCM, et par un sous-groupe de patients atteints de MM. Ainsi, Bcl-2 constitue une cible thérapeutique attractive pour ses deux hémopathies.

Une précédente approche visant à diminuer l'expression de Bcl-2 via l'utilisation de molécules *antisens* anti-Bcl-2 s'est avérée décevante en clinique. Cette déception peut être liée à une insuffisance de l'extinction de Bcl-2 *in vivo*, mais également liée aux mécanismes adaptatifs entraîne l'induction de l'expression d'autres protéines anti-apoptotiques, neutralisant l'effet thérapeutique attendu. Le mécanisme d'action des molécules BH3 mimétiques est différent et antagonise la fonction de Bcl-2 en dissociant les complexes *BH3 only* pro-apoptotiques séquestrées par Bcl-2, induisant ainsi la mort par apoptose.

Les travaux rapportés dans ce travail de thèse ont analysé la sensibilité des cellules tumorales de MM et de LCM aux deux molécules BH3 mimétiques ABT-737 (ciblant Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w) et ABT-199 (ciblant Bcl-2).

ARTICLE 1 : L'ABT-737 induit l'apoptose des cellules tumorales de LCM présentant un profil Bcl-2^{fort}/Mcl-1^{faible} et agit en synergie avec d'autres agents antitumoraux

Dans ce premier travail, la sensibilité à l'ABT-737 d'un panel de lignées tumorales et de cellules primaires de LCM a été analysée. Les résultats ont révélé une importante hétérogénéité de sensibilité, avec des doses létales 50 allant de 25 à 10 000 nM. Dans une lignée sensible, nous avons confirmé que l'ABT-737 induisait la mort par apoptose, avec une activation de Bax, et un clivage des caspases 3 et 9 précoce, survenant dès deux heures d'exposition à la drogue. Comme l'ABT-737 cible Bcl-2, Bcl-xL mais non Mcl-1, nous avons analysé la sensibilité des cellules de LCM au regard de l'expression de ces protéines anti-apoptotiques. Nous avons montré que la sensibilité à l'ABT-737 était conditionnée par l'expression relative de Bcl-2 et de Mcl-1, les cellules sensibles présentant un ratio Bcl-2^{fort}/Mcl-1^{faible}. Le rôle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-737 a été confirmé par technique de SiRNA, en montrant que l'extinction de Mcl-1 restaurait la sensibilité à l'ABT-737 de lignées résistantes. Enfin, nous avons montré une importante synergie anti-tumorale en associant l'ABT-737 avec le flavopiridol, une molécule inhibitrice de Cyclin Dependant Kinase induisant une inhibition de la transcription de Mcl-1. Enfin, une efficacité synergique est également démontrée en combinant l'ABT-737 avec deux drogues importantes dans le traitement des patients atteints de LCM : le bortezomib et l'aracytine.

ABT-737 Induces Apoptosis in Mantle Cell Lymphoma Cells with a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} Profile and Synergizes with Other Antineoplastic Agents

Cyrille Touzeau^{1,2}, Christelle Dousset^{1,4}, Linda Bodet^{1,5}, Patricia Gomez-Bougie^{1,4,5}, Stéphanie Bonnaud¹, Anne Moreau³, Philippe Moreau^{1,2}, Catherine Pellat-Deceunynk¹, Martine Amiot¹, and Steven Le Gouill^{1,2,4}

Abstract

Purpose: Mantle cell lymphoma (MCL) is considered to be incurable. ABT-737 is a BH3 mimetic that targets Bcl-2, which is overexpressed in MCL and implicated in drug resistance. The present work investigated the antitumor effect of ABT-737.

Experimental Design: Six MCL cell lines and primary MCL cells ($n = 13$) were used. Sensitivity to ABT-737 was assessed, and expression levels of Bcl-2 and Mcl-1 were analyzed. Finally, ABT-737 was combined with other cytotoxic agents to promote tailored therapy.

Results: MINO and GRANTA-519 cell lines were highly sensitive to ABT-737 [the median lethal dose (LD_{50}) = 20 and 80 nmol/L, respectively], whereas other cell lines were resistant. In primary MCL cells, 46% of patients' samples were sensitive to ABT-737. The analysis of protein expression levels revealed that both sensitive cell lines and primary MCL cells could be characterized by a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile, whereas resistant MCL cells contained high levels of Mcl-1. ABT-737 induced a rapid disruption of both Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes. In addition, silencing of Mcl-1 by siRNA sensitized MCL cell lines to ABT-737. Similarly, flavopiridol, which induces Mcl-1 downregulation, in combination with ABT-737 led to a synergistic anti-MCL effect in ABT-737-resistant cell lines. This synergy was also observed when ABT-737 was combined with either bortezomib or cytarabine.

Conclusions: The present work shows that ABT-737 induces strong apoptosis in MCL cells expressing a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile. In ABT-737-resistant MCL cells, downregulation of Mcl-1 overcomes Mcl-1-induced resistance and synergizes ABT-737 effects. Our results strongly support the use of ABT-737 according to the Bcl-2/Mcl-1 tumor cell profiles in the treatment of MCL. *Clin Cancer Res*; 17(18); 5973–81. ©2011 AACR.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) that accounts for approximately 5% of all NHLs (1). Despite recent improvements in

therapy, most patients experience relapses and survive an average of approximately 5 years from the time of diagnosis (2). Intensive chemotherapy regimens combined with anti-CD20 antibodies with or without autologous stem cell transplantation are widely used but not well-tolerated in elderly or unfit patients. Indeed, there is an urgent need for new targeted molecular approaches using novel compounds. New insights into the pathogenesis of MCL tumor cells have recently opened windows of opportunity for innovative targeted therapies (3, 4). One of these new therapeutic approaches is to induce apoptosis via the intrinsic pathway and/or to overcome MCL cell resistance by antagonizing the antiapoptotic Bcl-2 family proteins. This approach is prompted by several investigations showing that the antiapoptotic protein Bcl-2 is constitutively overexpressed in MCL and plays a major role in drug resistance (5, 6). These findings highlight the potential of Bcl-2-targeted therapy in MCL.

Members of the Bcl-2 family are critical regulators of apoptosis, and the interactions between prosurvival and proapoptotic members are major determinant of cell fate

Authors' Affiliations: ¹INSERM UMR 892, Université de Nantes; ²Service d'hématologie clinique, ³Service d'anatomie pathologique, and ⁴Unité de recherche clinique (URC) en hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes; and ⁵Equipe Labellisée Ligue 2008, Nantes, France

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

C. Touzeau and C. Dousset contributed equally to this work.

Corresponding Author: Steven Le Gouill, INSERM UMR 892 équipe 10, Nantes, France; Service d'hématologie clinique, Université de Nantes, Hôtel-Dieu, Place Alexis Ricordeau, 44 093 Nantes Cedex, France. Phone: 332-40-08-32-63; Fax: 332-40-08-32-50; E-mail: steven.legouill@chu-nantes.fr or Martine Amiot, INSERM UMR 892 équipe 10, Nantes, France. Phone: 33-2-40-08-47-68; Fax: 33-2-40-08-47-78; E-mail: Martine.Amiot@univ-nantes.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0955

©2011 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Prognosis of mantle cell lymphoma (MCL) is considered to be inferior to most of the other non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and new therapeutic approaches are warranted. The rationale to target Bcl-2 proteins in MCL has been investigated using ABT-737, a BH3 mimetic that targets Bcl-2 and Bcl-xL but not Mcl-1. We show that ABT-737 alone induces apoptosis only in Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} MCL cells. By the use of siMcl-1 transfection, we show the key role of Mcl-1 in ABT-737 resistance. To overcome Mcl-1 resistance in clinical practice, we investigated two different strategies using three different drugs in combination with ABT-737 as follows: (i) to downregulate Mcl-1 expression using flavopiridol or 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and (ii) to neutralize Mcl-1 antiapoptotic function by increasing Noxa with bortezomib. Our investigations confirm the synergistic effect of these combinations in ABT-737-resistant cell lines. In conclusion, the present work brings the rationale for the use of ABT-737 alone or in combination according to the apoptotic profile of MCL cells.

(7). Structural and functional characteristics divide them into 3 subgroups as follows: multidomain antiapoptotic members (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, and A1), multidomain proapoptotic members (Bax and Bak), and BH3-only members (Bim, Bid, Bad, Bik, Puma, and Noxa). In response to a wide range of derangement signals, BH3-only members are activated (8). Certain BH3-only proteins, including Bim and Bid, are called activators because of their ability to activate Bax and Bak (9). In contrast, the antiapoptotic molecules antagonize cell death by sequestering either BH3-only proteins or multidomain proapoptotic members. The presence of Bax or Bak is required to mediate mitochondrial damage. First, these multidomain proapoptotic family members have to be activated to oligomerize; subsequently, oligomers form pores in the mitochondrial outer membrane. The apoptotic cascade is frequently, if not always, altered in tumor cells including MCL cells (3).

ABT-737 is a new compound that selectively binds with high affinity to Bcl-2 and Bcl-xL (10). ABT-737 displaces proapoptotic BH3-only from Bcl-2 or Bcl-xL, leading to activation of Bax and Bak and downstream caspases (9). Because of the low affinity of ABT-737 for Mcl-1, high basal levels of Mcl-1 have been associated with ABT-737 resistance (11–14). Previous studies have also shown that ABT-737 is effective as a single agent against some leukemia/lymphoma cell lines both *in vitro* and *in vivo* (11, 15–17).

This present study was focused on the antitumoral effect of ABT-737 in MCL. We also aimed to identify prognostic biomarkers that may predict MCL tumor cell responses to ABT-737. Using this approach, we have developed a rationale for ABT-737-based tailored therapeutic strategies in MCL.

Materials and Methods

MCL cell lines and primary MCL cells

JEKO-1, MINO, REC-1, GRANTA-519, and JVM-2 MCL cell lines were purchased from DSMZ. The UPN-1 MCL cell line was kindly provided by Dr. V. Ribrag (Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France). JEKO-1, MINO, REC-1, GRANTA-519, and JVM-2 cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mmol/L glutamine. UPN-1 was maintained in MEMα supplemented with 10% FCS and 2 mmol/L glutamine. Primary MCL cells were obtained from patients treated in our institution who had provided their written informed consent and been diagnosed with *de novo* or relapsed MCL; diagnosis was confirmed according to the WHO classification (18). MCL cells from blood or ascites were obtained following gradient density centrifugation using Ficoll-Hypaque. For Western blot analysis, MCL cells were purified with CD19 immunomagnetic beads.

Antibodies (monoclonal antibodies) and reagents

Antibodies used in this study were as follows: anti-Bcl-2 (clone 124; Dako), anti-Mcl-1 (S19; Santa Cruz Biotechnology), anti-caspase 3 (E-8; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bik (N19; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-xL (BD Biosciences), anti-actin (Chemicon), anti-Noxa (Alexis Coger), anti-Bax (clone 4F11; Immunotech), anti-Bim (Millipore), and anti-Puma (Ab-1; Calbiochem). ABT-737 was kindly provided by Abbott Laboratories. Flavopiridol and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) were obtained from Sigma Aldrich. Bortezomib was kindly provided by Millenium Laboratory.

Flow cytometric analysis of apoptosis and Bax/Bak activation

Cell death in MCL cell lines was assessed by Apo 2.7 staining. Cell death in primary MCL cells was assessed by both Apo 2.7 and CD19 staining combined with an analysis of altered cellular morphology [lower forward scattering (FSC)]. Flow cytometric analysis was carried out on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson). For Bax and Bak immunofluorescence staining, 5×10^5 cells were fixed using the IntraPrep Permeabilization Reagent Kit (Immunotech) following the manufacturer's recommendations. The cells were incubated with anti-Bax (clone 6A7) monoclonal antibody, anti-Bak (BD Biosciences, Pharmingen), or IgG1 isotype control for 20 minutes. The cells were then incubated with anti-mouse- or anti-rabbit-FITC antibodies (Immunotech) for 20 minutes, washed once in PBS, and resuspended in PBS–1% formaldehyde. The flow cytometric analysis was carried out as previously.

Immunoprecipitation and immunoblotting

Cells (10×10^6) were lysed in 1% CHAPS containing lysis buffer. Whole-cell lysates were obtained, precleared with Protein A Sepharose, and incubated overnight with 10 μg of the specific antibody. Immunocomplexes were

captured with Protein A Sepharose. The beads were pelleted, washed 3 times, and boiled in SDS sample buffer. The presence of immunocomplexes was determined by Western blot analyses, which were carried out as described previously (19).

RNA isolation and quantitative real-time PCR

RNA was isolated using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Amersham Biosciences). Quantitative PCR was carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a MX4000 instrument (Stratagene). Bcl-2 (Hs00608023_m1), Mcl-1 (Hs00172036_m1), and RPL37a (Hs01102345_m1) TaqMan gene expression assays were purchased from Applied Biosystems. The thermal cycling parameters used consisted of 50°C for 2 minutes for optimal AmpErase UNG activity and then 40 cycles of 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute. To control specificity of the amplified product, a melting curve analysis was carried out. No amplification of nonspecific product was observed. Amplification of the housekeeping gene *RPL37a* was conducted for each sample as an endogenous control.

siRNA

Mcl-1 and control siRNAs duplexes used were ON-TARGET plus siRNA pools of 4 oligos purchased from Dharmacon. One hundred picomoles of siRNA was mixed with 10^6 cells and electropected using the Amaxa Nucleofactor Apparatus (Amaxa). Two days after transfection, the cells were incubated for 24 hours with ABT-737. The gene-silencing effect was evaluated by Western blot analysis.

Results

Sensitivity of MCL cell lines to ABT-737

The sensitivity of MCL cell lines to ABT-737 was investigated in normal culture conditions. After a 24-hour treatment protocol, cell death was assessed using Apo 2.7 staining (Fig. 1A). MINO and GRANTA-519 were highly sensitive to ABT-737 with a lethal dose (LD)₅₀ of 25 and 80 nmol/L, respectively. In contrast, the 4 other MCL cell lines (JEKO-1, REC-1, UPN-1, and JVM-2) were resistant to ABT-737 [the median lethal dose (LD)₅₀ > 8 μ mol/L]. To determine the pathway by which ABT-737 induces apoptosis, the activation of caspases 9 and 3 was investigated. Cleavage of caspases 3 and 9 was detectable within 2 hours following treatment and was coupled to Bax and Bak activation, showing that apoptosis occurs via the intrinsic apoptotic pathway (Fig. 1B and C). Because ABT-737 selectively binds to antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-xL, but not Mcl-1, the respective expression level of these proteins was investigated by Western blot analysis (Fig. 1D). MINO and GRANTA-519 both showed high expression of Bcl-2 but low levels of Mcl-1 (a so-called Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} pro-

file). Interestingly, resistant MCL cell lines (JEKO-1, REC-1, UPN-1, and JVM-2) all expressed high Mcl-1 levels. In contrast, the level of Bcl-xL did not seem to be related to ABT-737 sensitivity. To confirm the correlation between sensitivity to ABT-737 and the Bcl-2/Mcl-1 profile, the mRNA levels of Bcl-2 and Mcl-1 for the 6 MCL cell lines using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were determined (Fig 1E). As observed at the protein level, sensitive MCL cell lines had high Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratios (3.4 and 10.2 for MINO and GRANTA-519, respectively), whereas resistant MCL cell lines had low Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratios (≤ 1).

Sensitivity of primary MCL cells to ABT-737

ABT-737-induced apoptosis was also evaluated in primary MCL tumor cells from 13 patients. Characteristics of patients are summarized in Supplementary Table. After 24 hours of ABT-737 treatment, cell death was quantified in the MCL cell compartment (CD19-positive cells), and a combined analysis of altered cellular morphology (lower FSC) was also carried out (Fig. 2A). ABT-737 induced apoptosis in MCL cells in 6 samples (with LD₅₀ values ranging from 15 to 150 nmol/L), whereas 7 samples were classified as resistant to ABT-737 (median LD₅₀ not reached). In 8 samples, the number of MCL cells was sufficient to evaluate Bcl-2 and Mcl-1 expression by Western blotting (Fig. 2B). As observed earlier in MCL cell lines, only Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} primary tumor cells were sensitive to ABT-737 and a high expression of Mcl-1 was consistently associated with resistance to ABT-737.

ABT-737 triggered a rapid disruption of Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes

To determine the mechanism of action of ABT-737, the constitution of Bcl-2 complexes and their dynamic upon short-time ABT-737 treatment were examined. For this purpose, Bcl-2 immunoprecipitations were realized after 2-hour ABT-737 treatment in the 2 sensitive cell lines. In untreated GRANTA-519 cells, Bcl-2 was associated with both the effector protein Bax and the BH3-only proteins Bim, Puma, and Bik (Fig. 3). In contrast to GRANTA-519, MINO does not express Bim. In MINO, endogenous Bcl-2 was mainly associated with Bax, Puma, and Bik. Of note, in both cells, no interaction between Bcl-2 and Bak was found (result not shown). In GRANTA-519 cells, an examination of Bcl-2 heterodimers after a 2-hour ABT-737 treatment showed a strong decrease of Bcl-2/Bax complexes and a very weaker decrease of both Bcl-2/Bik and Bcl-2/Puma complexes. Consistent with the strong decrease of Bcl-2/Bax complexes, there was an increase of Bax in the immunoprecipitate supernatant (Fig. 3). In ABT-737-treated MINO, an important decrease of both Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes were observed. Similarly to GRANTA-519, a weak decrease of Bcl-2/Puma complex was found. Finally, although no disruption of the Bcl-2/Bim complex was observed after short-time ABT-737 treatment in both cell lines, a longer treatment of 8 hours led to a partial

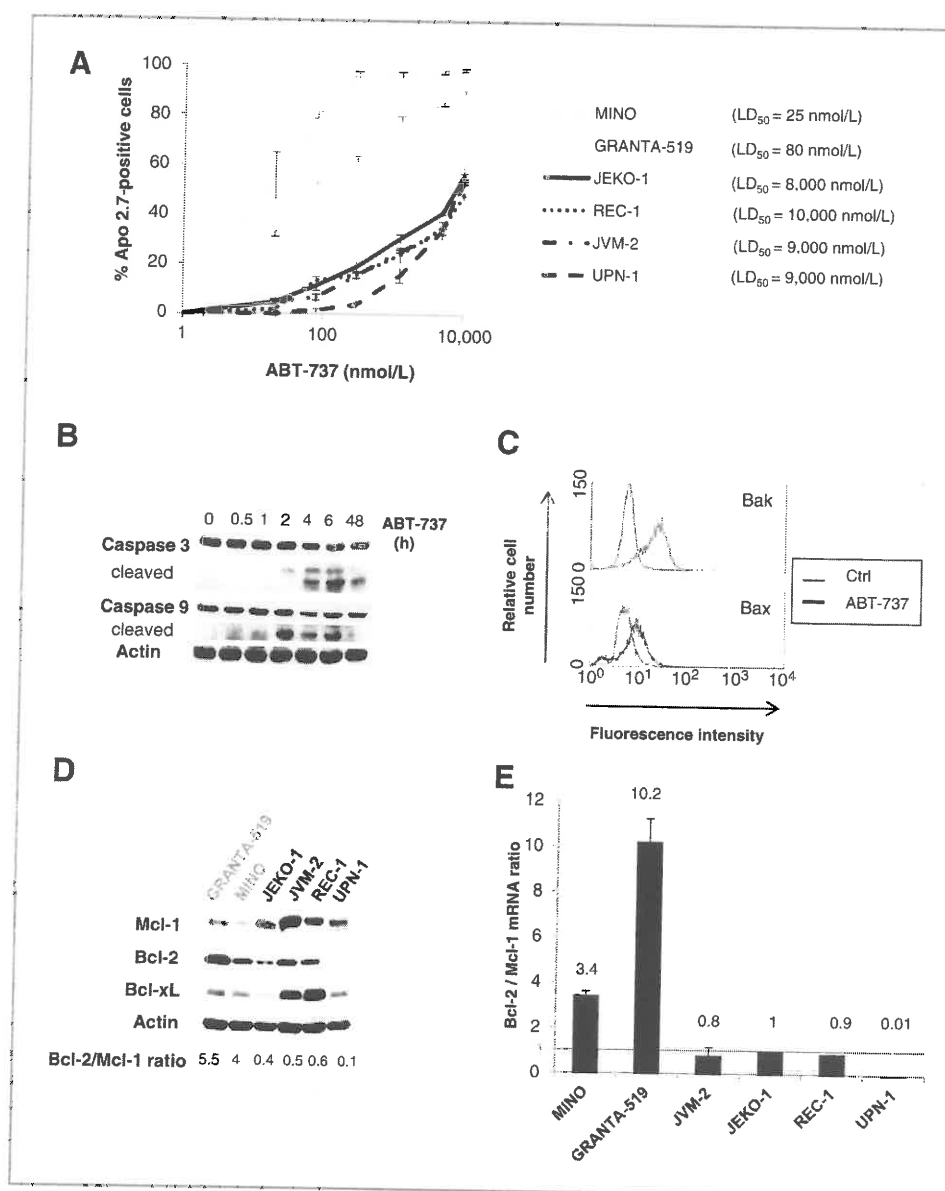


Figure 1. ABT-737 induces apoptosis in MCL cell lines and correlates with Bcl-2/Mcl-1 profile. **A**, sensitivity of MCL cell lines to ABT-737. Cells were cultured for 24 hours with increasing concentrations of ABT-737 (from 20 nmol/L to 20 μ mol/L). Cell death was quantified by Apo 2.7 staining. LD₅₀ is indicated for each cell line. Data represent means $\pm$ SD from 3 independent experiments. **B**, ABT-737 induces rapid apoptosis via the intrinsic pathway in sensitive MCL cell line MINO. MCL cell line MINO was cultured with 100 nmol/L ABT-737 as indicated. Immunoblot analysis of MINO lysate (70 μ g of protein) reveals the cleavage of caspases 9 and 3. Actin was used as a loading control. **C**, ABT-737 induces apoptosis via Bax and Bak activation. MINO cells were cultured for 24 hours with 100 nmol/L ABT-737. Bax and Bak activation was detected by flow cytometry. Ctrl, control. **D**, Bcl-2/Mcl-1 protein profile correlates with ABT-737 sensitivity. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and then electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were probed with the respective antibodies. Actin was included as a protein loading control. **E**, Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio correlates with ABT-737 sensitivity. Bcl-2 and Mcl-1 mRNA levels were measured by qRT-PCR at baseline and determined normalized according to JEKO-1 mRNA levels. Data represent means $\pm$ SD from 3 independent experiments.

disruption of Bcl-2/Bim complexes (data not shown). This last result is in agreement with the fact that Bim displayed the highest affinity for Bcl-2.

Mcl-1 protects MCL cells against ABT-737-induced apoptosis

In MCL cells, a high level of antiapoptotic protein Mcl-1 was observed in resistant cells, suggesting that Mcl-1 expression level might be associated with ABT-737 resistance. To investigate the specific role of Mcl-1 in ABT-737 resistance, Mcl-1 was silenced using RNA interference technology. After 48 hours of transfection with siMcl-1, a marked reduction of Mcl-1 level was observed (Fig. 4A). The knockdown of Mcl-1 sensitized both JEKO and JVM2 cells to ABT-737, showing that Mcl-1 level plays a major role in resistance to this drug (Fig. 4B). Thus, this result under-

scores the interest of drug combinations that downregulate Mcl-1 expression.

Combination of ABT-737 and flavopiridol overcomes the Mcl-1-associated resistance of MCL cells to ABT-737

Flavopiridol, a semisynthetic flavonoid, is known to inhibit mRNA transcription by inhibiting kinases that activate RNA polymerase II (20). Inhibition of Mcl-1 transcription by flavopiridol has been reported in chronic lymphoid leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM) cells (21, 22). ABT-737-resistant MCL cell lines were cultured with flavopiridol (250 nmol/L) for 24 hours. A drastic diminution of Mcl-1 protein level was observed, whereas neither Bcl-2 nor Bcl-xL levels were affected by flavopiridol exposure (Fig. 4C). Interestingly, the decrease

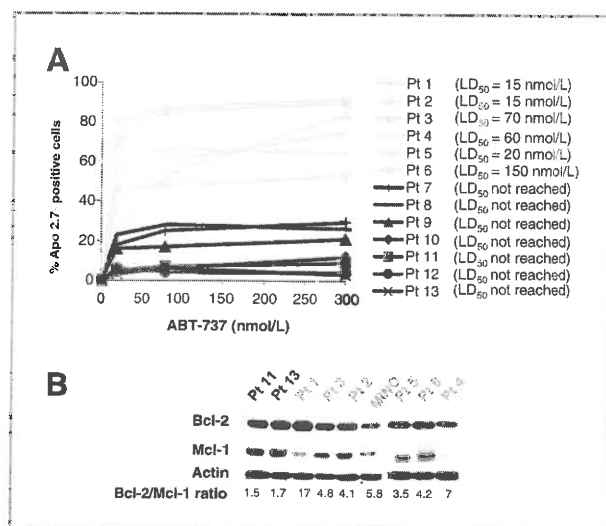


Figure 2. Sensitivity of MCL patient (Pt) samples to ABT-737. **A**, sensitivity of MCL patient samples to ABT-737. MCL cells from blood samples of 13 patients were cultured for 24 hours with different concentrations of ABT-737 (20, 80, 300, and 1,250 nmol/L). Cell death was quantified by fluorescence-activated cell-sorting analysis of Apo 2.7- and CD19-stained cells. **B**, Western blot analysis of Bcl-2 and Mcl-1 protein expression in MCL patient samples. CD19⁺ purified cell lysates were analyzed by immunoblotting with the respective antibodies. Actin was included as a protein loading control. Sensitive MCL samples (in gray) present high levels of Bcl-2 and low levels of Mcl-1 contrary to resistant MCL samples (in black) that express high levels of Mcl-1.

of Mcl-1 level occurred rapidly, after 2 hours, and became undetectable after 4 hours of treatment with flavopiridol. This decrease was observed prior to caspase 3 cleavage, which was detected only after 6 hours of treatment (Fig. 4D). Following 2 hours of flavopiridol exposure, qRT-PCR analysis confirmed a decrease in Mcl-1 mRNA levels for up to 90% (Fig. 4E). Taken together, these results show that Mcl-1 protein downregulation in flavopiridol-treated cells is not due to a caspase-dependant cleavage but occurs at the mRNA level. Because flavopiridol induces a rapid and strong caspase-independent downregulation of Mcl-1, we hypothesized that flavopiridol might overcome

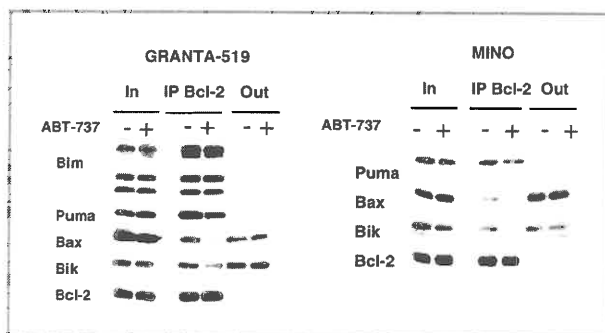


Figure 3. ABT-737 mainly disrupts Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes. Cells were treated with ABT-737 (100 nmol/L) for 2 hours, and cell extracts were subjected to immunoprecipitation with an anti-Bcl-2 antibody followed by immunoblotting analysis for the indicated antibodies. Nontreated cells were used as a control.

the putative Mcl-1-associated resistance to ABT-737. The 4 ABT-737-resistant MCL cell lines were then treated with suboptimal doses of ABT-737 or flavopiridol or a combination of both drugs. Cell viability was assessed after a 24-hour exposure (Fig. 4F). The measurement of induced apoptosis by the combination of ABT-737 plus flavopiridol shows a major synergistic effect with suboptimal doses of each drug, as shown by a combination index (CI) < 1 according to the Chou-Talalay method (23).

ABT-737 synergizes with ara-C or bortezomib in ABT-737-resistant MCL cell lines

ara-C and, more recently, bortezomib have been shown to be 2 important compounds in the treatment of MCL patients (24–26). ara-C exposure can induce a rapid decrease of Mcl-1 that occurs independently of caspase 3 (Fig. 5A). In contrast, bortezomib exposure does not modify Mcl-1 but induces a strong increase of the BH3-only Noxa protein (Fig. 5B). Interestingly, Noxa binds selectively to Mcl-1 and thus counteracts its antiapoptotic function (27). The same results were observed in JVM-2 cell line (data not shown). As observed with flavopiridol, a strong synergistic effect was measured (CI < 1 according to the Chou-Talalay method) when both compounds were combined with ABT-737 in resistant JEKO-1 and JVM-2 cell lines (Fig. 5C).

Discussion

The present study evaluated the antineoplastic activity of ABT-737 in MCL cells. It shows that MCL cells are quite heterogeneous with regard to their sensitivity to ABT-737 (with LD₅₀ values ranging >1,000 fold). Indeed, the less sensitive MCL cell lines show only limited induced apoptosis when exposed to high doses of ABT-737 (in the micromolar range), whereas the most sensitive lines undertake massive apoptosis after exposure to extremely low concentrations of ABT-737 (in the nanomolar range). Investigations conducted with fresh tumor cells from MCL patients have confirmed this finding and revealed that about half of the patient samples are highly sensitive to ABT-737 alone. Interestingly, the level of sensitivity in these samples is comparable with the one observed in sensitive MCL cell lines. Indeed, our results not only support the use of ABT-737 in MCL but also highlight the need for biological markers that could predict ABT-737 responsiveness.

The analysis of protein expression level in MCL cells reveals that the subset of highly sensitive MCL cells is consistently characterized by a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile. This is in accordance not only with the molecular mechanism of action of ABT-737 but also with previous studies conducted in other hematologic malignancies. Indeed, CLL cells have been reported to be extremely sensitive to ABT-737 and, like ABT-737-sensitive MCLs, express high levels of Bcl-2 but always low levels of Mcl-1 (11, 28). It is also interesting to note that ABT-737 induces apoptosis at a higher drug concentration (5–15 μmol/L) in MM cell lines, which are known to express high levels of Mcl-1 (29). Therefore, Mcl-1 expression level seems as a valuable

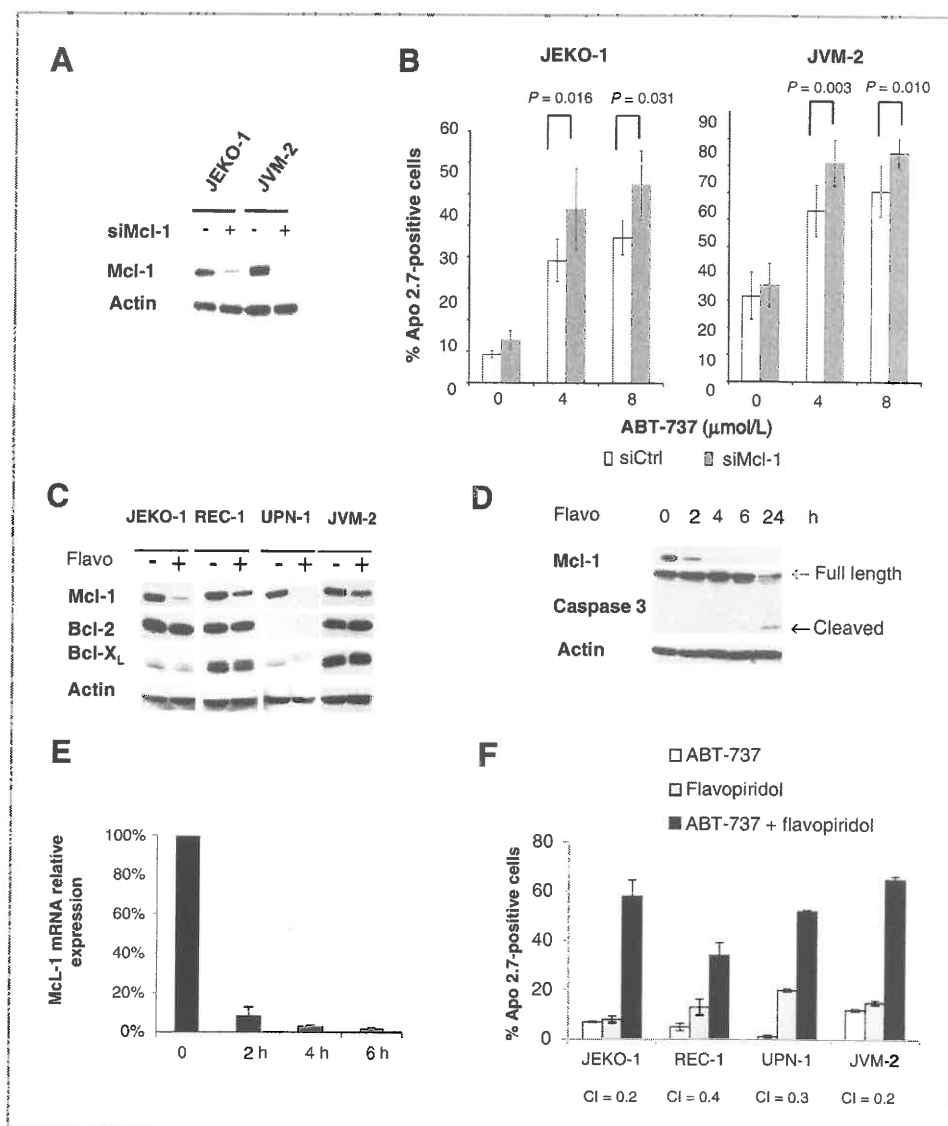
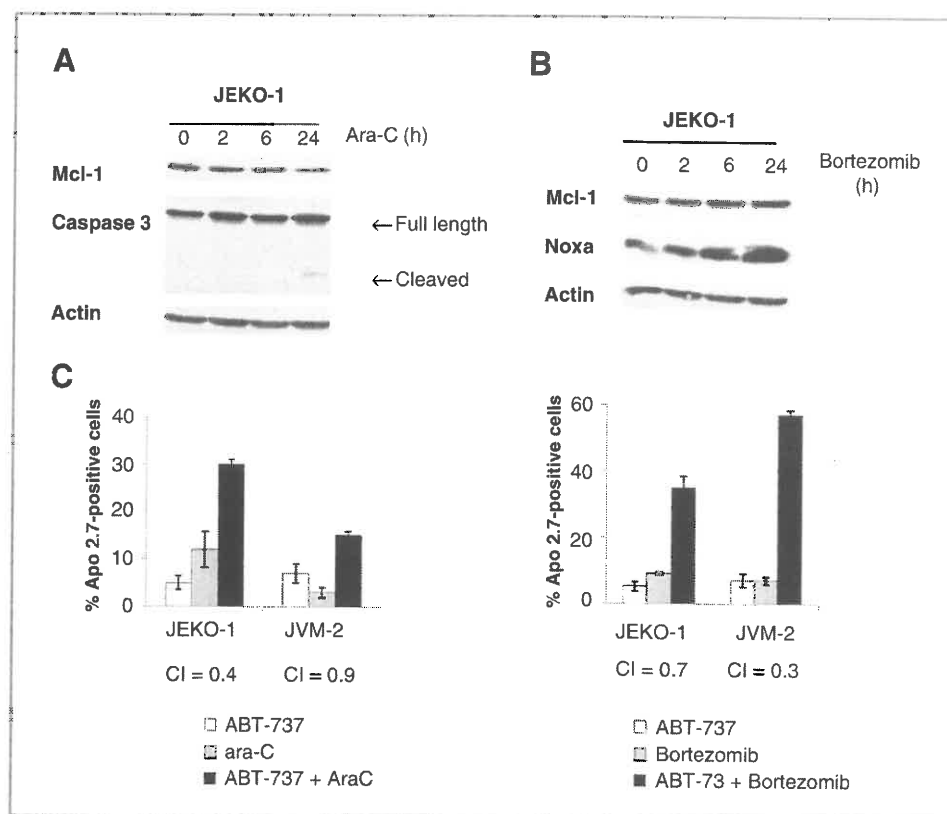


Figure 4. Flavopiridol (Flavo) induces a rapid downregulation of Mcl-1 at both the protein and mRNA levels and synergizes with ABT-737. **A** and **B**, Mcl-1 silencing sensitizes JEKO and JVM2 to ABT-737-induced apoptosis. MCL cells were transfected with either siControl (siCtrl) or siMcl-1. At 48 hours after transfection, cells were used to prepare cell lysates and Mcl-1 level was determined by immunoblotting (**A**). Transfected cells were treated with ABT-737 for 24 hours before being stained by Apo 2.7 and analyzed by flow cytometry (**B**). Results are means $\pm$ SD from at least 3 independent siRNA transfections. **C**, MCL cell lines resistant to ABT-737 were cultured for 24 hours with or without 250 nmol/L flavopiridol. Western blot analysis of Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-xL protein expression is shown. **D**, the MCL cell line JEKO-1 was cultured for 2, 4, 6, and 24 hours with 500 nmol/L flavopiridol. Western blot analysis of Mcl-1 and caspase 3 proteins is shown. **E**, Mcl-1 mRNA level was measured by qRT-PCR at baseline and after 2, 4, and 6 hours of treatment with flavopiridol (500 nmol/L) in JEKO-1. **F**, effect of combining ABT-737 and flavopiridol in ABT-737-resistant cell lines. ABT-737-resistant MCL cell lines were cultured for 24 hours with the indicated drugs. In all experiments, drugs were added simultaneously. Cell death was quantified using Apo 2.7 staining. Suboptimal concentrations of ABT-737 (150 nmol/L) and flavopiridol (250 nmol/L for JEKO-1, REC-1, and JVM-2 and 150 nmol/L for UPN-1) were used. Synergy was confirmed by $CI < 1$ according to the Chou-Talalay method. Data represent means $\pm$ SD from 3 independent experiments.

biomarker regardless of both the level of Bcl-2 (12–14) and the nature of the tumor cell. Indeed, several studies and ours have identified a uniform profile ($Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low}$) for ABT-737-sensitive cells. Therefore, both biomarker profiling ($Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low}$ and Mcl-1 levels) could be used to predict responses to ABT-737 exposure. These biomarkers are of major interest for future targeted therapies using ABT-737 alone in MCL.

Because half of the MCL samples did not undergo apoptosis in the presence of ABT-737 alone and because our findings show that the silencing of Mcl-1 overcomes ABT-737 resistance, the second part of the present work was devoted to investigate strategies that may overcome MCL resistance to ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression. We observe that the level of Mcl-1 protein is highly variable from one patient to another and from one MCL cell line to

Figure 5. ABT-737 synergizes with bortezomib and cytarabine in ABT-737-resistant cell lines. **A**, effect of ara-C on Mcl-1 expression. JEKO-1 was cultured for 2, 6, and 24 hours with 20 ng/mL ara-C. Western blot analysis of Mcl-1 and caspase 3 expression is shown. **B**, effect of bortezomib on Noxa expression. JEKO-1 was cultured for 2, 6, and 24 hours with 10 nmol/L bortezomib. Western blot analysis of Mcl-1 and Noxa protein expression is shown. **C**, ABT-737-resistant MCL cell lines JEKO-1 and JVM-2 were cultured for 24 hours with the indicated drugs. Suboptimal concentrations of ABT-737 (150 nmol/L), bortezomib (10 nmol/L), and ara-C (20 ng/mL for JEKO-1 and 80 ng/mL for JVM-2) were used. Death was quantified using Apo 2.7 staining. Synergy was shown by a $CI < 1$ according to the Chou-Talalay method. Data represent means $\pm$ SD from 3 independent experiments.



another. As reported by Khoury and colleagues, high Mcl-1 expression level has been associated with a more aggressive biological behavior of the MCL cells (30). More recently, Perez-Galan and colleagues reported that Mcl-1 is also involved in bortezomib resistance in MCL cells (27). Flavopiridol is known to effectively inhibit Mcl-1 transcription in CLL and MM (21, 22). In MCL, flavopiridol was reported to induce apoptosis (31). Therefore, flavopiridol is currently under investigation for treatment of several hematologic malignancies including both CLL and MCL (32–34). Our investigation confirms that flavopiridol downregulates Mcl-1 at both the mRNA and protein levels in MCL cells and shows a highly synergistic apoptotic effect when combined with ABT-737 in ABT-737-resistant cell lines. The effectiveness of combining ABT-737 with compounds that inactivate Mcl-1 firmly establishes the validity of such a therapeutic approach in the treatment of MCL (12, 35–37). A similar synergistic effect is measured when ABT-737 is combined with ara-C, which is a heavily prescribed drug in the treatment of MCL (24, 38, 39). As reported with flavopiridol, ara-C induces Mcl-1 downregulation at the mRNA level (40). Of note, the regulation of Noxa protein expression level was not significantly modified under both combinations (data not shown). Thus, both flavopiridol and ara-C, which decrease Mcl-1 expression, seem to be promising supplements in ABT-737 therapy of patients presenting high Mcl-1 levels. A second investigated strategy to overcome Mcl-1 is to modify Mcl-1 complexes and its

protein network. Bortezomib is among the most promising compounds in the treatment of MCL (25). Interestingly, the mixture of ABT-737 with bortezomib shows a synergistic effect, although no decrease of Mcl-1 protein expression is observed in the presence of bortezomib for up to 24 hours. Among the various proapoptotic effects of bortezomib, one involves the drastic increase of Noxa, a BH-3-only protein that is known to specifically interact with Mcl-1 (41). The upregulation of Noxa leads to an increase of Noxa/Mcl-1 heterodimers. Thus, it counteracts the antiapoptotic role of Mcl-1 and then Mcl-1 fails to protect cells from apoptosis (27). Taken together, our results show that several strategies might be used to overcome ABT-737 resistance. One would be to include compounds that decrease Mcl-1 expression (such as ABT-737 treatment in combination with flavopiridol or ara-C) and another approach would be to inhibit Mcl-1 antiapoptotic action by increasing Noxa expression using bortezomib. Recent publications suggested that ABT-737 exposure might enhance Mcl-1 upregulation, leading to ABT-737 resistance (36, 42). This putative role played by ABT-737 as a Mcl-1 upregulator further enhances the potential of Mcl-1-targeted therapy used in combination with ABT-737.

In MCL-sensitive cells, our findings show that short exposure to ABT-737 induces a rapid disruption of both Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes. Bax is a multidomain proapoptotic protein that permeabilizes the outer mitochondria membrane leading to cytochrome C release,

whereas Bik is a sensitizer BH3-only protein. The major impact of the dissociation between Bcl-2 and Bax in ABT-737-induced apoptosis in MCL is in agreement with the work from van Delft and colleagues (14). In contrast, Bcl-2/Bim and Bcl-2/Puma complexes are weakly affected by ABT-737, which could be explained by their high affinity to Bcl-2 (9). In contrast, we did not observe a correlation between Bcl-xL expression level and response to ABT-737 in MCL.

The present work strongly supports the use of ABT-737 in MCL and opens the window for selected ABT-737-tailored therapies that use biomarkers that are able to predict patient responses. Indeed, MCL patients presenting a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile may be good candidates for ABT-737 monotherapy, whereas ABT-737 combined with a Mcl-1-targeted therapy (such as flavopiridol, ara-C, or bortezomib) would be more appropriate for MCL patients with high Mcl-1 levels. These biomarkers are easily assessed prior to treatment induction. In our experiments, Bcl-2 and Mcl-1 protein level assessment is a powerful tool to determine Bcl-2/Mcl-1 patient profiles, but other methods such as flow cytometric or quantitative PCR analysis could also evaluate these markers effectively. The unique mechanism of action of ABT-737 offers the opportunity to treat patients by using a targeted therapy based on their Bcl-2/Mcl-1 profile in tumor cells. The present investigation provides the biological rationale for these future clinical trials to evaluate ABT-737 alone or in combination

with Mcl-1-reducing agents in MCL patients. Indeed, ABT-263 (navitoclax; Abbott), which is an orally bioavailable BH3-mimetic compound of the same class as ABT-737 and currently under investigation in hematologic and solid malignancies, could also be used as ABT-737 (13, 43–46).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

C. Touzeau, M. Amiot, and S. Le Gouill designed the research and wrote the manuscript. C. Touzeau and C. Dousset carried out the experiments. C. Touzeau, M. Amiot, S. Le Gouill, C. Dousset, L. Bodet, P. Gomez-Bougie, S. Bonnaud, and C. Pellat-Deceunynck analyzed the data. S. Le Gouill, P. Moreau, and A. Moreau provided patient samples and clinical data.

Grant Support

This study is supported by Région Pays de la Loire (France), the INCa PAIR lymphoma grant, and the Ligue Régionale Grand-Ouest contre le Cancer. C. Touzeau is supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

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.

Received April 13, 2011; revised July 12, 2011; accepted July 26, 2011; published OnlineFirst August 5, 2011.

References

- Zhou Y, Wang H, Fang W, Romaguer JE, Zhang Y, Delasalle KB, et al. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer* 2008;113:791–8.
- Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, Brittinger G, Engelhard M, Meusers P, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:511–8.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750–62.
- Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2010;117:26–38.
- Ek S, Hogerkorpe CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res* 2002;62:4398–405.
- Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, Wachsmann W, Pinkus GS, Said JW, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 2001;98:787–94.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205–19.
- Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the proapoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002;9:505–12.
- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006;9:351–65.
- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;435:677–81.
- Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, 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.
- Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X, Li L, Zakula DM, Vernetti LA, et al. 'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Oncogene* 2007;26:3972–9.
- Tahir SK, Wass J, Joseph MK, Devanarayan V, Hessler P, Zhang H, et al. Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2010;9:545–57.
- van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006;10:389–99.
- Del Gaizo Moore V, Schlis KD, Sallan SE, Armstrong SA, Letai A. BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008;111:2300–9.
- Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007;12:171–85.
- Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2006;10:375–88.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Gomez-Bougie P, Bataille R, Amiot M. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol* 2004;34:3156–64.
- Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltman JM, et al. Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the

- mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2001;2:RESEARCH0041.
21. Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 2005;106:2513-9.
 22. Gojo I, Zhang B, Fenton RG. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* 2002;8:3527-38.
 23. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010;70:440-6.
 24. de Guibert S, Jaccard A, Bernard M, Turlure P, Bordessoule D, Lamy T. Rituximab and DHAP followed by intensive therapy with autologous stem-cell transplantation as first-line therapy for mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2006;91:425-6.
 25. Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, et al. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol* 2009;20:520-5.
 26. Gressin R, Caulet-Maugendre S, Deconinck E, Tournilhac O, Gyan E, Moles MP, et al. Evaluation of the (R)VAD+C regimen for the treatment of newly diagnosed mantle cell lymphoma. Combined results of two prospective phase II trials from the French GOELAMS group. *Haematologica* 2010;95:1350-7.
 27. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006;107:257-64.
 28. Le Carrouer T, Assou S, Tondeur S, Lhermitte L, Lamb N, Reme T, et al. Amazonia!: an online resource to Google and visualize public human whole genome expression data. *Open Bioinfo J* 2010;4:5-10.
 29. Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Lust JA, et al. ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 2007;21:1549-60.
 30. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, McDonnell TJ, Abruzzo LV, Lai R. Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *J Pathol* 2003;199:90-7.
 31. Venkataraman G, Maududi T, Ozpuyan F, Bahar HI, Izban KF, Qin JZ, et al. Induction of apoptosis and down regulation of cell cycle proteins in mantle cell lymphoma by flavopiridol treatment. *Leuk Res* 2006;30:1377-84.
 32. Kouroukis CT, Belch A, Crump M, Eisenhauer E, Gascoyne RD, Meyer R, et al. Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003;21:1740-5.
 33. Lin TS, Blum KA, Fischer DB, Mitchell SM, Ruppert AS, Porcu P, et al. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* 2010;28:418-23.
 34. Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ, Fischer B, Heerema NA, Andritsos LA, et al. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol* 2009;27:6012-8.
 35. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* 2007;67:782-91.
 36. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 2010;52:1310-21.
 37. Xu H, Krystal GW. Actinomycin D decreases Mcl-1 expression and acts synergistically with ABT-737 against small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2010;16:4392-400.
 38. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with *in vivo*-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 2008;112:2687-93.
 39. Lefrere F, Delmer A, Levy V, Delarue R, Varet B, Hermine O. Sequential chemotherapy regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update of a prospective study. *Haematologica* 2004;89:1275-6.
 40. de Vries JF, Falkenburg JH, Willemze R, Barge RM. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2006;91:912-9.
 41. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JL, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005;17:393-403.
 42. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 2010;115:3304-13.
 43. Ackler S, Mitten MJ, Foster K, Oleksijew A, Refici M, Tahir SK, et al. The Bcl-2 inhibitor ABT-263 enhances the response of multiple chemotherapeutic regimens in hematologic tumors *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:869-80.
 44. Gandhi L, Camidge DR, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi P, Gandara D, Khaira D, et al. Phase I study of navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2011;29:909-16.
 45. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008;68:3421-8.
 46. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity. *Lancet Oncol* 2010;11:1149-59.

Supplemental Table.

Patient	Age	Disease status	Blastic variant	MCL cells source	% of CD19+CD5+ cells in MNC
Pt1	81	De novo	-	Blood	75
Pt2	80	Relapse	-	Blood	70
Pt 3	80	De novo	-	Blood	30
Pt4	69	Relapse	-	Blood	50
Pt5	70	De novo	-	Blood	65
Pt6	73	Relapse	-	Blood	90
Pt7	55	Relapse	+	Ascitis	45
Pt8	89	De novo	-	Blood	85
Pt9	80	De novo	+	Blood	80
Pt10	66	De novo	-	Blood	65
Pt11	53	De novo	-	Blood	80
Pt12	83	De novo	-	Blood	95
Pt13	79	De novo	-	Blood	55

ARTICLE 2 : L'ABT-199, molécule BH3 mimétique Bcl-2 spécifique, une drogue prometteuse pour les patients atteints de myélome multiple avec translocation t(11 ;14)

Le développement de l'ABT-737 ayant été limité par la toxicité plaquettaire liée à l'inhibition de Bcl-X_L, un nouveau BH3 mimétique ciblant spécifiquement Bcl-2, l'ABT-199, a été développé. Dans ce travail, la sensibilité à l'ABT-199 d'un panel de lignées tumorales de MM représentatif de l'hétérogénéité retrouvée chez les patients a été analysée. Nous avons pu ainsi démontrer que la sensibilité à l'ABT-199 était restreinte aux lignées de MM présentant une translocation t(11,14). L'ABT-199 ciblant Bcl-2 mais ni Bcl-xL ni Mcl-1, la sensibilité à cette molécule a été corrélée à l'expression de ces protéines anti-apoptotiques. Le ratio d'ARN Bcl-2 / Mcl-1 mesuré par PCR quantitative s'est avéré le facteur le plus puissant pour prédire la sensibilité à l'ABT-199. Le rôle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-199 a été confirmé par technique de SiRNA, montrant que l'extinction de l'expression de Mcl-1 restaurait la sensibilité à l'ABT-199 des lignées résistantes. Par technique d'immuno-précipitation, nous avons ensuite démontré que l'ABT-199 dissocie les complexes Bcl-2/BH3only, et non Bcl-xL/BH3only, confirmant ainsi la spécificité anti Bcl-2 de cette molécule. Enfin, la sensibilité à l'ABT-199 de cellules tumorales provenant de 15 patients atteints de myélome a également pu être analysée. Ces résultats sur cellules primaires ont confirmé les données obtenues sur lignées car les 4 échantillons trouvés sensibles à l'ABT-199 présentaient tous une translocation t(11,14). L'ensemble de ces données supporte l'utilisation de l'ABT-199 pour seulement un sous-groupe de patients atteints de myélome, appartenant principalement aux groupes des patients avec translocation t(11 ;14). Le ratio Bcl-2/Mcl-1 déterminé par PCR quantitative semble un bon bio-marqueur pour prédire la sensibilité *in vitro* à l'ABT-199.

- immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; **67**: 7450–7457.
- 11 Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K *et al.* Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methyl-pyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004; **47**: 6658–6661.
- 12 Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV *et al.* Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 2007; **110**: 4055–4063.
- 13 Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F *et al.* Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia* 2009; **23**: 1398–1405.
- 14 Kreutzman A, Ladell K, Koechel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L *et al.* Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus reactivation. *Leukemia* 2011; **25**: 1587–1597.
- 15 D'Asaro M, La Mendola C, Di Liberto D, Orlando V, Todaro M, Spina M *et al.* V gamma 9V delta 2T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *J Immunol* 2010; **184**: 3260–3268.

OPEN

The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma

Leukemia (2014) **28**, 210–212; doi:10.1038/leu.2013.216

Despite recent advances in the treatment of multiple myeloma (MM), including proteasome inhibitors and immunomodulatory agents, patients invariably relapse and alternative treatment strategies are urgently needed. Bcl-2 inhibitors such as ABT-737 and ABT-263 (navitoclax), which target specifically anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-x_L, bring new hope for therapy.¹ We recently demonstrated that ABT-737 induces apoptotic cell death in a sub-group of MM at low nanomolar concentration (<150 nM).² This sub-group of MM can be identified by its high Bcl-2/Mcl-1 Affymetrix gene expression ratio indicating that the expression level of Bcl-2 versus Mcl-1 mainly determines the susceptibility of myeloma cells to ABT-737 as previously

demonstrated in other hematopoietic cells.³ In addition, we have shown that Mcl-1 silencing strongly increases the sensitivity to ABT-737 of MM cells, highlighting the essential role of Mcl-1 in ABT-737 resistance. Although the orally active navitoclax has entered clinical trials and shown activity in hematological malignancies that are believed to be Bcl-2 dependent, the efficacy of this agent is limited by the thrombocytopenia caused by Bcl-x_L inhibition.⁴ To overcome this dose-limiting toxicity, ABT-199, the first-in-class orally bioavailable Bcl-2-selective BH3 mimetic, has been developed. Notably, it was reported that selective inhibition of Bcl-2 by ABT-199 demonstrated weak activity *ex vivo* on platelets.⁵ These data were further extended to clinical observations. Indeed, ABT-199 showed promising antitumor activity while sparing platelets in chronic lymphoid leukemia patients.⁵ Moreover, in a mouse

Table 1. ABT-199 sensitivity of primary myeloma cells

Patient	Patients characteristics				ABT-199 sensitivity		FISH analysis			Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio
	Age	Disease	Isotype	Disease Status	% apoptotic cells (100 nM)	LD ₅₀ < 100 nM	t(11;14)	t(4;14)	del 17	
#1	40	MM	I	Diag	21	No	+	—	—	0.10
#2	80	MM	A k	Rel	12	No	—	+	—	NA
#3	65	pPCL	I	Diag	<5	No	—	—	—	1.63
#4	49	pPCL	NA	Diag	40	No	—	+	—	0.62
#5	57	MM	G k	Rel	64	Yes	+	—	—	NA
#6	64	MM	G k	Diag	16	No	—	+	—	0.87
#7	38	MM	k	Diag	70	Yes	+	—	—	1.91
#8	80	MM	NA	Diag	15	No	—	—	—	0.46
#9	52	MM	G k	Rel	12	No	—	—	+	0.90
#10	45	MM	G k	Diag	91	Yes	+	—	—	6.69
#11	76	MM	NA	Rel	35	No	—	+	—	0.15
#12	70	sPCL	A k	Rel	<5	No	—	—	—	NA
#13	71	pPCL	NA	Diag	87	Yes	+	—	+	NA
#14	27	pPCL	A I	Diag	<5	No	—	—	—	NA
#15	74	MM	A I	Diag	<5	No	—	—	—	NA

Abbreviations: Diag, diagnosis; F, female; k, kappa; I, lambda; LD: lethal dose; M, male; MM, multiple; NA, data not available; PCL, plasma cell leukemia; pPCL, primary plasma cell leukemia; Rel, relapse. Plasma cells were obtained after gradient density centrifugation on Ficoll Hypaque and purification with CD138-immunomagnetic beads. Blood or bone marrow samples were obtained after informed consent from 15 patients with a diagnosis of de novo or relapsed MM according to standard criteria. Plasma cells were cultured with increasing doses of ABT-199 during 18 h. Cell death was assessed by APO 2.7 staining. The relative expression of Bcl-2 and Mcl-1 mRNA was defined on purified CD138-positive plasma cells as described above for HMCLs and Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio was indicated.

model, ABT-199 also demonstrated *in vivo* efficacy against aggressive lymphoma without provoking thrombocytopenia.⁶

In the present study, the apoptotic efficiency of ABT-199 was evaluated in both human multiple myeloma cell lines (HMCLs) and primary myeloma cells.

Sensitivity of ABT-199 was first analyzed across a collection of 25 HMCLs reflecting the molecular heterogeneity found in MM patients. These included non-14q32 translocated or non-recurrent translocated lines along with those harboring a translocation in MMSET, c-MAF or MAFB, or CCND1.⁷ We found that high sensitivity to ABT-199 was restricted to HMCLs with the CCND1 translocation (Figure 1a). Indeed, six out of eight CCND1 cell lines were efficiently killed by ABT-199 with a median LD₅₀ value of 10 nM (ranging from 5–80 nM). Comparison of CCND1 cell lines sensitivity targeted by ABT-737² and ABT-199 revealed a similar specificity. However, the efficiency of ABT-199-induced cell killing was always superior to that of ABT-737, as indicated by decreased LD₅₀ values (Figure 1b). It is of particular interest to note that sensitive CCND1 cell lines harbor an abnormal p53 (Figure 1a), indicating that ABT-199-induced cell death is independent of the p53 status.

Furthermore, we identified two cell lines (NAN-1 and RPMI-8226) belonging to the MAF subgroup that show an intermediate sensitivity (LD₅₀ between 100 nM and 1 μ M) to ABT-199, whereas none have intermediate sensitivity to ABT-737 (≤ 1 μ M). Finally, comparison of LD₅₀ values demonstrated that the cellular potency of ABT-199 is equal to or greater than that of ABT-737 in all the tested HMCLs (Figure 1b). Of note, the median ABT-199 LD₅₀ of sensitive HMCLs was significantly lower than that of peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy donors (10 vs 200 nM, $P=0.001$) (Supplementary Figure 1).

Characterization of the selectivity of ABT-199 for Bcl-2 has been evidenced by its affinity for Bcl-2 ($K_i < 0.010$ nM) in contrast to that for Bcl-x_L ($K_i = 0.48$ nM).⁵ To confirm the selective killing of ABT-199 in a MM cellular context, we analyzed the capacity of ABT-199 to disrupt BH3-only/Bcl-2 complexes versus BH3-only/Bcl-x_L complexes by immunoprecipitation (Figure 1c). For this purpose, the Karpas 620 CCND1 line was selected for its high Bcl-x_L expression. Puma and Bim were found associated with both Bcl-2 and Bcl-x_L in this cell line. After 6 h of ABT-199 treatment (25 nM), Puma/Bcl-2 and Bim/Bcl-2 complexes were disrupted in contrast to the Bcl-x_L heterodimers that were not modified (Figure 1c). Altogether, immunoprecipitation data confirm the ability of ABT-199 to only bind the Bcl-2 hydrophobic groove according to its strong affinity for Bcl-2.

Sensitivity to ABT-199 was significantly associated with higher expression of Bcl-2 ($P=0.008$) and tended to be associated with a lower Mcl-1 expression ($P=0.09$) (Supplementary Figure 2). However, the Bcl-2/Mcl-1 ratio was the most powerful biomarker for predicting ABT-199 sensitivity in this panel of HMCLs ($P=0.002$) (Figure 1d). Median ratios were 6.06 (range 4.47–121) and 1 (range 0.18–3) for sensitive and resistant cell lines, respectively. Quantifying the Bcl-2/Mcl-1 ratio by RT-PCR therefore provides a strong predictive marker for ABT-199 sensitivity. This clearly suggests a strong involvement of Mcl-1 in ABT-199 resistance. To confirm the role of Mcl-1 in ABT-199 resistance, siRNA against Mcl-1 was transfected into LP1 cells, leading to a complete downregulation of Mcl-1 (Figure 1e). Mcl-1 silencing resulted in a moderate induction of apoptosis in LP1 cells but highly sensitized these cells to low doses of ABT-199 ($P=0.0014$), indicating that Mcl-1 can confer ABT-199 resistance, as previously demonstrated for ABT-737.²

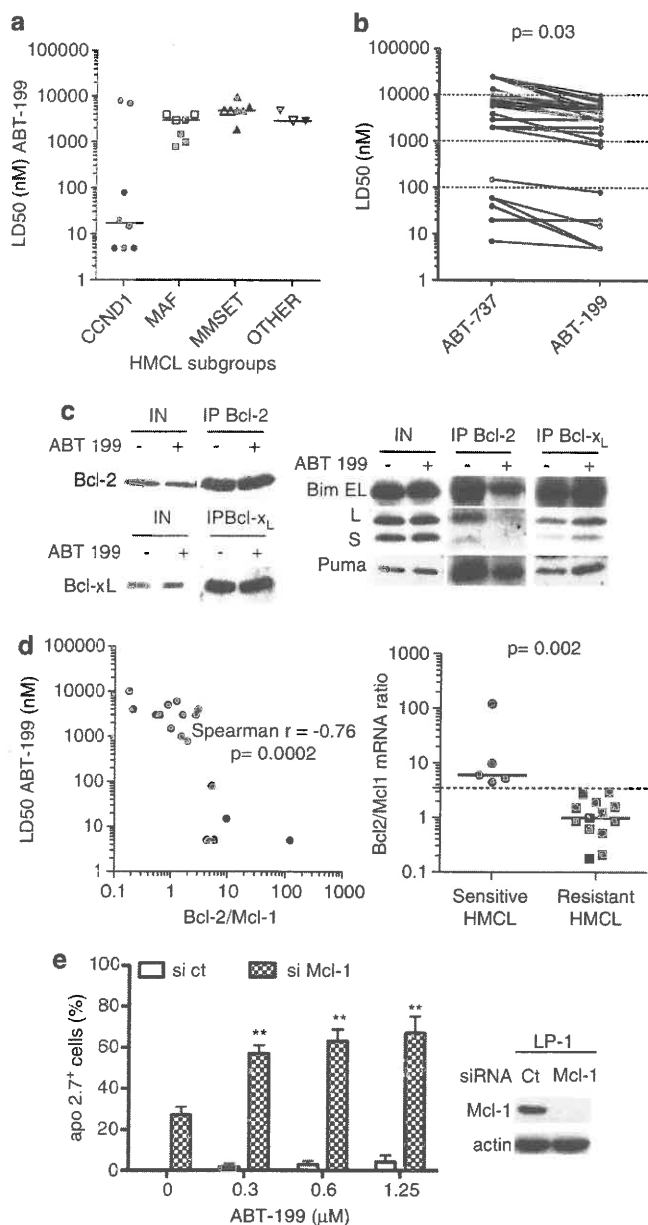


Figure 1. (a) Sensitivity to ABT-199 of HMCLs according to different molecular subgroups. (b) Sensitivity of HMCLs to ABT-199 compared to ABT-737. P -value was determined using Mann-Whitney test. For a and b, 25 HMCLs (respectively 8 CCND1 (KMS-12-PE, KMS-12-BM, SKMM-2, Karpas 620, U-266, XG-1, XG-5, NAN-7), 7 MAF (JUN-3, MM.1S, L-363, RPMI 8266, XG-6, BCN, NAN-1), 7 MMSET (JIM-3, LP-1, OPM-2, NCI-H929, KMS-11, XG-7, NAN-3)) and 3 non recurrent translocation (XG-2, KMM-1, AMO1)) cell lines were cultured with increasing doses of ABT-199 or ABT-737 during 48 h. Cell death was assessed by APO 2.7 staining. LD₅₀ was determined for each cell line. White symbols indicate wild-type P53 HMCL and black symbols indicate abnormal P53 HMCL (c) ABT-199 disrupts BH3-only/Bcl-2 heterodimers but not BH3-only/Bcl-x_L heterodimers. Karpas 620 were treated or not for 6 h with 25 nM ABT-199. Lysate (600 μ g) and immunoprecipitation were done as previously described² using the indicated antibodies. The immunoprecipitates were analyzed for the presence of BH3-only. (d) The Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio discriminates cell lines sensitive or resistant to ABT-199. Quantitative PCR was performed using the following TaqMan probes (BCL2 (Hs00608023_m1), MCL1 (Hs00172036_m1) and RPL37a (Hs01102345_m1). The relative expression of Bcl-2 and Mcl-1 mRNA was calculated according to the equation of Pfaffl and normalized to JJN3 cell line. Sensitive HMCL were defined by a LD₅₀ inferior to 100 nM. P -value was determined using Mann-Whitney test. (e) The LP-1 cell line was transfected with either si Control (Ct) or si Mcl-1. Following 48 h transfection, the protein level of Mcl-1 was assessed by immunoblotting, and cells were treated with ABT-199 for a further 48 h. Cell death was quantified by APO 2.7 staining. P -value was determined using paired Student's t -test. ** $P < 0.008$.

In order to translate our findings in cell lines to human tumor cells, ABT-199 sensitivity was evaluated against 15 primary samples from patients with MM. Patient characteristics are summarized in Table 1. After 24 h, ABT-199 treatment (10, 100 and 1000 nM) resulted in cell death that was quantified by flow cytometry using a combined analysis of the loss of CD138 and alteration of cellular morphology (lower FCS). As for HMCLs, we observed a considerable variability in the sensitivity to ABT-199 among patient samples. Four patient samples, three of which were either *de novo* MM ($n=2$), plasma cell leukemia ($n=1$) or relapse ($n=1$), were found to be highly sensitive to ABT-199 with a $LD_{50} < 100$ nM (Table 1).

As ABT-199-sensitive HMCLs were restricted to the CCND1 subgroup, a FISH analysis of the t(11;14) translocation was undertaken. Analyses for t(4;14) and del(17p) were also undertaken due to their high clinical significance. Of major interest, we found that four of five patients who bore a CCND1 translocation were sensitive to ABT-199, confirming that ABT-199 sensitivity is related to specific genetic subtypes. Furthermore, the Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio could be determined in eight patients. The median Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio was 4.3 (range, 1.91–6.69) for ABT-199 sensitive patients and 0.62 (range, 0.10–1.63) for ABT-199 resistant patients. Owing to the low number of patients, this difference does not reach statistical significance. Nevertheless, the results obtained using patient samples are consistent with our initial observations made in cultured myeloma cell lines and indicate that patients with a specific molecular subtype and a high Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratio are particularly sensitive to ABT-199. While the t(11;14) group of patients is considered neutral with regard to prognosis, t(11;14) primary plasma cell leukemia (pPCL) presents an aggressive prognosis, suggesting that innovative approaches should be a priority for these patients. ABT-199 mono-therapy could represent a very interesting opportunity for the clinical management of pPCL.

Finally, del(17p) is universally associated with poor prognosis, mainly related to a defect of the TP53 pathway, because TP53 mutations are exclusively associated with del(17p) in MM.⁸ Of interest, one t(11;14) patient who also harbored a 17p deletion was found to be highly sensitive to ABT-199, indicating that ABT-199 is able to overcome the poor prognostic impact of del(17p) of t(11;14) patients. Again, this result is in accordance with the fact that most CCND1 HMCLs, which also express abnormal TP53, are still sensitive to ABT-199. Recent studies addressing the characteristics of pPCL indicate a higher incidence of del(17p) in pPCL versus MM.^{9,10} Thus, the increase of the incidence of both t(11;14) and del(17p) in pPCL makes these patients especially attractive candidates for targeted therapy with ABT-199.

Our data demonstrate that ABT-199-induced lethality is restricted to a specific MM subtype and underscores the conclusion that MM should no longer be considered a single entity. Innovative targeted therapies should be developed with the aim of treating specific molecular subtypes. The clinical development of single-agent ABT-199 therapy in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas has thus far demonstrated a favorable toxicity profile and an impressive antitumor activity.^{5,11} Based on these promising clinical data, as well as our preclinical data, a phase I trial is ongoing in relapsed MM patients. The integration of comprehensive genetic studies and Bcl-2 family gene expression profiling will hopefully allow us to validate ABT-199 monotherapy as an effective targeted therapy for both t(11;14) MM and pPCL.

CONFLICT OF INTEREST

JDL and AJS are employees of Abbvie. DS is employee of Genentech, a member of the Roche Group. The remaining authors declare no conflict of interest.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nadège Gouy for her assistance with FISH analysis. We thank Abbvie for supporting in part this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CT, CD and SM performed experiments and analyzed data. DS, JDL, AJS analyzed the data. MCB and PM collected patients' samples and performed FISH experiments. CT, SLG, CP, MA designed the study. CT, SLG, JDL and MA wrote the manuscript. All authors critically reviewed and edited the paper.

C Touzeau^{1,2,3,4}, C Dousset^{1,2,3,5}, S Le Gouill^{1,2,3,4,5}, D Sampath⁶, JD Levenson⁷, AJ Souers⁷, S Maïga^{1,2,3}, MC Béné⁸, P Moreau^{1,2,4,5}, C Pellat-Deceunynck^{1,2,3} and M Amiot^{1,2,3}
¹INSERM, UMR892, Nantes, France;
²Université de Nantes, Nantes, France;
³CNRS, UMR 6299, Nantes, France;
⁴Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France;
⁵CIC, INSERM, Nantes, France;
⁶Department of Translational Oncology, Genentech, South San Francisco, CA, USA;
⁷Abbvie Inc., North Chicago, IL, USA and
⁸Service d'Hématologie-biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France
E-mail: martine.amiot@inserm.fr

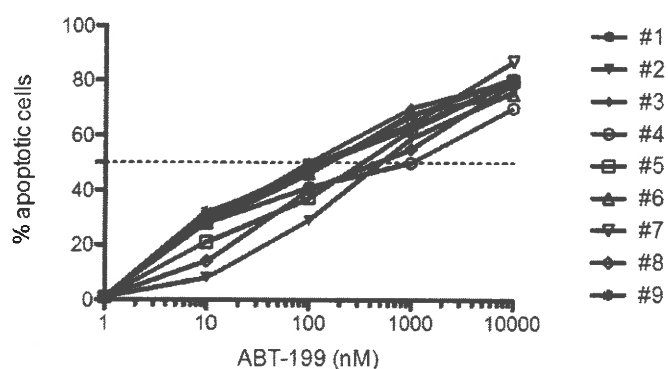
REFERENCES

- 1 Labi V, Grespi F, Baumgartner F, Villunger A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ* 2008; **6**: 977–987.
- 2 Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, Dousset C, Descamps G, Maïga S *et al*. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* 2011; **118**: 3901–3910.
- 3 Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S *et al*. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2006; **5**: 375–388.
- 4 Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL *et al*. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 2012; **5**: 488–496.
- 5 Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J *et al*. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; **2**: 202–208.
- 6 Vandenberg CJ, Cory S. ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 2013; **12**: 2285–2288.
- 7 Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D *et al*. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011; **4**: 574–582.
- 8 Lodé L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuilleme S, Richebourg S *et al*. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010; **11**: 1973–1976.
- 9 Avet-Loiseau H, Roussel M, Campion L, Leleu X, Marit G, Jardel H *et al*. Cytogenetic and therapeutic characterization of primary plasma cell leukemia: the IFM experience. *Leukemia* 2012; **1**: 158–159.
- 10 de Larrea CF, Kyle RA, Durie BGM, Ludwig H, Usmani S, Vesole DH *et al*. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 2012; **4**: 780–791.
- 11 Davids MS, Roberts AW, Anderson MA, Pagel JM, Kahl BS, Gerecitano JF *et al*. The BCL-2-specific BH3-mimetic ABT-199 (GDC-0199) is active and well-tolerated in patients with relapsed non-Hodgkin Lymphoma: interim results of a phase I study. *ASH Annu Meeting Abstracts* 2012; **21**: 304.



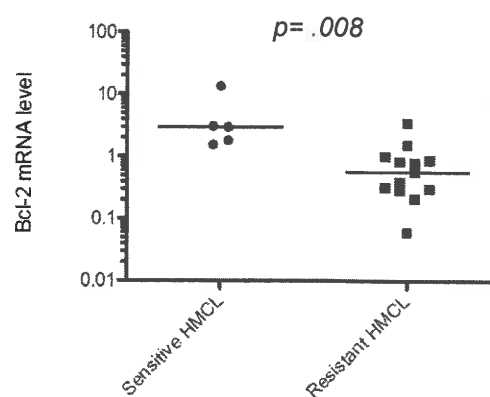
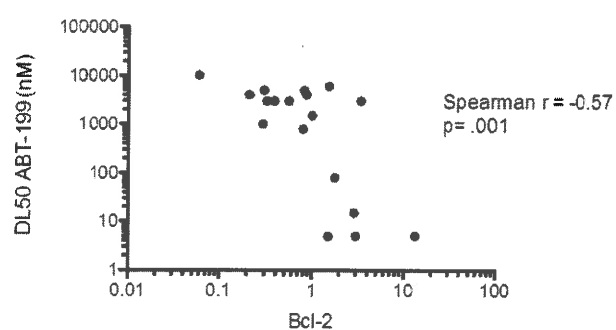
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplemental Figure 1

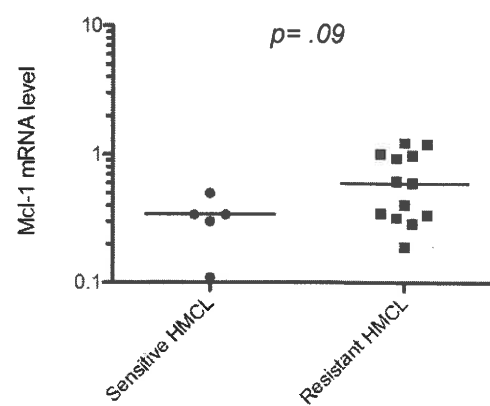
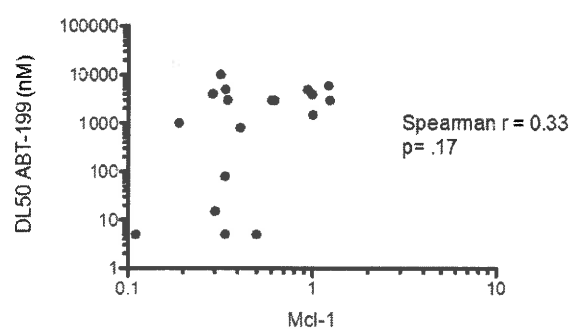


Supplemental Figure 2

a



b



Supplementary Figure Legends

Supplemental Figure 1

Peripheral Blood Lymphocytes (PBL) were obtained from 9 healthy donors after informed consent. PBL were obtained after gradient density centrifugation using Ficoll Hypaque and then were cultured with increasing doses of ABT-199 during 18 hours. Cell death was assessed by APO 2.7 staining.

Supplemental Figure 2

Bcl-2 (A) and Mcl-1 (B) mRNA levels discriminate ABT-199 sensitive from resistant cell lines. Quantitative PCR was performed using the following TaqMan probes (BCL2 (Hs00608023_m1), MCL1 (Hs00172036_m1) and RPL37a (Hs01102345_m1). The relative expression of Bcl-2 and Mcl-1 mRNA was calculated according to the equation of Pfaffl and normalized to the JJN3 cell line. Sensitive HMCLs were defined as having a LD₅₀ inferior to 100 nM.

ARTICLE 3 : La technique de *BH3 profiling* permet de déterminer la dépendance à Bcl-2 des cellules de myélome multiple et prédit la sensibilité aux BH3 mimétiques.

Comme il l'a été décrit dans l'introduction bibliographique, le *BH3 profiling* est un test fonctionnel permettant de mesurer la dépendance des cellules tumorales aux différentes protéines anti-apoptotiques. J'ai pu intégrer durant ma troisième année de thèse de sciences le laboratoire du Pr Anthony Letai (Dana-Farber-Cancer-Institute, Harvard Medical School, Boston) afin d'étudier la capacité du *BH3 profiling* à prédire la sensibilité aux BH3 mimétiques des cellules tumorales de MM.

En utilisant cette technique du *BH3 profiling*, nous avons tout d'abord caractérisé le priming mitochondrial de 8 lignées de MM. Les résultats ont confirmé une hétérogénéité inter-lignées, certaines lignées étant soit Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 dépendantes. Certaines lignées présentent une co-dépendance : Bcl-2+Bcl-X_L ou Mcl-1+Bcl-X_L. Il est retrouvé une corrélation significative entre la réponse au peptide BAD et la sensibilité in vitro aux BH3 mimétiques ABT-263 et ABT-199. Le priming mitochondrial de 14 patients atteints de MM ont ensuite pu être analysés. Les cellules primaires de 5 patients ont été trouvées sensibles à l'ABT-263, dont 3 sensibles également à l'ABT-199. Il est également retrouvé une corrélation significative entre la sensibilité aux BH3 mimétiques et la réponse au peptide BAD. De manière intéressante, deux patients sur les trois sensibles à l'ABT-199 présentaient une translocation t(11 ;14), ce qui appuie nos précédents résultats (article 2). Les résultats sur cellules primaires montrent que deux patients sont retrouvés sensibles à l'ABT-263, et résistants à l'ABT-199, soulignent l'intérêt thérapeutique de cibler Bcl-xL chez certains patients. La technique de BH3 profiling semble donc un bio-marqueur efficace pour prédire la sensibilité des cellules primaires de MM à l'ABT-199.

Cet Article à été soumis pour publication à la revue Blood le 12 décembre 2014

Le numéro de soumission du manuscrit est le : BLOOD/2014/615641

L'email de confirmation est indiqué ci dessous :

-----Original Message-----

From: Blood Journal Editorial Office [mailto:editorial@hematology.org]

Sent: Friday, December 12, 2014 4:50 PM

To: Letai, Anthony G.,M.D.,Ph.D.

Cc: Letai, Anthony G.,M.D.,Ph.D.

Subject: Blood -- Submission of Manuscript #BLOOD/2014/615641 confirmed

MS #BLOOD/2014/615641

Title: BH3 profiling identifies BCL-2 dependency in Multiple Myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics

Dear Dr. Letai:

Your Brief Report has been uploaded successfully to Blood Bench>Press. As the individual making this submission, you will receive all future correspondence via e-mail, and you will be asked to submit any requested revisions online. If your submission or any revision thereof is accepted, you can designate a different contact person for reprints.

Please note your manuscript ID number, BLOOD/2014/615641, and refer to it in all correspondence with Blood's editorial office regarding this submission, as well as the name of the associate editor.

You can track the progress of your submission through the peer review and decision process by periodically logging on to Blood Bench>Press at <http://submit.bloodjournal.org>, where the status will be displayed in your Author Area in the queue "Under Review - Check Status."

Please consult the Journal's online Frequently Asked Questions for authors, available at http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/authors/authors_faq.xhtml. If that site does not address your questions or concerns, feel free to let us know. We thank you for your interest in submitting to Blood.

Sincerely,

Editorial Office Staff

Blood, Journal of the American Society of Hematology

2021 L St. NW, Suite 900

Washington, DC 20036

202-776-0548 (tel.)

202-776-0549 (fax)

editorial@hematology.org (e-mail)

BH3 profiling identifies BCL-2 dependency in Multiple Myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics

Cyrille Touzeau^{1,2,3}, Jeremy Ryan¹, Philippe Moreau^{2,3}, Triona Ni Chonghaile¹, Steven Le Gouill^{2,3}, Paul Richardson¹, Kenneth Anderson¹, Martine Amiot³, Anthony Letai¹

¹ Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA

² Department of Hematology, University hospital, Nantes, France

³ INSERM UMR892, CNRS UMR6299, University of Nantes, France.

Short title : BCL-2 dependency in Multiple Myeloma

Correspondence :

Anthony Letai, M.D., Ph.D.

Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute

450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215, USA

Phone (617) 632-2348, FAX (617) 582-8160

e-mail: anthony_letai@dfci.harvard.edu

Key points

- Multiple Myeloma is a heterogeneous disease regarding its dependence on anti-apoptotic proteins.

- BH3 profiling identifies a BCL-2 dependent subset of MM patients and predicts sensitivity to BH3 mimetics

Key words

Multiple Myeloma, Bcl-2, Apoptosis, BH3 mimetics, BH3 profiling

Words, Figures and References counts

34 Abstract: 115 words, Text: 1188 words, Figures: 2, Supplemental material: 1 table,
35 References: 15

ABSTRACT

Despite significant improvement in the treatment of multiple myeloma (MM) patients, relapse remains inevitable. Anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family inhibit the commitment to apoptotic cell death and represent attractive targets for therapy. BH3 profiling is a functional assay that identifies the tumor cell's addiction to these anti-apoptotic members. In the present study, we tested the BCL-2, BCL-X_L and MCL-1 dependence of both MM cell lines and primary samples. We showed that MM is a heterogeneous disease regarding its dependence on anti-apoptotic proteins and cannot be considered as monolithically MCL-1, BCL-2 or BCL-X_L dependent. Moreover, BH3 profiling allowed the identification of a BCL-2 dependent subset of MM patients and predicted sensitivity to ABT-199 *in vitro*.

INTRODUCTION

Despite a significant improvement in the survival of multiple myeloma (MM) patients, the disease remains incurable and innovative strategies are needed. Interactions among BCL-2 family proteins mainly determine cellular fate decision in response to drug therapy. Thus, anti-apoptotic members such as BCL-2, BCL-X_L or MCL-1 represent attractive targets for therapy¹. BH3 profiling is a functional assay that identifies the tumor cell's addiction to these anti-apoptotic members.² The oral BCL-2-specific BH3 mimetic ABT-199 demonstrates very promising results in BCL-2 dependent malignancies such as chronic lymphoid leukemia (CLL)^{3,4} and mantle cell lymphoma⁵. To date, there has been no determination of what proportion of MM cases are likely to be BCL-2 dependent. The present study demonstrated that MM is a heterogeneous disease with respect to BCL-2, BCL-X_L or MCL-1 dependence. Moreover, identification by BH3 profiling of BCL-2 dependence predicted *in vitro* sensitivity to BH3 mimetics.

METHODS

Cells. The identity of the following human myeloma cell lines KMS12-PE, XG-5, SKMM2, LP-1, L363, NCI-H929, RPMI-8226 and MM1-S was confirmed by DNA fingerprinting. Primary cells were obtained after informed consent from MM patients treated at the Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA. **Drugs.** ABT-199 and ABT-263 were provided by AbbVie laboratories (North Chicago, IL, USA). **BH3 profiling.** As previously described⁶, tumor cells were pelleted and resuspended in DTEB buffer with addition of each BH3 peptide treatment with 0.002% w/v digitonin. BAD, HRK and MS1 peptides sequences have been previously described^{7,8}. Mitochondria in the permeabilized cells were exposed to peptides for 45 min at 26°C before fixation with 2% formaldehyde at room temperature for 15 min. After addition of neutralizing buffer, cells were stained with anti-cytochrome *c*-Alexa488 (#560263, BD Biosciences) 1:100 in 0.1% Saponin/1%BSA/PBS overnight at 4 C. The quantification of cytochrome c loss induced by each peptide was analyzed by FACS (LSR Fortessa flow cytometer, BD Bioscience).

RESULTS AND DISCUSSION

BH3 profiling of myeloma cell lines demonstrates heterogeneous BCL-2 dependency and correlates with *in vitro* sensitivity to BH3 mimetics. Dependence on BCL-2, BCL-X_L or MCL-1 was measured in 8 human myeloma cell lines. After cell permeabilization, mitochondria were exposed to standardized amounts of BAD, HRK or MS1 peptides. The affinity of these peptides for the anti-apoptotic proteins are summarized in Figure 1a^{2,8,4}. The cytochrome c release induced by each peptide was quantified by FACS analysis. Dependence on individual anti-apoptotic proteins was found to be very heterogeneous from one cell line to another (Figure 1b). Two cell lines (LP-1 and L-363) were found to be relatively purely MCL-1 dependent. XG-5 and SKMM2 were found to be relatively BCL-2 dependent and MM1-S was found to be relatively purely BCL-X_L dependent. The remaining cell lines were characterized by co-dependency on anti-apoptotic proteins: BCL-2 and BCL-X_L (KMS12-PE) or BCL-X_L and MCL-1 (NCI-H929 and RPMI-8226). We then determined the *in vitro* sensitivity of MM cell lines to the BH3 mimetics ABT-199 and ABT-263 (Figure 1c). The mitochondrial response to BAD peptide predicted the *in vitro* sensitivity to ABT-263 (Figure 1d). The BAD minus HRK mitochondrial response was used to reflect the specific BCL-2 dependency and significantly predicted sensitivity to ABT-199. (Figure 1d) Finally, the cytochrome c release in response to ABT-199 and ABT-263 strongly correlated with the *in vitro* sensitivity to the drug.

BH3 profiling of primary myeloma cells predicts *in vitro* sensitivity to BH3 mimetics. We then determined the mitochondrial priming of primary plasma cells obtained from 14 different patients with a diagnosis of de novo or relapsed MM. Patient characteristics are summarized in Figure 2a. As observed with cell lines, patient samples showed a heterogeneous dependence on anti-apoptotic proteins (Figure 2a). Of note, mitochondria of 5 patient samples were found to be relatively independent of BCL-2, BCL-X_L or MCL-1. We also determined the *in vitro* sensitivity to ABT-199 and ABT-263. 3 and 5 samples were found to be sensitive ($LD_{50} \leq 100$ nM) to ABT-199 and ABT-263, respectively. As shown in Figure 2b, BH3 profiling using the BAD peptide correlated with the *in vitro* sensitivity to ABT-199 and 263.

Discussion. BH3 profiling is a unique, functional method to measure the dependence to the anti-apoptotic proteins in live cancer cells. The present study demonstrates that Multiple Myeloma is a heterogeneous disease regarding its dependence on anti-apoptotic proteins and

cannot be considered as monolithically BCL-2, BCL-X_L or MCL-1 dependent. MCL-1 is expressed in MM cells at levels higher than normal plasma cells and its expression level has been shown to affect clinical outcome^{9,10}. Here, mitochondria from half of MM cell lines (4/8) and from almost one third of primary samples (4/14) were found to be MCL-1 dependent. These results are consistent with the requirement for MCL-1 for survival of many myeloma cells. BH3 profiling also identified a subset of BCL-2 and/or BCL-X_L dependent MM cells with relatively less dependence on MCL-1 and correctly predicted sensitivity to the BH3 mimetics ABT-199 and 263. In our series, one MM cell line (MM1-S) and 2 primary samples (#7 and #11) were found to be sensitive to ABT-263 but insensitive to ABT-199, that linked to their BCL-X_L dependence determined using BH3 profiling. Even if these findings indicate that BCL-X_L could be an attractive target for MM, the BCL-X_L-related platelet toxicity has impaired the clinical development of ABT-263¹¹. Previous studies identified MM cells sensitive to BH3 mimetics based on their BCL-2/MCL-1 mRNA ratio^{12,13} or interactions of BCL-X_L and BCL-2 with BIM¹⁴. From a practical point of view, BH3 profiling can be performed in just a three hours with fewer cells (5.10⁴ plasma cells to determine response to the BAD BH3 peptide). This consideration is of importance because bone marrow samples from MM patients usually contain a low percentage of plasma cells (the median percentage of plasma cell in BM aspirate was 9% in our series). It has been previously reported that sensitivity to ABT-199 was restricted in MM patients with t(11;14) translocation¹³. Here, among the three ABT-199 sensitive samples, two were found to be t(11;14). By including previous data from Touzeau et al¹³, sensitivity to ABT-199 from 29 different primary MM samples was analyzed. Overall, 7 samples (24%) were found to be sensitive to the drug (LD₅₀<100 nM). Interestingly, 6 of these ABT-199 sensitive samples carried the t(11;14) translocation. Of note, the remaining sensitive sample was found to be BCL-2 dependent according to BH3 profiling. However, one sensitive patient sample was found to be negative for the t(11;14) translocation suggesting that BCL-2 dependence may exist beyond this cytogenetic subgroup. The positive (PPV) and negative (NPV) predictive value of BH3 profiling to predict ABT-199 sensitivity were 75 and 100%, respectively (supplemental Table).

Overall, and as previously demonstrated in other hematologic malignancies^{2,6,15}, BH3 profiling identifies BCL-2 dependence in myeloma cells and predicts sensitivity to BH3 mimetics. Phase 1 clinical trials are currently evaluating the safety of ABT-199 as a single agent (NCT01794520) or in combination with bortezomib plus dexamethasone

149 (NCT01794507) in relapsed MM patients. The promising predictive value of BH3 profiling
150 needs to be confirmed in the context of prospective clinical studies. Because BCL-2
151 dependency was found only in a subset of myeloma patients, future clinical trials with an
152 efficacy objective should integrate biomarkers such BH3 profiling to stratify potential
153 | candidates for ABT-199 therapy.

CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE

AL has been a paid advisor to AbbVie. AL's laboratory has received sponsorship for research with AbbVie.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge support from NIH grants R01CA129974.

CT was supported by the Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (F.F.R.M.G.).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

AL and CT designed research and wrote the manuscript. CT performed experiments. CT, AL, JR, TN analyzed the data. PR, KA, MA, SLG, PM provided myeloma cells. All the authors critically reviewed the manuscript.

REFERENCES

1. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(2):121–132.
2. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*. 2006;9(5):351–365.
3. BCL-2 inhibitor yields high response in CLL and SLL. *Cancer Discov.* 2014;4(2):OF5.
4. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 2013;
5. Davids MS, Roberts AW, Anderson MA, et al. The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 2012;120(21):304.
6. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 2014;4(3):362–375.
7. Ryan J, Letai A. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods San Diego Calif*. 2013;61(2):156–164.
8. Foight GW, Ryan JA, Gullá SV, Letai A, Keating AE. Designed BH3 Peptides with High Affinity and Specificity for Targeting Mcl-1 in Cells. *ACS Chem. Biol.* 2014;
9. Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D, et al. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood*. 2004;103(5):1799–1806.
10. Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*. 2005;19(7):1248–1252.
11. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2012;30(5):488–496.
12. Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, et al. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood*. 2011;118(14):3901–3910.
13. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, et al. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;
14. Morales AA, Kurtoglu M, Matulis SM, et al. Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood*.

202 2011;118(5):1329–1339.

203 15. Chonghaile TN, Roderick JE, Glenfield C, et al. Maturation stage of T-cell acute
204 lymphoblastic leukemia determines BCL-2 versus BCL-XL dependence and sensitivity to
205 ABT-199. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1074–1087.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : BH3 profiling of Myeloma cell lines demonstrates heterogeneous Bcl-2 dependancy and correlates with *in vitro* sensitivity to BH3 mimetics.

(a) Binding affinity of BH3 peptides, ABT-199 and ABT-263 for the anti-apoptotic proteins. Green and red colors indicate high and low affinity, respectively^{2,8,5}. (b) Intracellular BH3 (iBH3) profiling was performed using BAD (100µM), HRK (100µM) and MS-1 (10µM) peptides. Values indicate the percentage of cytochrome c negative cells. Indicated values are the mean of 3 independent experiments. KMS12-PE, XG-5 and SKMM2 were provided by Dr. M. Amiot (Inserm U892, Nantes, France). LP-1, L363, NCI-H929, RPMI-8226 and MM1-S were provided by Dr Anderson (DFCI, Boston, MA, USA). Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 2mM glutamine. XG-5 required 2 ng/mL Interleukin-6. (c) Sensitivity of Myeloma cell lines to the BH3 mimetics ABT-199 and ABT-263. Cell lines were treated with ABT-199 or ABT-263 for 24 hours and viability was measured by CellTiter-Glo® according to the manufacturer's protocol (Promega). Cell lines were cultured with increasing doses of ABT-199 or ABT-263 during 24 hours. Indicated values are the mean of 3 independent experiments. Light grey line indicates IC₅₀ <100 nM, Dark grey line indicates IC₅₀ between 100 and 5000 nM, black lines indicate IC₅₀ > 5000 nM (d) IC₅₀ of myeloma cell lines were correlated with the mitochondrial response to BAD (100µM), BAD (100µM) – HRK (100µM) peptides and with ABT-199 or 263 (1µM). All correlations were tested using a one-tailed Spearman r correlation using GraphPad Prism software.

Figure 2: BH3 profiling of primary myeloma cells predicts lines in vitro sensitivity to BH3 mimetics.

(a) Mitochondrial priming of multiple myeloma primary cells. Intracellular BH3 (iBH3) profiling was performed using BAD (100µM), HRK (100µM) and MS-1 (10µM) peptides. Primary cells were obtained after informed consent from MM patients treated at the Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA. Plasma cells from bone marrow were purified after Ficoll-Hypaque separation with immuno-magnetic anti-CD138 (Miltenyibiotec) and cultured

in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine and 2 ng/mL Interleukin-6. Abbreviations: Iso, immunoglobulin isotype; Diag, Newly diagnosed myeloma; Rel, relapsed myeloma. HD: hyperdiploidy. ¹All samples were screened by FISH for the t(11;14), t(4;14), 17p deletion and caryotype was performed for hyperdiploidy status. ²Values indicate the percentage of cytochrome c negative cell. ³Values indicate the percentage of apoptotic cells. Cells were cultured with/without the drugs during 16 hours. Cell death was assessed by flow cytometry after annexin V staining Dark grey: $\geq 50\%$, Intermediate grey: 20-49, light grey: $<20\%$ (b) Primary samples were cultured for 16 hours with/without ABT-199 or ABT-263 (100 nM). Cell death was measured by FACS using Annexin V staining. Percentages of apoptotic cells were correlated with the BAD (100 μ M) peptide. All correlations were tested using a one-tailed Spearman r correlation using GraphPad Prism software.

Legend:**Supplemental Table:**

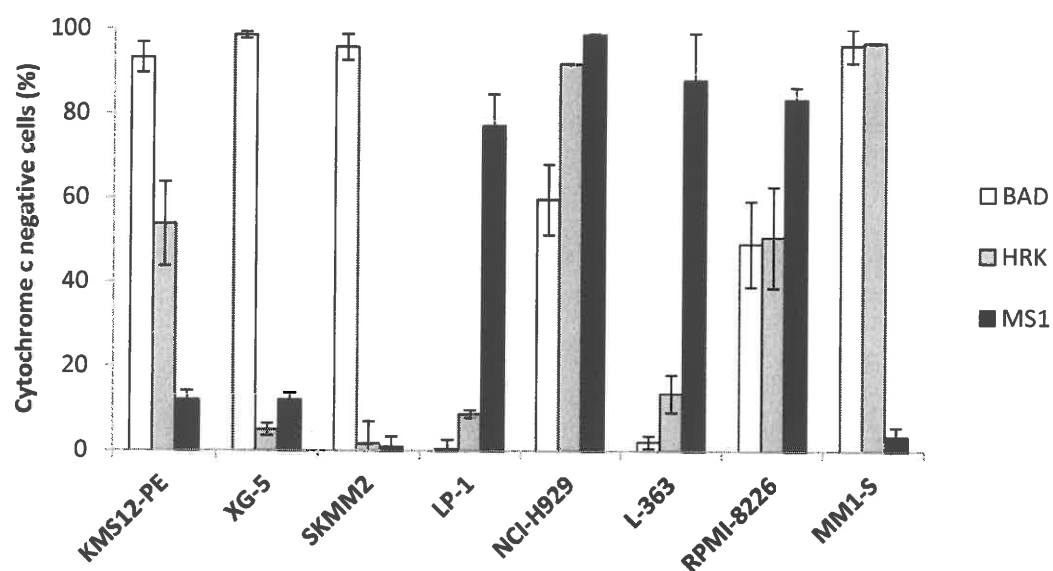
Legend: Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value. For the t(11;14) translocation test, a positive test was determined by the presence of the translocation. For the BH3 profiling test, a positive test was defined by a BAD (100 μ M) response (% cytochrome c negative cells) > 50%

Figure 1:

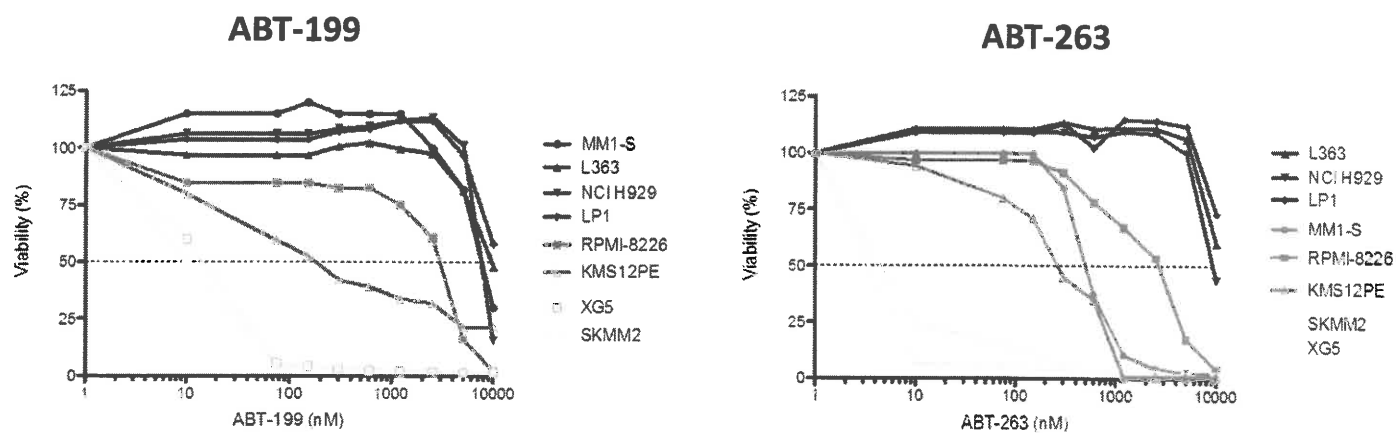
a

	BAD	HRK	MS1	ABT-199	ABT-263
BCL-2					
BCL-X _L					
MCL-1					

b



c



d

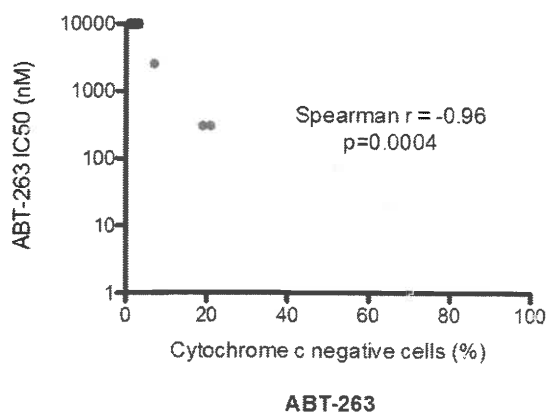
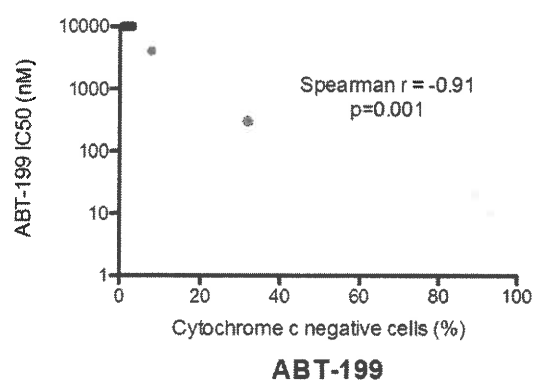
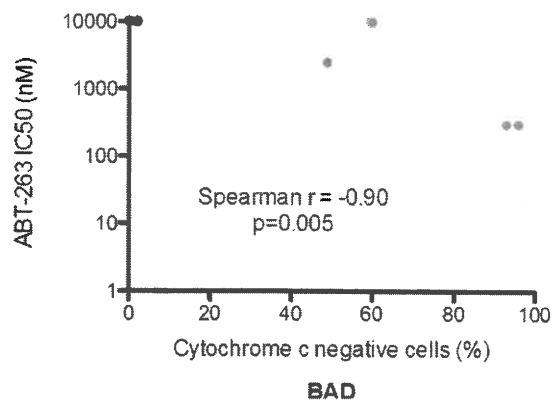
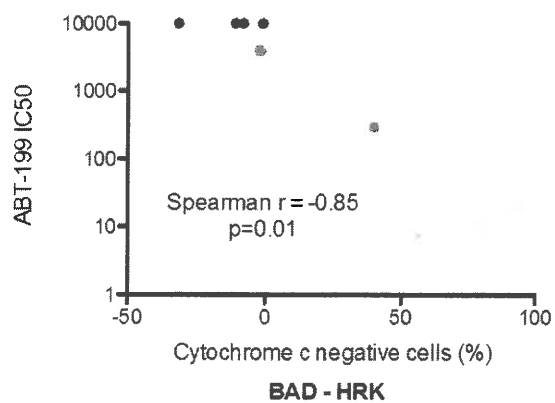
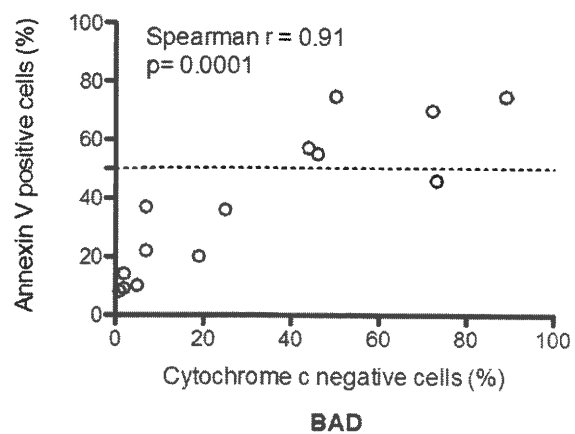
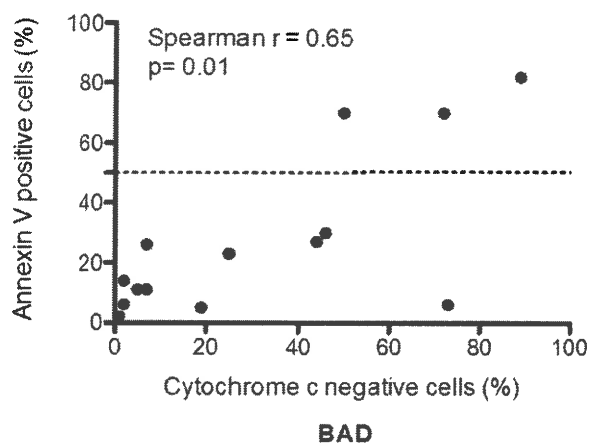


Figure 2:

a

#	Sex/Age	Disease Status	Isotype	Cytogenetic Abnormalities ¹	BH3 profiling ²			Sensitivity to BH3 mimetics ³	
					BAD	HRK	MS1	ABT-199	ABT-263
1	M/41	Diag	CL k	t(11;14)	89	90	63	82	75
2	W/59	Rel	CL L	-	5	2	5	11	10
3	W/73	Rel	G k	t(16;14)	2	4	2	6	9
4	W/75	Rel	Ig G k	-	25	30	16	23	36
5	M/73	Diag	Ig G K	t(11;14)	1	5	50	2	8
6	W/81	Diag	Ig G k	HD	7	2	1	26	37
7	M/73	Rel	CL k	t(4;14)	46	76	52	30	55
8	W/57	Rel	Ig G k	HD	7	5	8	11	22
9	W/66	Rel	Ig G k	-	72	1	2	72	70
10	M/44	Rel	Ig G k	17p del	73	34	1	6	46
11	M/49	Diag	Ig G k	HD	44	31	1	27	57
12	W/63	Diag	Ig A k	t(11;14)	2	1	2	14	14
13	W / 60	Diag	Ig G k	-	19	30	61	5	20
14	W / 61	Diag	Ig G k	t(11;14)	51	4	5	70	75

b



Supplementary data :

	Se	Sp	PPV	NPV
t(11;14)	85.7%	86%	66.6%	95%
BH3 profiling	100%	91%	75%	100%

Discussion et perspectives

I- Evaluation pré-clinique de l'ABT-737 dans le lymphome à cellules du manteau

Ce travail a mis en évidence une importante hétérogénéité de sensibilité à l'ABT-737 des lignées et des cellules primaires de LCM. (Touzeau *et al*, 2011) Plusieurs travaux avaient rapporté la sensibilité de lignées tumorales ou cellules primaires de LCM, mais à partir d'effectifs plus faibles, et au sein d'autres hémopathies malignes. (Tse *et al*, 2008; Vogler *et al*, 2008; Paoluzzi *et al*, 2008) De ce fait, ces travaux n'avaient pas mis en évidence cette hétérogénéité de sensibilité à l'ABT-737. Pourtant, cette notion est importante car renvoie à la nécessité de bio-marqueurs permettant de repérer les patients les plus à même de bénéficier de cette drogue.

Compte tenu du mécanisme d'action très spécifique de l'ABT-737, l'expression des protéines anti-apoptotiques ciblées (Bcl-2, Bcl-X_L) et non ciblées (Mcl-1) par la drogue apparaît comme les facteurs directs associés à la sensibilité. Le rôle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-737 a été rapporté dans différents modèles cellulaires : leucémie aigue myéloblastique, (Konopleva *et al*, 2006) lymphome à grandes cellules B, (van Delft *et al*, 2006) myélome multiple (Bodet *et al*, 2011) et tumeurs solides. (Tahir *et al*, 2007) Dans notre étude, nous avons confirmé par technique de SiRNA le rôle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-737 dans le modèle particulier du LCM. De plus, nous avons démontré la valeur prédictive du ratio d'ARN Bcl-2/Mcl-1 déterminé par PCR quantitative sur la sensibilité à l'ABT-737.

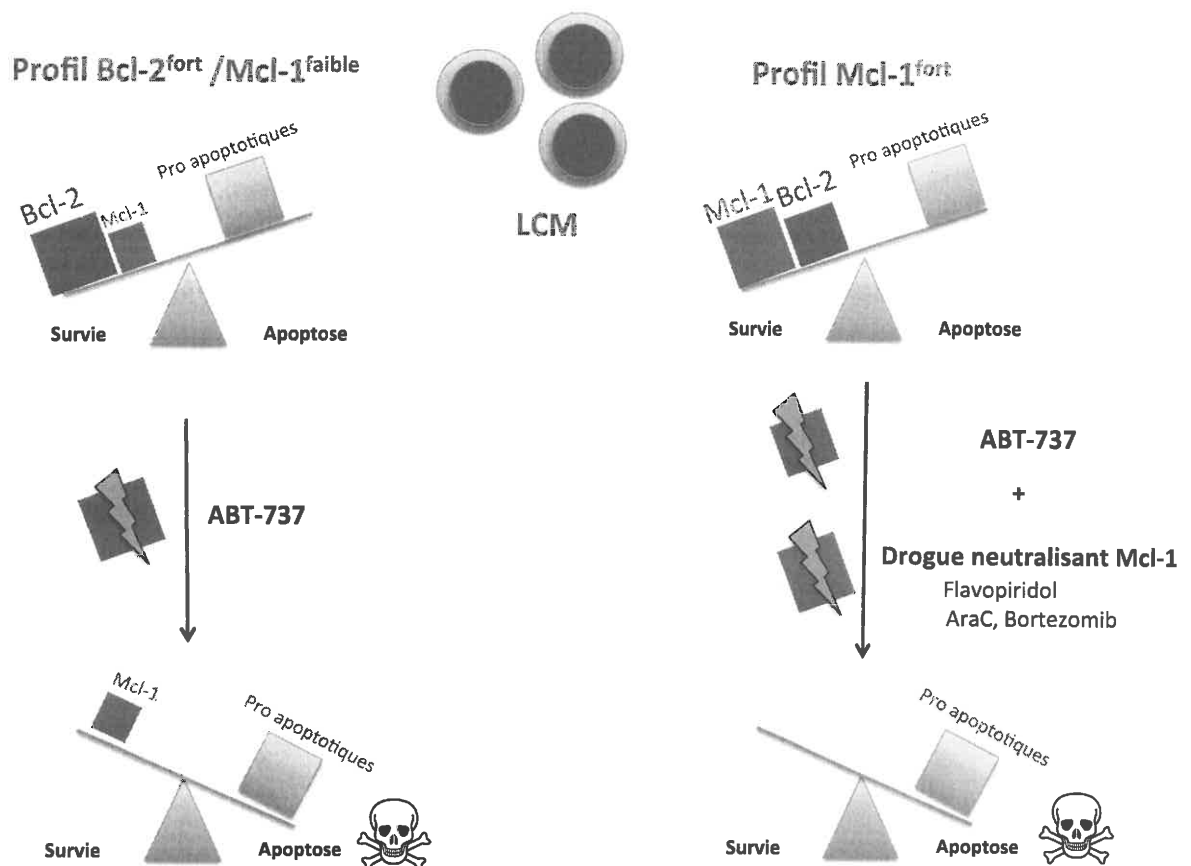
Comme l'expression de Mcl-1 est associée à la résistance à l'ABT-737, nous avons étudié l'effet anti-tumoral de combinaisons avec des drogues inhibant l'expression de Mcl-1. Le flavopiridol est un flavonoïde de synthèse inhibant la transcription via l'inhibition des CDK activant l'ARN polymérase. Ainsi, le flavopiridol inhibe fortement l'expression de Mcl-1, protéine à demi-vie courte. Après avoir confirmé l'inhibition de la transcription de Mcl-1 par le flavopiridol sur des lignées de LCM résistantes à l'ABT-737, nous avons montré une forte action anti-tumorale synergique de la combinaison ABT-737 + flavopiridol. Cette synergie a été rapportée par d'autres dans un modèle de lignées de lymphome à grandes cellules B, (Yecies *et al*, 2010) et plus récemment dans un modèle de leucémie aigue myéloblastique. (Kasper *et al*, 2012)

Bien que le flavopiridol ait montré des taux de réponses significatifs chez les patients atteints de LCM, (Kouroukis *et al*, 2003) cette drogue n'est pas actuellement validée par les instances française ou européennes du médicament pour le traitement de ces patients. Nous

avons donc évalué la combinaison de l'ABT-737 avec deux drogues actuellement incontournables dans le traitement des patients atteints de LCM : l'aracytine et le bortezomib. Une synergie a été observée pour ces deux combinaisons, *via* une inhibition de l'expression de Mcl-1 par l'aracytine, et *via* une augmentation de l'expression de Noxa, *BH3 only* inhibant spécifiquement Mcl-1 avec le bortezomib. Une synergie de l'ABT-737 avec le bortezomib a été confirmée dans plusieurs études concernant la leucémie aigue lymphoblastique T, (Kunami *et al*, 2014) le mélanome malin, (Reuland *et al*, 2012), la LLC, (Tromp *et al*, 2012) et les lymphomes malins dont MCL. (Paoluzzi *et al*, 2008)

Ainsi, nous pouvons proposer la stratégie thérapeutique suivante (Figure 27) selon le profil d'expression de Bcl-2 et Mcl-1 des cellules tumorales.

Figure 27: Stratégie thérapeutique selon le profil d'expression de Bcl-2 et Mcl-1 des cellules de LCM



Pour les patients présentant un profil Bcl-2^{fort}/Mcl-1^{faible}, un traitement par ABT-737 suffit à induire l'apoptose des cellules tumorales. Pour les patients présentant une forte expression de Mcl-1, l'ABT-737 doit être associé à un traitement neutralisant Mcl-1 : soit par

une diminution de son expression (falvopiridol, aracytine (AraC)), soit par une induction de Noxa, inhibant spécifiquement Mcl-1 (bortezomib).

Le développement clinique de l'ABT-737 a été limité par la toxicité plaquettaire significative liée à l'inhibition de Bcl-X_L. (Roberts *et al*, 2012) Pour contourner ce problème, un nouveau BH3 mimétique ciblant spécifiquement Bcl-2, l'ABT-199, a été développé. L'ABT-199 connaît actuellement un développement clinique très rapide dans les syndromes lymphoprolifératifs B. En effet, l'ABT-199 a démontré des taux de réponse très importants chez des patients atteints de LLC en rechute. (ABT-199 Shows Effectiveness in CLL, 2014) La tolérance de cette molécule orale est très satisfaisante, en dehors d'un risque de syndrome de lyse tumorale, 2 cas graves ayant été rapportés. De manière intéressante, un essai de clinique de phase 1 mené chez des patients atteints de lymphomes B matures a mis en évidence une efficacité particulièrement importante dans le LCM : 7/7 patients ont obtenu au moins une réponse partielle. (Davids *et al*, 2012) Plusieurs essais de phase 2 sont actuellement en cours testant l'ABT-199 en combinaison avec d'autres drogues (i.e. bendamustine, rituximab) chez des patients atteints de LCM.

Cependant, un élément important majeur reste à investiguer : la résistance acquise aux BH3 mimétiques ciblant Bcl-2. Plusieurs mécanismes de résistance ont déjà été décrits. En effet, il a été montré sur lignées de lymphome B que l'exposition prolongée à l'ABT-737 induit la résistance à cette drogue. (Yecies *et al*, 2010) Dans cette étude le mécanisme impliqué de la résistance induite est l'augmentation de l'expression par les cellules tumorales des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bfl-1. Un autre mécanisme de résistance aux BH3 mimétiques mis en évidence récemment sur un modèle de lignée tumorale est l'acquisition (ou la sélection d'un clone présent initialement) de mutation au niveau de la poche hydrophobe de Bcl-2 empêchant la liaison du BH3-mimétique. (Fresquet *et al*, 2014) Ces données sont importantes et peuvent amener à influencer les choix de mode d'administration des BH3 mimétiques : administration discontinue *versus* faible dose en continu. De plus, il a été montré une forte liaison de l'ABT-737 ou 263 avec l'albumine, protéine plasmatique présente abondamment dans le sang, ce qui diminue fortement la sensibilité des cellules tumorales *in vivo*. (Vogler *et al*, 2010) Enfin, un autre élément important impliqué dans la résistance aux BH3 mimétiques est l'influence du microenvironnement tumoral. Plusieurs publications ont en effet rapporté cet impact négatif du microenvironnement sur la sensibilité des cellules de LLC. (Tromp *et al*, 2012; Vogler *et al*, 2009a) Dans l'étude de Vogler *et al.*, le microenvironnement ganglionnaire est mimé en cultivant les cellules de LLC sur des fibroblastes exprimant le CD40 ligand, en présence d'Il-4. En co-culture, les cellules de LLC deviennent près de 1000 fois plus résistantes à l'ABT-737 en

raison d'une augmentation de la transcription de Bcl-X_L et Bcl2-A1. Dans l'étude de Tromp et al, la co-culture sur fibroblastes exprimant le CD40 ligand induit la résistance en augmentant le ratio Mcl-1/Noxa via l'induction de la voie Nfk-B. Notre équipe travaille actuellement sur l'impact du microenvironnement sur la sensibilité à l'ABT-199. En co-culture sur fibroblastes exprimant le CD40L, nous montrons que lignées tumorales et cellules primaires de LCM deviennent plus résistantes à l'ABT-199 en raison de l'augmentation de l'expression de Bcl-xL via l'activation de la voie NF-kB. (Touzeau *et al*, 2013a) L'article correspondant à ces résultats, en cours de finalisation, est indiqué en annexe.

II- Evaluation pré-clinique de l'ABT-199 dans le myélome multiple

Dans ce travail, nous avons montré que seules les cellules tumorales d'une fraction de patients atteints MM sont sensibles à l'ABT-199. (Touzeau *et al*, 2013b) A l'instar de notre travail concernant le LCM, nous avons analysé la sensibilité à l'ABT-199 de notre collection de lignées au regard de leur niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques ciblées (Bcl-2) et non ciblées (Bcl-X_L, Mcl-1). Ainsi, nous avons montré une corrélation significative entre la sensibilité à l'ABT-199 et le ratio d'ARN Bcl-2/Mcl-1 déterminé par PCR quantitative. De manière intéressante, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le niveau d'expression de Bcl-X_L et la sensibilité à l'ABT-199. Le rôle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-199 dans le modèle particulier du MM a été confirmé par technique de SiRNA. De manière intéressante, les lignées tumorales et les cellules primaires de MM sensibles à l'ABT-199, présentant un ratio d'ARN Bcl-2/Mcl-1 élevé, sont caractérisées par la présence de la translocation t(11 ;14).

Les essais actuels menés dans la LLC sur maintenant un nombre significatifs de patients montrent que la grande majorité des patients sont sensibles à l'ABT-199. Pour le myélome multiple, nous montrons dans ce travail que seules les cellules tumorales d'une minorité de patients sont potentiellement sensibles à cette drogue. Ce message implique la nécessité de bio-marqueurs efficaces pour sélectionner correctement les bons candidats à un traitement par ABT-199. Dans cette étude, nous n'avons pu tester le ratio Bcl-2 / Mcl-1 par PCR que pour trois patients. Bien que les résultats tendent à conforter la valeur prédictif du ratio, l'effectif testé reste limité. De plus, la détermination de ce ratio par PCR quantitative nécessite un nombre de cellules conséquent, au moins 500 000 plasmocytes, ce qui est souvent difficile à obtenir compte tenu du faible envahissement tumoral médullaire chez la majorité des patients. Ces éléments ont justifié la recherche d'autres bio-marqueurs, tel le *BH3 profiling*. Ces résultats seront discutés dans la partie 3 de la discussion.

Si le présent travail constitue la première publication concernant la sensibilité des cellules de MM à l'ABT-199, d'autres études ont précédemment évalué l'ABT-737 dans cette pathologie. Cependant, quatre de ces études n'ont pas inclus de lignées sensibles et les DL₅₀ retrouvées sont de l'ordre du micromolaire. (Chauhan *et al*, 2007; Kline *et al*, 2007; Trudel *et al*, 2007; Morales *et al*, 2011) En ce qui concerne l'étude des cellules primaires, seule l'étude de Trudel *et al* a retrouvé des échantillons relativement sensibles à l'ABT-737 (4 patients sur 15 testés, DL₅₀ comprise entre 250 et 500 nM). Les caractéristiques cytogénétiques de ces

patients ne sont pas indiquées. Dans l'étude de Morales et al, il est retrouvé une corrélation la sensibilité à l'ABT-737 et le niveau de complexe Bcl-2/Bim ou Bcl-XL/Bim. Enfin, la dernière étude importante ayant analysé la sensibilité des cellules de MM à l'ABT-737 est celle de notre équipe, et a mis en évidence la différence de sensibilité des lignées en fonction du sous-groupe moléculaire et l'importance du ratio Bcl-2/Mcl-1. (Bodet *et al*, 2011)

Dans la présente étude, seules les cellules tumorales (lignées ou cellules primaires) positives pour la translocation t(11 ;14) ont été retrouvées sensibles à l'ABT-199. A l'inverse, certaines lignées ou échantillons t(11 ;14) positifs ont été retrouvés résistants à l'ABT-199, ce qui rend imparfait l'utilisation de la translocation t(11 ;14) comme test biologique prédictif. Cette restriction de sensibilité des cellules de MM avec t(11 ;14) renvoie à la grande sensibilité à l'ABT-199 des patients atteints de LCM, présentant également la translocation t(11 ;14). En effet, bien que les effectifs restent limités, le taux de réponse des patients LCM semble plus important que les patients présentant un lymphome folliculaire, pourtant le modèle de surexpression de Bcl-2 en raison de la translocation t(14 ;18). Ce lien entre la dépendance à Bcl-2 et la translocation t(11 :14) est inconnu, et à ce jour non rapporté dans la littérature. S'il a été démontré dans un modèle murin de LCM que la protéine cycline D1, surexprimée dans le LCM, inhibait directement l'apoptose des cellules tumorales par une séquestration de BAX, le lien entre la Bcl-2 dépendance et la translocation t(11 :14) n'est pas étayé. Les mécanismes moléculaires sous-tendant ce lien restent donc à déterminer.

Au cours de ce travail, nous n'avons pas évalué l'impact du microenvironnement médullaire sur la sensibilité à l'ABT-199. Or, il a été montré que le microenvironnement médullaire, via notamment la sécrétion d'Il-6 ou de VEGF, augmentait l'expression de Mcl-1 par les cellules tumorales. (Le Gouill *et al*, 2004; Puthier *et al*, 1999a) Ces données pourraient faire craindre une plus grande résistance des cellules tumorales *in vivo*.

L'ABT-199 est actuellement testé dans le cadre d'essais de phase 1 chez des patients atteints de myélome multiple en rechute : en monothérapie (essai Abbvie NCT01794520) ou en association avec le bortezomib et la dexaméthasone (essai Abbvie NCT01794507).

L'importance de Mcl-1 dans la survie des cellules de myélome multiple incite à la mise au point de molécules BH3 mimétiques ciblant Mcl-1. L'activité pré-clinique sur lignées tumorales de MM d'une molécule BH3-mimétique spécifique de Mcl-1 a été rapportée lors du congrès de l'ASH 2014 (Evaluation of Mcl-1 inhibitors in preclinical models of multiple myeloma. M. Belmonte, abstract 3428). Une première administration chez l'homme est prévue dans les mois à venir.

III- Aptitude du *BH3 profiling* à identifier la dépendance à Bcl-2 des cellules de myélome multiple et à prédire la sensibilité aux BH3 mimétiques

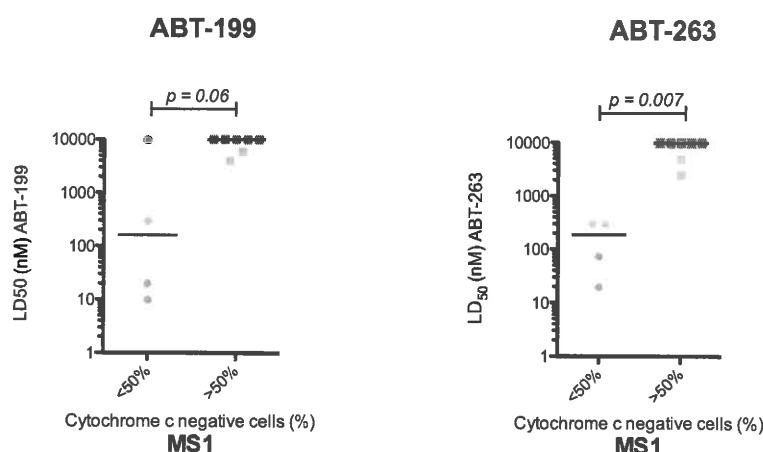
L'objectif de ce travail était d'évaluer par la technique de *BH3 profiling* la dépendance mitochondriale des cellules tumorales de MM aux protéines anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-X_L ou Mcl-1. Nous avons montré que le profil d'un panel de lignées tumorales de MM est très hétérogène : certaines lignées présentant une dépendance unique à Bcl-2, Bcl-X_L ou Mcl-1, d'autres présentant une co-dépendance à plusieurs protéines anti-apoptotiques. Cette hétérogénéité a été confirmée sur les cellules primaires provenant de patients atteints de MM. De plus, nous avons montré une corrélation significative entre la réponse mitochondriale au peptide BAD et la sensibilité aux BH3 mimétiques ABT-199 et ABT-263.

La nécessité d'un bio-marqueur de sensibilité aux BH3 mimétiques est essentielle pour les patients atteints de myélome multiple, dont seulement une minorité est potentiellement sensible *in vitro*. Dans le précédent travail, nous avons démontré sur les lignées tumorales de MM la valeur du ratio d'ARN Bcl-2/Mcl-1 pour la prédiction de la sensibilité à l'ABT-199. Cependant, nous n'avons pu valider la valeur de ce ratio sur un nombre suffisant de patient. Une des raisons est le nombre élevé de cellules nécessaire pour déterminer le ratio (500 000 cellules environ), nombre difficile à obtenir lors des prélèvements médullaires des patients. En effet, dans la présente étude, le pourcentage médian de plasmocytes au myélogramme n'est que de 9%. Ainsi, un avantage du *BH3 profiling* est qu'il nécessite un nombre plus faible de cellules (environ 40 000 cellules pour évaluer la Bcl-2 dépendance).

La poursuite de l'analyse de la sensibilité *in vitro* des cellules de MM à l'ABT-199 confirme que la sensibilité des plasmocytes est inférieure à la sensibilité des cellules de LLC ou de LCM. En effet, la LD₅₀ des cellules de MM sensibles est de 10 à 100 nM, tandis que la sensibilité des cellules primaires de LCM et LLC est souvent < 1 nM. Cette différence de niveau de sensibilité de 1 à 2 log pourrait nettement influencer l'efficacité *in vivo* de l'ABT-199.

De manière intéressante, les lignées de MM retrouvées Mcl-1 dépendantes selon le *BH3 profiling* sont significativement plus résistantes aux BH3 mimétiques ciblant Bcl-2 (Figure 28). Ceci tend à soutenir le rôle de Mcl-1 dans la résistance aux BH3 mimétiques montré dans nos précédents travaux.

Figure 28: Influence de la Mcl-1 dépendance sur la sensibilité aux BH3 mimétiques



Légende : Vert , lignées MM sensibles ($LD_{50} < 100$ nM), orange ; lignées intermédiaires, $100 < LD_{50} < 5000$ nM ; rouge, lignées résistantes $LD_{50} > 5000$ nM). Valeurs de p déterminées avec un test de Mann et Whitney.

Les données apportées par le *BH3 profiling* impliquent de préciser la définition de « dépendance » aux protéines anti-apoptotiques. En effet, le terme de dépendance peut renvoyer à deux concepts biologiques différents : (1) la dépendance pour la survie ou (2) la dépendance mitochondriale pour l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, il est intéressant de noter que pour la lignée LP-1, l'extinction de Mcl-1 par technique de SiRNA n'induit qu'environ 20% de mort cellulaire. A l'inverse, l'antagonisation de Mcl-1 par le peptide MS1 induit la perméabilisation de la MME de la majorité des cellules. De nouveau, ces données appuie les conséquences différentes de (1) l'extinction d'une protéine anti-apoptotique versus (2) la dissociation des complexes entre cette protéine anti-apoptotique et les protéines pro-apoptotiques qu'elle séquestre.

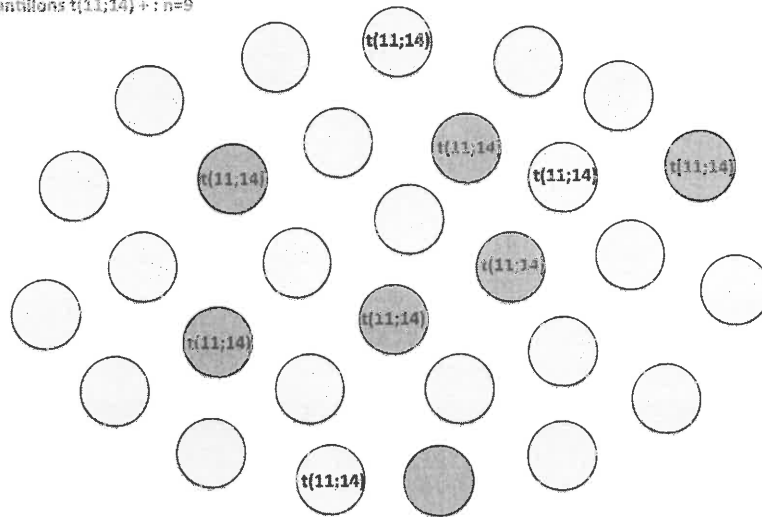
En additionnant les données de nos deux travaux concernant la sensibilité des cellules de MM à l'ABT-199, nous avons pu analyser un total de 29 échantillons dans des conditions comparables. En tout, 7 échantillons (24%) ont été trouvés sensibles à l'ABT-199 ($DL_{50} < 100$ nM). De manière intéressante, 6 de ces 7 prélèvements sensibles sont positifs pour la translocation t(11;14). De plus, trois échantillons présentant la translocation t(11;14) ont été retrouvés résistants à l'ABT-199. Ces résultats sont schématisés dans la Figure 29 et soulignent l'association entre la sensibilité à l'ABT-199 et la présence de la translocation t(11 ;14).

Figure 29: Schéma bilan des échantillons primaires testés à l'ABT-199

Nombre total d'échantillons testés: n=29

Echantillons sensibles à l'ABT-199: n=7

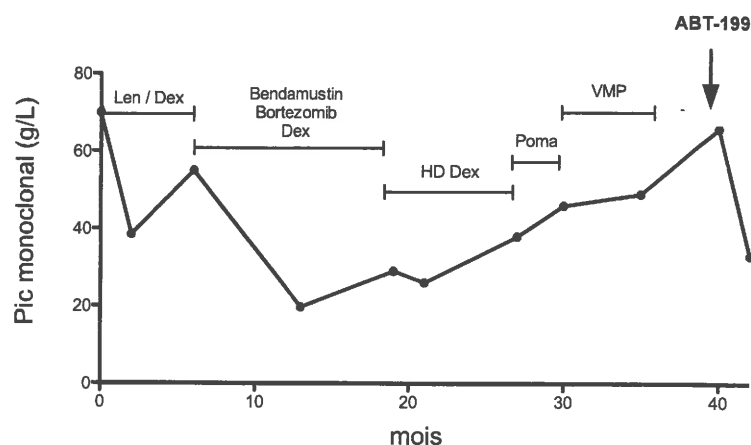
Echantillons t(11;14) + : n=9



Les mécanismes sous-tendant cette association entre la dépendance à Bcl-2 et la translocation t(11 ;14) ne sont à ce jour pas précisés. L'étude de ces mécanismes constitue une perspective importante de ce travail.

Sur la base de ces données *in vitro* et sous réserve d'effectifs encore modérés, il apparaît qu'une minorité de patients (environ 20%) peuvent bénéficier d'un traitement par ABT-199. Au cours de l'essai de phase 1 testant l'ABT-199 en monothérapie (essai Abbvie NCT01794520), 2 patients ont obtenu une rémission complète et 3 patients ont obtenu une réponse partielle. Les données clinico-biologiques de l'un de ces patients, inclus dans le centre de Nantes, sont résumées dans la Figure 30. De manière intéressante, ces 5 patients répondeurs présentaient tous un MM t(11;14). Dans cet essai, aucune réponse n'a été enregistrée parmi les patients non t(11 ;14). Ainsi, les données de cet essai clinique semblent valider le message porté par ce travail de thèse concernant l'association entre la t(11 ;14) et la Bcl-2 dépendance dans le MM.

Figure 30: Réponse clinique à l'ABT-199 obtenue chez un patient atteint de myélome réfractaire



Légende : Len, lenalidomide ; Dex, dexaméthasone ; HD, High-Dose ; Poma, pomalidomide ; VMP Velcade-Melphalan-Prednisone.

Patient de 73 ans atteint de myélome multiple en rechute, réfractaire aux 3 dernières lignes de traitement. Inclusion dans l'essai de phase 1 Abbvie testant l'ABT-199 en monothérapie. Obtention d'une réponse significative après 2 cycles : réduction de 49% du pic monoclonal. Après stabilisation de cette réponse pendant 3 nouveaux cycles, le patient a de nouveau progressé.

Lors de la réalisation d'essais cliniques ayant pour objectif principal l'efficacité et non la tolérance, il nous apparaît essentiel de sélectionner les patients selon un bio-marqueur prédisant la dépendance à Bcl-2.

Conclusion

La survie des cellules tumorales repose principalement sur un déséquilibre entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 constituent des cibles thérapeutiques attractives. Les BH3 mimétiques sont des petites molécules capables de restaurer l'apoptose des cellules tumorales en libérant les protéines pro-apoptotiques séquestrées par Bcl-2 et/ou de Bcl-X_L.

Mon travail de thèse a évalué la sensibilité *in vitro* aux BH3 mimétiques (ABT-737 et ABT-199) des cellules tumorales de deux syndromes lymphoprolifératifs matures, le MM et le LCM. Pour ces deux modèles, nous avons pu mettre en évidence une importante hétérogénéité de sensibilité à ces drogues. L'expression relative de Bcl-2 et de Mcl-1 a été montrée comme un facteur majeur sous-tendant la sensibilité aux BH3 mimétiques. L'analyse de la dépendance mitochondriale à Bcl-2 des cellules tumorales par la technique du *BH3 profiling* s'avère également un bio-marqueur précieux de la sensibilité aux BH3 mimétiques. De manière intéressante, nous avons démontré dans le myélome multiple que la sensibilité à l'ABT-199 était principalement retrouvée dans le sous groupe des patients présentant une translocation t(11,14). Ce message important semble validé par les données préliminaires de l'essai de phase 1 testant l'ABT-199 en monothérapie chez des patients atteints de myélome en rechute, puisque les réponses significatives n'ont été observées que chez des patients avec translocation t(11 ;14).

De nombreux essais clinique sont actuellement en cours afin d'évaluer l'ABT-199 dans le LCM et le MM. Il nous apparait important de valider de manière prospective dans le cadre de ces essais cliniques, les bio-marqueurs décrits dans ce travail de thèse (ratio Bcl-2/Mcl-1, *BH3 profiling*, *t(11 ;14) dans le MM*), afin de pouvoir à terme mieux sélectionner les patients les plus à même de bénéficier de cette drogue.

Annexe

Biological rational for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma

David Chiron¹, Christelle Dousset^{1,2,3,*}, Carole Brosseau^{1,*}, Cyrille Touzeau^{1,2}, Sophie Maïga^{1,2}, Philippe Moreau^{1,2}, Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2}, Steven Le Guill^{1,2,3}, Martine Amiot^{1,2}

¹INSERM, UMR892 - CNRS, UMR 6299, Université de Nantes, France

²Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France

³CIC, INSERM, Nantes, France

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:

Martine Amiot, e-mail: martine.amiot@inserm.fr

Keywords: ABT-199, mantle cell lymphoma, apoptosis, Bcl-2 family members, ibrutinib

Received: February 04, 2015

Accepted: February 08, 2015

Published: March 05, 2015

ABSTRACT

The aggressive biological behavior of mantle cell lymphoma (MCL) and its short response to current treatment highlight a great need for better rational therapy. Herein, we investigate the ability of ABT-199, the Bcl-2-selective BH3 mimetic, to kill MCL cells. Among MCL cell lines tested ($n = 8$), only three were sensitive ($LD_{50} < 200$ nM). In contrast, all primary MCL samples tested ($n = 11$) were highly sensitive to ABT-199 ($LD_{50} < 10$ nM). Mcl-1 and Bcl-x_L both confer resistance to ABT-199-specific killing and *BCL2/(BCLXL+MCL1)* mRNA ratio is a strong predictor of sensitivity. By mimicking the microenvironment through CD40 stimulation, we show that ABT-199 sensitivity is impaired through activation of NF- κ B pathway and Bcl-x_L up-regulation. We further demonstrate that resistance is rapidly lost when MCL cells detach from CD40L-expressing fibroblasts. It has been reported that ibrutinib induces lymphocytosis *in vivo* holding off malignant cells from their protective microenvironment. We show here for two patients undergoing ibrutinib therapy that mobilized MCL cells are highly sensitive to ABT-199. These results provide evidence that *in situ* ABT-199 resistance can be overcome when MCL cells escape from the lymph nodes. Altogether, our data support the clinical application of ABT-199 therapy both as a single agent and in sequential combination with BTK inhibitors.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is a mature B-cell neoplasm characterized by an aggressive clinical course. Although recent progress in the treatment of MCL patients has yielded high complete response rates, relapse invariably occurs and MCL remains incurable [1, 2]. This highlights the necessity to uncover the mechanisms involved in tumor cell survival and drug resistance. The primary oncogenic event in MCL is the t(11;14) translocation resulting in cyclin D1 overexpression and consequent cell cycle dysregulation [3]. However,

additional mechanisms are required for MCL progression, including alteration of the mitochondrial apoptotic pathway, which mainly determines cell fate [4–6]. Among the critical components of the apoptotic machinery, the anti-apoptotic protein Bcl-2 is overexpressed in MCL cells and may then represent an attractive target for innovative therapy. BH3 mimetics, such as ABT-737 and ABT-263 (navitoclax), which bind with high affinity Bcl-2 and Bcl-x_L have been developed. They displace pro-apoptotic proteins from Bcl-2 and Bcl-x_L and induce apoptosis through a Bax or Bak dependent manner [7, 8]. Recently, navitoclax has demonstrated antitumor activity

in B-cell malignancies but its clinical development was limited by the significant thrombocytopenia caused by Bcl-x_L inhibition [9]. To overcome this toxicity, the first-in-class orally bioavailable Bcl-2-selective BH3 mimetic ABT-199 was developed and thus far has shown very promising antitumor activity while sparing platelets in chronic lymphoid leukemia (CLL) and B-cell lymphomas, including MCL [10, 11].

Recently it has been demonstrated that tumor microenvironment strongly influence proliferation, survival and drug resistance in MCL cells [12, 13]. Moreover, microenvironment has been implicated in BH3 mimetic resistance via the modulation of Bcl-2 family proteins expression in CLL cells [14–16]. In the present study, we investigated the apoptotic efficiency of ABT-199 in both MCL cell lines and primary cells by integrating the key role of the microenvironment. This led us to propose a rational combination strategy to overcome microenvironment-dependent ABT-199 resistance through prior induction of cellular egress in peripheral blood using the selective BTK inhibitor ibrutinib [17].

RESULTS

Mantle cell lymphoma sensitivity to ABT-199 correlates with *BCL2/(MCL1+BCLXL)* gene expression ratio

To determine sensitivity of MCL cells to ABT-199, cell lines ($n = 8$) were treated with increasing doses of ABT-199 for 48 hours. As shown in Table 1A, the efficacy of ABT-199 was heterogeneous among MCL cell lines. Indeed, MAVER-1, MINO and GRANTA-519 cells were found to be highly sensitive to ABT-199 (LD₅₀ from 15 to 200 nM) while Z138, JeKo-1, REC-1, JVM2 and UPN-1 were found to be resistant (LD₅₀ from 1000 to 10000 nM) (Table 1A). We next addressed ABT-199 sensitivity in primary MCL cells obtained from peripheral blood of 11 patients at diagnosis or relapse. In contrast to MCL cell lines, low doses of ABT-199 (10 nM) induced cell death in all samples, ranging from 53% to 98% indicating that primary cells presented a LD₅₀ < 10 nM (Table 1B).

We next analyzed the sensitivity to ABT-199 in regards to the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family members determined by RT-qPCR in both cell lines and primary samples (Table 1). Whereas *BCL2* and *MCL1* levels were similar in both cell lines and primary cells, *BCLXL* mRNA expression was significantly lower in primary MCL cells ($p = 0.002$) (Fig. 1A). We previously reported that the *BCL2/MCL1* ratio was a powerful biomarker for predicting ABT-737 sensitivity in MCL [18]. Using both MCL cell lines and primary cells we found here a direct correlation between ABT-199 sensitivity threshold and *MCL1* and *BCLXL* anti-apoptotic gene expression. Indeed, whereas neither *BCL2/MCL1* nor

BCL2/BCL2XL mRNA ratios were sufficient (Supplementary Fig. S1A), *BCL2/(MCL1+BCLXL)* mRNA ratio discriminated sensitive from resistant MCL cells with a cut-off value of 0.67 ($p < 0.001$; Fig. 1B). Of note, the Bcl-2/(Mcl-1+Bcl-x_L) protein ratio strongly correlated with the mRNA ratio in MCL cells ($p < 0.001$; Supplementary Fig. S1B–S1C). Taken together, these data suggest that both Bcl-x_L and Mcl-1 expression play a role in ABT-199 resistance in MCL through increase of the apoptotic threshold.

To investigate the role of Bcl-x_L and Mcl-1 in ABT-199 response, these anti-apoptotic proteins were knocked down using siRNA in both Z138 and JeKo-1 resistant cells. Mcl-1 silencing sensitized both cell lines to lower doses of ABT-199 confirming the critical role of Mcl-1 in BH3-mimetics resistance as previously shown (Fig. 1C) [18]. Bcl-x_L silencing also sensitized Z138 and JeKo-1 cells to ABT-199, to a lesser extent than Mcl-1 silencing which may be explained by a lower silencing efficacy (Fig. 1C–1D). These results confirm that both Bcl-x_L and Mcl-1 determine ABT-199-specific response in MCL cells.

CD40 stimulation reduces ABT-199 efficacy in MCL cells

Because MCL cells mainly reside in lymph nodes we next asked whether microenvironment interactions could impact their sensitivity to ABT-199. In order to mimic the lymph node microenvironment where CD40-CD40L interaction takes place, ABT-199 sensitive MCL cell lines (MINO and MAVER-1) were cultured on CD40L-expressing fibroblast L cells (L-40L). Co-culture with L-40L dramatically reduces their sensitivity to ABT-199 while co-culture with parental fibroblast L cells failed to induce significant resistance (Fig. 2A). Of note, primary MCL cells from patients were also significantly more resistant to ABT-199 when cultured on L-40L with 25 nM of ABT-199 ($n = 6$; $p < 0.001$) (Fig. 2B). By contrast, culture of MINO cells with conditioned medium from L-40L culture or with bone marrow stromal cells (HS5) failed to reduce ABT-199 sensitivity (data not shown). These results indicate that the CD40 pathway is directly involved in the resistance to ABT-199 in both MCL cell lines and primary cells.

Bcl-x_L up-regulation by CD40 stimulation confers resistance to ABT-199

To assess the involvement of Bcl-2 family proteins in ABT-199 resistance under CD40 stimulation, we examined their expression following co-culture with either L or L-40L fibroblasts. CD40 stimulation of ABT-199 sensitive MCL cell lines resulted in a strong up-regulation of Bcl-x_L proteins within 6 to 24 hours of co-culture while

A

Cell lines	LD ₅₀ ABT-199	<i>BCL2</i>	<i>MCL1</i>	<i>BCLXL</i>	(<i>BCL2</i>)/ (<i>MCL1</i> + <i>BCLXL</i>)
MAVER-1	15	6.55	0.92	2.01	2.24
MINO	100	1.38	0.60	1.25	0.75
GRANTA-519	200	3.90	0.89	2.16	1.28
Z138	1000	0.98	0.67	1.95	0.37
REC-1	5000	0.68	1.79	3.77	0.12
JVM2	5000	1.48	1.44	2.83	0.35
JeKo-1	7000	1.00	1.00	1.00	0.50
UPN-1	10000	0.01	0.45	1.10	0.00

B

Patient	Status	ABT-199 (10 nM)% of cytotoxicity	<i>BCL2</i>	<i>MCL1</i>	<i>BCLXL</i>	(<i>BCL2</i>)/ (<i>MCL1</i> + <i>BCLXL</i>)
#1	Diag	53	2.76	0.82	0.27	2.53
#2	Diag	56	2.10	0.78	1.07	1.14
#3	Rel	56	3.77	0.9	1.1	1.96
#4	Rel	58	ND	ND	ND	ND
#5	Diag	62	3.57	1.59	0.95	1.41
#6	Diag	62	1.69	1.08	0.32	1.22
#7	Rel	66	1.78	0.8	0.5	1.43
#8	Diag	69	1.20	0.90	0.30	1.00
#9	Diag	69	2.05	1.03	1.11	0.96
#10	Diag	77	1.51	0.40	0.30	2.16
#11	Rel	98	ND	ND	ND	ND

Table 1: MCL cell sensitivity to ABT-199 correlates with the *BCL2*/(*MCL1*+*BCLXL*) ratio. (A) Cell lines were cultured with increasing doses of ABT-199 for 48 hours to determine the median lethal dose (LD₅₀: 15-10000 nM). (B) MCL cells from peripheral blood were obtained after gradient density centrifugation on Ficoll Hypaque. MCL cells were cultured with 10 nM of ABT-199 for 24 hours. Diag: diagnosis, Rel: relapse, ND: data not determined. The relative expression of *BCL2*, *MCL1* and *BCLXL* mRNA was defined on purified CD19⁺ cells as described in the Methods section and *BCL2*/(*MCL1*+*BCLXL*) mRNA ratio is indicated. Analysis of *BCLXL*, *MCL1* and *BCL2* relative expression in primary MCL cells and cell lines are shown in Figure 1A. Correlation between *BCL2*/(*MCL1*+*BCLXL*) ratio and ABT-199 sensitivity is shown in Figure 1B.

no modification of Mcl-1 or Bcl-2 levels was observed (Fig. 3A). The CD40-induced Bcl-x_L expression was then confirmed at the mRNA level in MINO and MAVER-1 cell lines (Fig. 3C).

CD40 activation is known to potently activate both classical and alternative NF-κB pathway [19], which

mediate Bcl-x_L upregulation [20]. Thus, we investigated NF-κB activation through the phosphorylation of IκBα and accumulation of p52 in MCL cell lines under CD40 stimulation. As shown in Fig. 3A both classical (p-IκB) and alternative (p52) NF-κB pathways were activated under CD40 stimulation in both MINO and MAVER-1

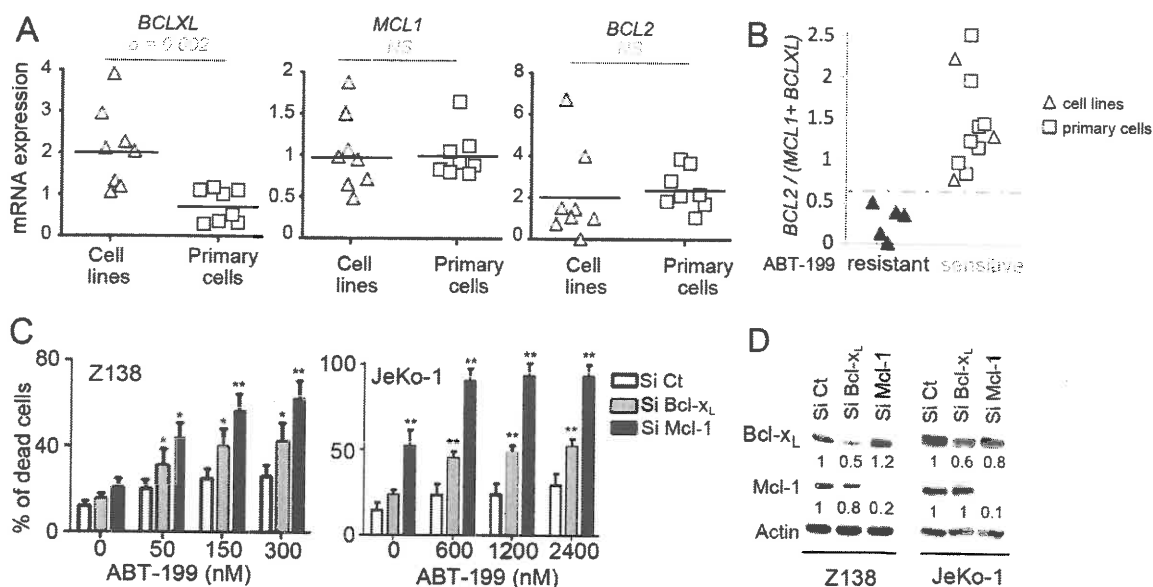


Figure 1: Influence of Bcl-2 family anti-apoptotic proteins on ABT-199 sensitivity in MCL cells. A. Analysis of the relative expression of *BCLXL*, *MCL1* and *BCL2* mRNA by RT-qPCR in MCL cell lines ($n = 8$) and primary MCL cells ($n = 8$). The relative expression was normalized to JeKo-1 cell line. B. The $BCL2/(MCL1+BCLXL)$ mRNA ratio correlates with ABT-199 sensitivity in MCL cells. Cells with a $LD_{50} < 200$ nM were defined as sensitive whereas cells with a $LD_{50} > 1000$ nM were defined as resistant. The cut-off value (0.67) was determined as the mean of $BCL2/(MCL1+BCLXL)$ ratio of resistant cells + (standard deviation) $\times 2$ (True positive rate: 100%). C. Both Mcl-1 and Bcl-x_L confer primary resistance to ABT-199. Z138 and JeKo-1 cell lines were transfected with Si Control (Ct), Mcl-1 or Bcl-x_L. Following transfection, cells were treated with ABT-199 for 24 hours and cell death was quantified by Apo2.7 staining. p -value was determined using the paired Student's t test: * $p < .05$; ** $p < .01$. D. The protein levels of Mcl-1 and Bcl-x_L were determined by immunoblotting.

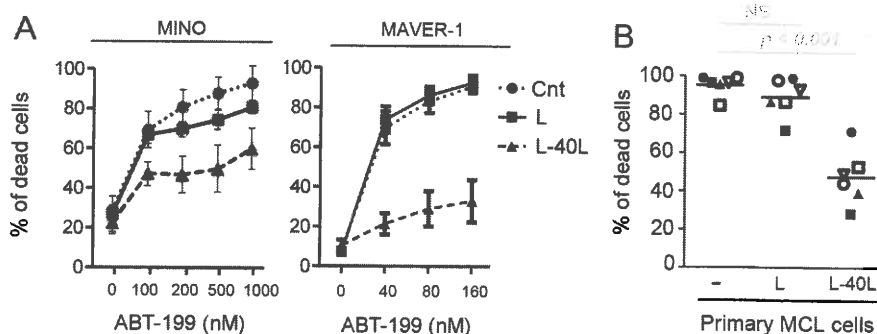


Figure 2: CD40 stimulation resulted in strong resistance to ABT-199. A. MCL cell lines were cultured alone or on either parental fibroblast L or CD40L-expressing fibroblasts L (L-40L) for 24 hours before being exposed to ABT-199. Cell death was assessed in triplicate by using Apo2.7 staining. B. Primary MCL cells were cultured alone or on either L or L-40L cells for 24 hours then exposed to 25 nM ABT-199 for 48 hours. Apoptosis was determined by Apo2.7 and CD19 staining.

cells (Fig. 3A). Of interest, CD40 stimulation (24 hours) of primary MCL cells ($n = 3$) also demonstrated a strong Bcl-x_L upregulation associated to the activation of both classical and alternative NF- κ B pathways (Fig. 3B).

To further confirm the critical role of Bcl-x_L in the resistance to ABT-199 induced by CD40 stimulation, we transiently silenced its expression by RNAi. siRNAs against *BCLXL* in MINO cells impaired protein

up-regulation upon CD40 stimulation and significantly prevented the resistance to ABT-199 confirming a critical role for Bcl-x_L in cell protection (Fig. 3D).

Because MCL cells frequently disseminate from lymph nodes into circulation, we mimicked this process by removing MINO or primary MCL cells from L40-L before assessing Bcl-x_L levels in order to determine whether resistance to ABT-199 would persist after

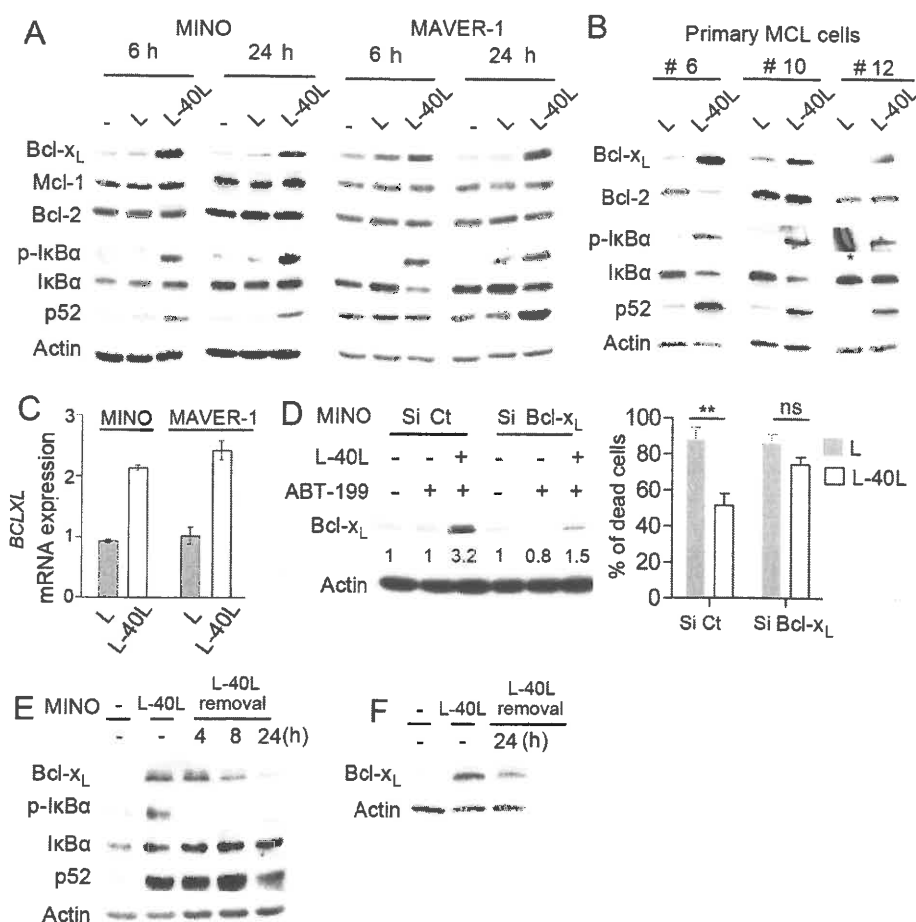


Figure 3: Up-regulation of Bcl-x_L by CD40 stimulation confers ABT-199 resistance to MINO cells. **A.** Immunoblot analysis of Bcl-2 family (Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-2) and NF-κB (pIκB, IκB, p52) proteins expression in MINO and MAVER-1 cells cultured on either parental L or L-40L for 6 and 24 hours. **B.** Immunoblot analysis of indicated proteins in primary MCL samples cultured on either L or L-40L cells for 24 hours. * indicates non-specific staining **C.** *BCLXL* mRNA was measured by RT-qPCR in MINO and MAVER-1 cells treated as indicated in A. **D.** Left panel: MINO cells were transfected with Si Control (Ct) or Bcl-x_L and silencing at the protein level was confirmed by immunoblotting. Right panel: following 24 hours of transfection, cells were cultured on either L or L-40L cells before being treated with ABT-199 for additional 48 hours. **(E-F)** MINO cells **E.** and primary MCL cells **F.** cultured on L-40L for 24 hours were removed from coculture support and cultured alone for indicated time and analyzed by immunoblotting.

detachment from L40-L. We observed a rapid decrease of IκBα phosphorylation as well as a progressive reduction of p52 and Bcl-x_L protein level to baseline levels within 24 hours after detachment from L40-L (Fig. 3E-3F). Taken together, these results suggest that ABT-199 resistance due to CD40/CD40L interaction is linked to Bcl-x_L upregulation and that sensitivity could be rapidly restored after egress of MCL cells from their protective microenvironment.

Ex-vivo analysis of the acquired peripheral CD19⁺CD5⁺ population following ibrutinib treatment of MCL patients demonstrates high sensitivity to ABT-199

Ibrutinib is an irreversible BTK inhibitor that displays significant antitumor activity in MCL [21].

By inhibiting BCR and chemokine-mediated stromal adhesion of MCL, ibrutinib has been shown to induce a redistribution of lymph node-resident MCL [22]. Thus, we investigated the lymphocyte population in the peripheral blood of a patient that received ibrutinib (560 mg/d) every day for days 1–7 while treated in the French compassionate use program. Blood was collected and analyzed for the presence of CD19⁺ CD5⁺ MCL cells before treatment and at days 2 and 7 following ibrutinib treatment. As shown in Fig. 4, the peripheral CD19⁺ CD5⁺ lymphocyte population increased from 16% to 21% after 2 days and to 61% after 7 days of ibrutinib treatment, indicating a cellular mobilization (lymphocytosis) from tissues as previously described (Fig. 4A) [22]. Annexin-V staining demonstrated that only 9% or 25% of the tumor cell population undergoes spontaneous apoptosis at days 2 and 7 following ibrutinib treatment respectively

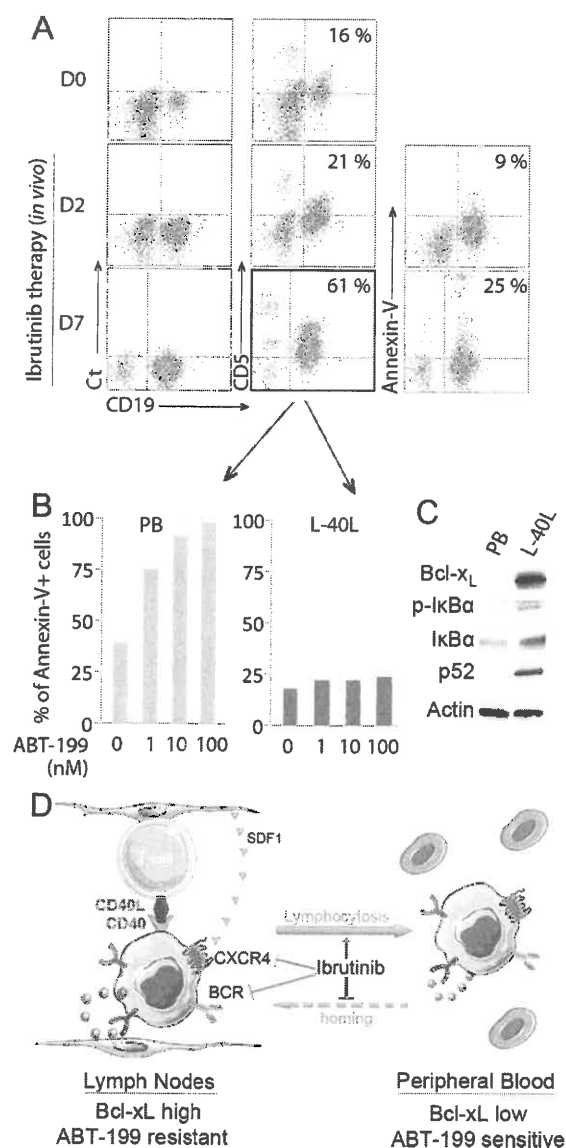


Figure 4: Sensitivity of mobilized primary MCL cells to ABT-199 in a patient treated with ibrutinib. **A.** Peripheral blood (PB) cells from a MCL patient were collected before (D0) and after ibrutinib treatment (D2 and D7) and labeled with CD19-APC and CD5-FITC. The percentage of CD19⁺ CD5⁺ population is indicated in each dot plot. In addition, apoptosis of CD19⁺ MCL cells at D2 and D7 was assessed by Annexin V-FITC staining with the percentage of apoptotic cells indicated in each dot plot. **B.** After 7 days of *in vivo* ibrutinib single-agent treatment, freshly isolated *de novo* CD19⁺CD5⁺ PB cells were cultured with increasing doses of ABT-199 for 24 hours directly or after coculture with L-40L cells. Cell death was assessed by Annexin V-FITC and CD19 staining. **C.** Expression of Bcl-x_L and activation of the classical (p-IkB, IkB) or alternative (p52) NF-κB pathway was analyzed in *de novo* CD19⁺ MCL peripheral blood cells with or without L-40L coculture. **D.** Schematic representation of ibrutinib mechanism of action in MCL cells. By inhibiting BTK, ibrutinib neutralize both BCR and CXCR4 axis, resulting in egress of MCL cells from the protective microenvironment into peripheral blood.

(Fig. 4A). In order to analyze the cytotoxic efficiency of ABT-199 on tumor cells mobilized from lymph nodes, peripheral blood population obtained on day 7 was treated with increasing doses of ABT-199 for 24 hours. We found that the CD19⁺ population was highly sensitive to ABT-199, with a LD50 < 1 nM, confirming that tumor cells mobilized from tissues following ibrutinib treatment could be efficiently targeted by ABT-199 (Fig. 4B). The ABT-199 sensitivity of ibrutinib-mobilized cells was further confirmed in a second patient who displayed an

increase absolute lymphocyte count (1.9 fold) 10 days after ibrutinib (Supplementary Figure S2A-S2C). *Ex-vivo* co-culture of the peripheral blood population obtained on day 7 on L-40L confirmed ABT-199-resistance (Fig. 4B, Supplementary Fig. S2C) as well as NFκB activation and Bcl-x_L up-regulation (Fig. 4C). Thus, we hypothesize that without ibrutinib-specific inhibition of homing into the lymph nodes, circulating cells would become resistant to ABT-199. According to our hypothesize, we demonstrated that while ibrutinib increased the sensitivity of MINO cells

to ABT-199, the activity of ibrutinib was not sufficient to significantly reverse the protection observed on L-40L co-culture (Supplementary Fig. S3).

DISCUSSION

The opportunity to induce apoptosis by selectively targeting Bcl-2 with ABT-199 is a potentially promising therapeutic approach in hematological malignancies [10, 23, 24]. MCL cell lines showed a similar sensitivity to ABT-199 than the one previously described for ABT-737 [18], despite the selective affinity of ABT-199 for Bcl-2 but not Bcl-x_L. However, ABT-199 efficiency may be increased thanks to a higher affinity to its selective target Bcl-2 (x100 fold) [10]. Indeed, we observed that ABT-199 kills 3 out of 8 MCL cell lines while it is broadly active against all primary MCL cells tested ($n = 11$) at low doses ($LD_{50} < 10$ nM) (Table 1). We next demonstrated that ABT-199 sensitivity is significantly correlated to *BCL2/(MCL1+BCLXL)* ratio indicating that both Mcl-1 and Bcl-x_L play a key role in intrinsic ABT-199 resistance (Fig. 1). Of note, until now we didn't observe intrinsic resistance to ABT-199 in the primary MCL cells tested. However, analysis of a larger number of primary cells could potentially reveal ABT-199 resistance due to specific mutation in the Bcl-2 target or in Bax effector protein as recently reported [25].

Accumulating data indicate that the microenvironment is a critical factor for cancer cell survival and thus has to be considered for the development of successful new treatment strategies. In this respect, special attention has been paid to modifications occurring in CLL cells stimulated by fibroblasts expressing CD40L, resulting in ABT-737 resistance [14, 15, 26]. Using this coculture system to mimic the microenvironment within lymph nodes, we have shown here that CD40 stimulation of MCL cell lines and patient samples significantly reduce ABT-199 sensitivity (Fig. 2). We demonstrated that (i) peripheral blood MCL cells express low level of Bcl-x_L and are highly sensitive to ABT-199, (ii) upon CD40 stimulation there is an increase in Bcl-x_L protein level but not Mcl-1 or Bcl-2, and (iii) that silencing of BCL-x_L overcomes ABT-199 resistance induced by CD40 stimulation. Taken together our study highlight a critical role for Bcl-x_L in microenvironment-dependent protection of MCL cells to ABT-199.

As previously reported [20], we confirmed that NF- κ B-signaling pathway is involved in CD40-dependent Bcl-x_L up-regulation (Fig. 3). Mechanistically, our results imply that over-expression of Bcl-x_L alters the balance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and it is the tempting to hypothesize that Bcl-x_L is able to capture the pro-apoptotic proteins endogenously bound to Bcl-2 and released under ABT-199 treatment. Of note, among the three MCL cell lines highly sensitive to ABT-199, MINO cells lacks Bim expression in contrast

to MAVER-1 and GRANTA-519 cells, indicating that the efficacy of ABT-199 is not affected by the absence of Bim (data not shown).

It was shown recently that ibrutinib, a highly potent oral Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, interferes with the homing of MCL cells into secondary lymphoid organs and/or bone marrow through the inhibition of chemokine and BCR signaling [22]. In agreement with this mechanism of action, ibrutinib induces a concomitant increase of circulating MCL cells [22]. Since circulating primary MCL cells are highly sensitive to ABT-199, it would suggest that combining ABT-199 with ibrutinib could be a very effective therapy for MCL patients. Indeed, we have demonstrated that ABT-199 resistance is rapidly lost when MCL cells detach from CD40L expressing fibroblast cells and that peripheral MCL cells isolated from a patient undergoing ibrutinib treatment were sensitized to ABT-199-mediated killing. Taken together, these results indicate that ABT-199 resistance can be overcome when MCL cells escape from the microenvironments (Fig. 4D).

Based on high response rates in a phase 2 clinical data, ibrutinib was recently approved by the FDA for the treatment of MCL [21]. However, approximately one third of patients did not respond and some became resistant to ibrutinib during treatment [21, 27, 28]. Because ABT-199 kills MCL cells through a distinct mechanism of action and is particularly potent against peripheral MCL cells mobilized by ibrutinib, these agents could be highly complementary and beneficial to patients with significant unmet medical need. Their favorable toxicity profiles may also facilitate their combination in future clinical trials. Furthermore, a recent study demonstrated synergistic effect of the ibrutinib and ABT-199 combination on apoptosis induction in several MCL cell lines [29]. However, while ibrutinib increased the sensitivity of MINO cells to ABT-199, this drug combination was not sufficient to reverse the protection induced by the CD40/CD40L interaction. These last results reinforce the interest of sequential strategy taking advantage of ibrutinib-induced lymphocytosis.

In conclusion, the Bcl-2-selective BH3 mimetic ABT-199 is a promising agent for the treatment of B-cell malignancies including MCL and may be especially attractive in combination with BCR signaling inhibitory drugs such as ibrutinib, which can drive malignant cells out of the protective microenvironment of lymph nodes and bone marrow.

MATERIALS AND METHODS

MCL cells and cell lines

MCL cell lines JeKo-1, MINO, REC-1, MAVER-1 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany), Z138 was purchased from ATCC (Manassas, USA),

GRANTA-519 and UPN-1 were kindly provided by Dr. V. Ribrag (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and Dr B. Sola (IFR 146, University of Caen, France), respectively. Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine. Primary cells were obtained after informed consent from MCL patients treated at the department of clinical hematology from the University hospital of Nantes, France. The patient described in Fig. 4 received ibrutinib single agent therapy (560 mg/d) and achieved a partial response lasting 4 months before progression. The patient described in Supplementary Fig. S2 was still under ibrutinib single agent therapy (560 mg/d) at the time of publication. Peripheral MCL cells from blood were purified after Ficoll-Hypaque separation with immunomagnetic anti-CD19 beads when MCL infiltration was less than 90% (Miltenyi, Paris, France). Primary MCL cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine.

Parental or CD40L-expressing mouse fibroblast L cells were kindly provided by Dr T. Defrance (Lyon, France). L cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine. For the co-culture experiments, L cell were irradiated with 35 Gray or treated with mitomycin and seeded (2.5×10^4 cells/mL) 6 to 24 hours before MCL cell lines (2.5×10^5 cells/mL) or primary cells (5×10^5 cells/mL). ABT-199 was then added for 48 hours.

Antibodies and reagents

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: anti-Apo2.7-PE, anti-CD5-FITC, anti-CD19-APC and control IgG1-FITC mAbs were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Analysis of protein expression was conducted by immunoblotting using the following primary antibodies: anti-Bcl-2, anti-I κ B α and anti-phospho-I κ B α (Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), Anti-Mcl-1 (S19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Bcl-x_L (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Anti-NF- κ B p52 Antibody and anti-actin (Merck Millipore, Lyon, France). ABT-199 was kindly provided by Abbvie Laboratories (North Chicago, IL, USA) and the selective BTK inhibitor ibrutinib (PCI-32765) was obtained from Selleck Chemicals (Souffelweyersheim, France).

Viability assays

Cell death in MCL cell lines was assessed by using Apo-2.7 staining (BD Biosciences Le Pont de Claix, France). Cell death in CD19⁺ primary MCL cells was assessed by Apo-2.7 staining combined with an analysis of altered cellular morphology (lower FSC). Alternatively, apoptosis of primary cells was assessed by Annexin

V-FITC staining (Beckman coulter). Fluorescence was analyzed on FACSCalibur (Cytocell, SFR Bonamy).

siRNA transient transfections

Control non-targeted small interfering siRNA (si Ct) and siRNA against *BCLXL* and *MCL1* were purchased from Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). Z138 and MINO cell lines were electroporated using a Nucleofector system (Amaxa, Lonza, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Cells (5×10^5 /ml) were suspended in Nucleofector solution T or SF and electroporated in the presence of 10 μ mol/L siRNA (T01 for MINO, CM150 for Z138 and DN100 for JeKo-1). The gene-silencing effect was evaluated by immunoblot analysis.

Quantitative real-time PCR

Quantitative PCR was performed as previously described [30]. TaqMan gene expression assays for *BCL2* (Hs00608023_m1), *MCL1* (Hs00172036_m1), *BCLXL* (*BCL2L1*; Hs00236329_m1) and *RPL37a* (Hs01102345_m1) were purchased from Applied Biosystems. The following thermal cycling parameters were used: 50°C for 2 min for optimal AmpErase UNG activity and then 40 cycles at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. Amplification of the housekeeping gene *RPL37a* was conducted for each sample as an endogenous control.

Immunoblot analysis

Cells were collected and lysed in lysis buffer containing 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% TritonX100, 2 mM PMSF and 2 mg/ml aprotinin. Immunoblot analysis was performed according to published protocols [18].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank AbbVie for supporting in part this study. This study was supported by Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest and by Actions Cancer 44. DC was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and CHU de Nantes (AO jeunes chercheurs). We thank Dr Joel Levenson for helpful discussions and for critical review of the manuscript and Dr Benoit Tessoulin for helpful information on MCL patients.

REFERENCES

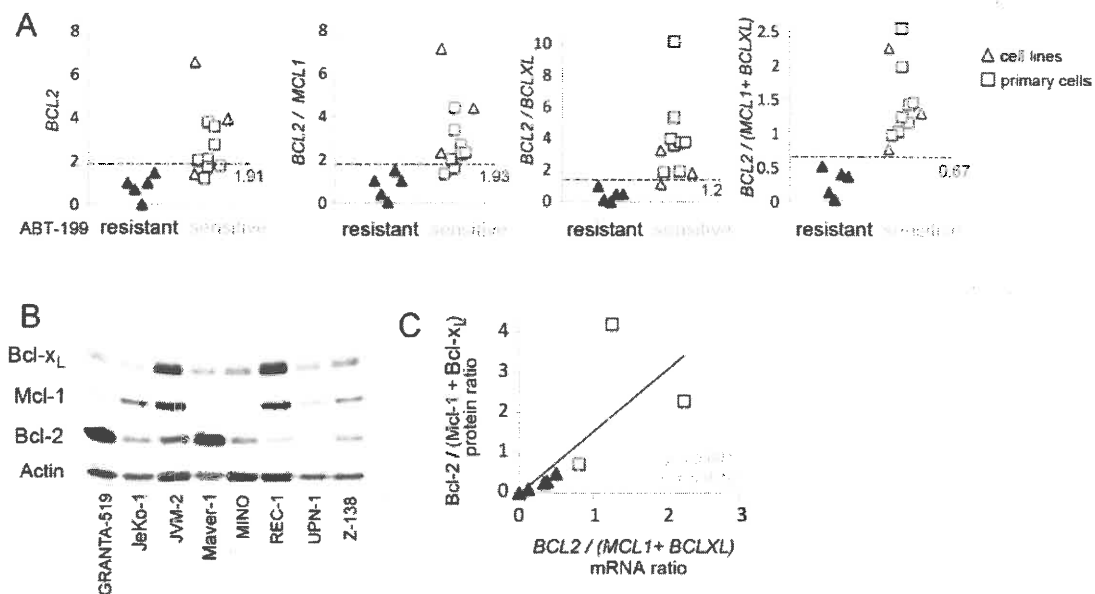
1. Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Beà S, Klapper W, Vogt N, Delfau-Larue M-H, Hutter G, Cheah C, Chiappella A, Cortelazzo S, Pott C, Hess G, Visco C, et al. Update on the molecular pathogenesis and clinical

treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54:699–707.

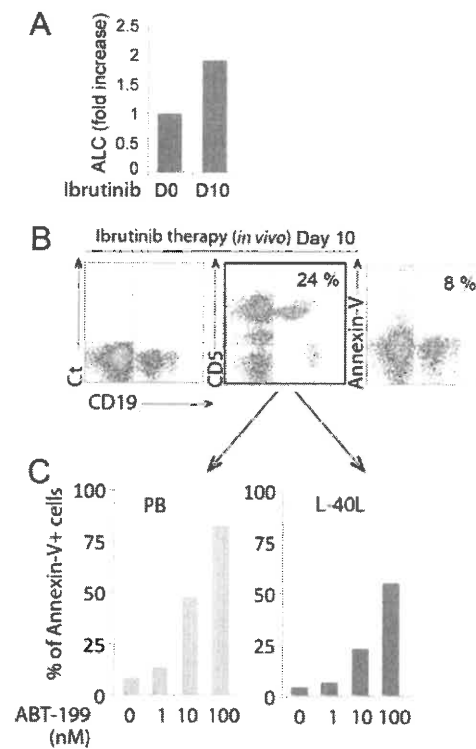
2. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Vehling-Kaiser U, Doorduijn JK, Coiffier B, Forstpointner R, Tilly H, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012; 367:520–31.
3. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012; 122:3416–3423.
4. Bae S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernández V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernández L, Navarro A, Ott G, Rosenwald A, Estivill X, Campo E. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*. 2009; 113:3059–69.
5. Ek S, Högerkorp C-M, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CAK. Mantle Cell Lymphomas Express a Distinct Genetic Signature Affecting Lymphocyte Trafficking and Growth Regulation as Compared with Subpopulations of Normal Human B Cells. *Cancer Res*. 2002; 62:4398–405.
6. Hofmann W-K, Vos de S, Tsukasaki K, Wachsman W, Pinkus GS, Said JW, Koeffler HP. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*. 2001; 98:787–794.
7. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell*. 2007; 12:171–185.
8. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao Y, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008; 68:3421–3428.
9. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H, Cui Y, Busman TA, McKeegan EM, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol*. 2012; 30:488–496.
10. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013; 19:202–8.
11. Davids MS, Letai A. ABT-199: Taking Dead Aim at BCL-2. *Cancer Cell*. 2013; 23:139–141.
12. Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21:308–312.
13. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009; 113:4604–4613.
14. Tromp JM, Geest CR, Breij ECW, Elias JA, van Laar J, Luijckx DM, Kater AP, Beaumont T, van Oers MH, Eldering E. Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:487–498.
15. Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun X-M, Dyer MJS, Cohen GM. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009; 113:4403–4413.
16. Davids MS, Deng J, Wiestner A, Lannutti BJ, Wang L, Wu CJ, Wilson WH, Brown JR, Letai A. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012; 120:3501–3509.
17. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, Li S, Pan Z, Thamm DH, Miller RA, Buggy JJ. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:13075–13080.
18. Touzeau C, Dousset C, Bodet L, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Moreau A, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Le Gouill S. ABT-737 Induces Apoptosis in Mantle Cell Lymphoma Cells with a Bcl-2 high/Mcl-1 low Profile and Synergizes with Other Antineoplastic Agents. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:5973–5981.
19. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J*. 2002; 21:5375–5385.
20. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:9136–9141.
21. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, Barrientos JC, Chmielewska E, Radford J, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013; 369:507–516.
22. Chang BY, Francesco M, De Rooij MFM, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, Kuil A, Herman SE, Chang S, Pals ST, Wilson W, Wiestner A, Spaargaren M, et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*. 2013; 122:2412–2424.
23. Ko TK, Chuah CT, Huang JW, Ng KP, Ong ST. The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced

- cell death in chronic myeloid leukemia progenitors. *Oncotarget*. 2014; 5:9033–9038.
24. Peirs S, Matthijssens F, Goossens S, Van de Walle I, Ruggero K, de Bock CE, Degryse S, Canté-Barrett K, Briot D, Clappier E, Lammens T, De Moerloose B, Benoit Y, et al. ABT-199 mediated inhibition of BCL-2 as a novel therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014. pii: blood-2014-05-574566.
 25. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, García-Barchino MJ, Martínez-Climent JA. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood*. 2014 Jun 26; 123:4111–9.
 26. Hallaert DYH, Jaspers A, van Noesel CJ, van Oers MHJ, Kater AP, Eldering E. c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood*. 2008; 112:5141–5149.
 27. Saba N, Wiestner A. Do mantle cell lymphomas have an “Achilles heel”? *Curr Opin Hematol*. 2014; 21:350–357.
 28. Chiron D, Di Liberto M, Martin P, Huang X, Sharman J, Bleuca P, Mathew S, Vijay P, Eng K, Ali S, Johnson A, Chang B, Ely S, et al. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C81S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014; 4:1022–1035.
 29. Zhao X, Bodo J, Sun D, Durkin L, Lin J, Smith MR, Hsi ED. Combination of ibrutinib with ABT-199: synergistic effects on proliferation inhibition and apoptosis in mantle cell lymphoma cells through perturbation of BTK, AKT, and BCL2 pathways. *Br J Haematol*. 2014 doi: 10.1111/bjh.13149.
 30. Maïga S, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Gratas C, Moreau P, Le Gouill S, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. Paradoxical effect of lenalidomide on cytokine/growth factor profiles in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2013; 108:1801–1806.

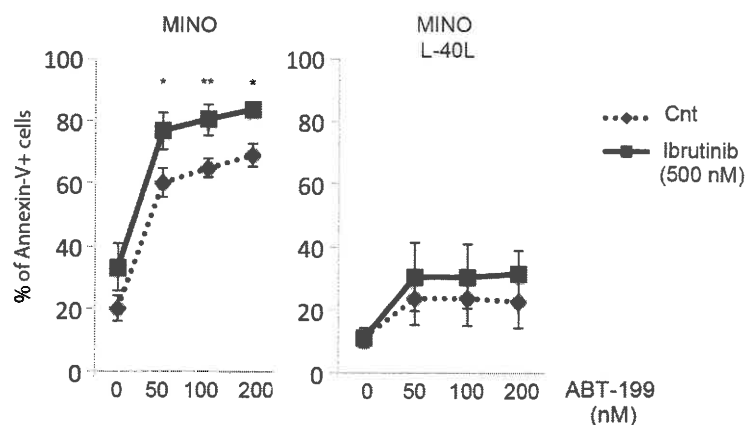
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure S1: MCL cell sensitivity to ABT-199 correlates with the Bcl-2/(Mcl-1+Bcl-xL) ratio. **A.** Correlative analysis of ABT-199 sensitivity with BCL2 mRNA expression as well as $BCL2/MCL1$, $BCL2/BCLXL$ and $BCL2/(MCL1+BCLXL)$ mRNA ratio were addressed. Cut-off values are represented by the dot line and were determined as: mean of resistant cells mRNA ratio + (standard deviation) $\times$ 2. The true positive rate (sensitivity) was determined by Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis: $BCL2$ 63%, $BCL2/MCL1$ 82%, $BCL2/BCLXL$ 91%, $BCL2/(MCL1+BCLXL)$ 100%. **B.** Immunoblotting analysis of Bcl-xL, Mcl-1 and Bcl-2 in the MCL cell lines panel ($n = 8$). **C.** Bcl-2/(Mcl-1+Bcl-xL) protein ratio was determined after quantification of protein expression shown in B and strongly correlates to the $BCL2/(MCL1+BCLXL)$ mRNA ratio (spearman, $p < 0.001$).



Supplementary Figure S2: Sensitivity of mobilized primary MCL cells to ABT-199 in a patient treated with ibrutinib. **A.** Increase of Absolute Lymphocyte Count (ALC) is observed 10 days after Ibrutinib treatment (D10) in the peripheral blood of a MCL patient. **B.** Peripheral blood (PB) cells were collected 10 days after Ibrutinib treatment (D10) and labeled with CD19-APC and CD5-FITC. The percentage of the CD19+CD5+ population is indicated. In addition, apoptosis of CD19+ MCL cells at D10 was assessed by Annexin-V-FITC staining. **C.** After 10 days of *in vivo* ibrutinib single-agent treatment, freshly isolated *de novo* CD19+CD5+ PB cells were cultured with increasing doses of ABT-199 for 24 hours directly or after coculture with L-40L cells. Cell death was assessed by Annexin-V and CD19 staining.



Supplementary Figure S3: *in situ* Ibrutinib and ABT-199 synergy is not sufficient to reverse CD40L-induced resistance. MINO cells were cultured alone or on CD40L-expressing fibroblasts L (L-40L) for 24 hours before being exposed to Ibrutinib and ABT-199 at indicated doses. Cell death was assessed in triplicate by using Annexin-V staining. *p*-value was determined using Student's *t* test: **p* < .05; ***p* < .01.

Références bibliographiques

- ABT-199 Shows Effectiveness in CLL (2014) *Cancer Discovery*, **4**, OF7.
- Akgul, C., Moulding, D.A., White, M.R. & Edwards, S.W. (2000a) In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS letters*, **478**, 72–76.
- Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R. & Edwards, S.W. (2000b) Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **57**, 684–691.
- Alapat, D., Coviello-Malle, J., Owens, R., Qu, P., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D. & Lorschach, R.B. (2012) Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*, **137**, 93–100.
- Albershardt, T.C., Salerni, B.L., Soderquist, R.S., Bates, D.J.P., Pletnev, A.A., Kisselev, A.F. & Eastman, A. (2011) Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 24882–24895.
- Andersen, N.S., Jensen, M.K., de Nully Brown, P. & Geisler, C.H. (2002) A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients: incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, **38**, 401–408.
- Aouacheria, A., Brunet, F. & Gouy, M. (2005) Phylogenomics of Life-Or-Death Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 2395–2416.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews. Cancer*, **2**, 420–430.
- 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., et al (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, **109**, 3489–3495.
- Avet-Loiseau, H., Garand, R., Gaillard, F., Daviet, A., Mellerin, M.P., Robillard, N., Bouyge, I., Arcot, S., Batzer, M., Talmant, P., Harousseau, J.L., Milpied, N. & Bataille, R. (1998) Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **23**, 175–182.
- Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S.S. &

- Rojanasakul, Y. (2006) S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 34124–34134.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. & 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**, 899–906.
- Bakkus, M.H., Heirman, C., Van Riet, I., Van Camp, B. & Thielemans, K. (1992) Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood*, **80**, 2326–2335.
- Bataille, R., Jégo, G., Robillard, N., Barillé-Nion, S., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Amiot, M. & 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**, 1234–1240.
- Beà, S., Valdés-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martín-Garcia, D., Jares, P., Giné, E., Pinyol, M., Royo, C., Nadeu, F., Conde, L., Juan, M., Clot, G., Vizán, P., Croce, L.D., Puente, D.A., López-Guerra, M., Moros, A., Roue, G., Aymerich, M., et al (2013) Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 18250–18255.
- Beierle, E.A., Strande, L.F. & Chen, M.K. (2002a) Insulin-like growth factor-I protects neuroblastoma against starvation-induced apoptosis and is associated with increased Bcl-2 expression. *Journal of Pediatric Surgery*, **37**, 472–476.
- Beierle, E.A., Strande, L.F. & Chen, M.K. (2002b) VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *Journal of Pediatric Surgery*, **37**, 467–471.
- Beltran, E., Fresquet, V., Martinez-Useros, J., Richter-Larrea, J.A., Sagardoy, A., Sesma, I., Almada, L.L., Montes-Moreno, S., Siebert, R., Gesk, S., Calasanz, M.J., Malumbres, R., Rieger, M., Prosper, F., Lossos, I.S., Piris, M.A., Fernandez-Zapico, M.E. & Martinez-Climent, J.A. (2011) A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 12461–12466.
- Benboubker, L., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J., Belch, A.R., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N., Banos, A., Tiab, M., Delforge, M., Cavenagh, J., Gheraldes, C., Lee, J.-J., Chen, C., Oriol, A., de la Rubia, J., Qiu, L., et al

- (2014) Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 906–917.
- Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. (2001) Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, **20**, 5611–5622.
- Bernard, M., Gressin, R., Lefrère, F., Drénou, B., Branger, B., Caulet-Maugendre, S., Tass, P., Brousse, N., Valensi, F., Milpied, N., Voilat, L., Sadoun, A., Ghandour, C., Hunault, M., Leloup, R., Mannone, L., Hermine, O. & Lamy, T. (2001) Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia*, **15**, 1785–1791.
- Bertoni, F. & Ponzoni, M. (2007) The cellular origin of mantle cell lymphoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 1747–1753.
- Bigelow, R.L.H., Chari, N.S., Unden, A.B., Spurgers, K.B., Lee, S., Roop, D.R., Toftgard, R. & McDonnell, T.J. (2004) Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1197–1205.
- Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Dousset, C., Descamps, G., Maïga, S., Avet-Loiseau, H., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C. & Amiot, M. (2011) ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood*, **118**, 3901–3910.
- Bodet, L., Ménoret, E., Descamps, G., Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., Le Gouill, S., Moreau, P., Amiot, M. & Gomez-Bougie, P. (2010) BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma. *British journal of cancer*, **103**, 1808–1814.
- Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneur, L., Marçais, A. & Marvel, J. (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1644**, 159–168.
- Bosch, F., López-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, J.M., Conde, E., Piris, M.A., Vallespi, T., Woessner, S. & Montserrat, E. (1998) Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*, **82**, 567–575.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M. & Strasser, A. (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, **286**, 1735–1738.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.-C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M. & Strasser, A. (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is

- required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, **415**, 922–926.
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T. & Lutz, R.J. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*, **11**, 1921–1928.
- Boyle, E.M., Davies, F.E., Leleu, X. & Morgan, G.J. (2014) Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*, **99**, 605–612.
- Brito, J.L.R., Walker, B., Jenner, M., Dickens, N.J., Brown, N.J.M., Ross, F.M., Avramidou, A., Irving, J.A.E., Gonzalez, D., Davies, F.E. & Morgan, G.J. (2009) MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*, **94**, 78–86.
- Carrington, E.M., Vikstrom, I.B., Light, A., Sutherland, R.M., Londrigan, S.L., Mason, K.D., Huang, D.C.S., Lew, A.M. & Tarlinton, D.M. (2010) BH3 mimetics antagonizing restricted prosurvival Bcl-2 proteins represent another class of selective immune modulatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 10967–10971.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M. & 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. *Molecular Cell*, **16**, 807–818.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, **23**, 2825–2837.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. & Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, **9**, 351–365.
- Chanan-Khan, A.A., Niesvizky, R., Hohl, R.J., Zimmerman, T.M., Christiansen, N.P., Schiller, G.J., Callander, N., Lister, J., Oken, M. & Jagannath, S. (2009) Phase III randomised study of dexamethasone with or without oblimersen sodium for patients with advanced multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, **50**, 559–565.
- Chang, B.Y., Francesco, M., De Rooij, M.F.M., Magadala, P., Steggerda, S.M., Huang, M.M., Kuil, A., Herman, S.E.M., Chang, S., Pals, S.T., Wilson, W., Wiestner, A., Spaargaren, M., Buggy, J.J. & Elias, L. (2013) Egress of CD19+CD5+ cells into peripheral blood following treatment with the BTK inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*.

- Chang, N.C., Nguyen, M., Germain, M. & Shore, G.C. (2010) Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *The EMBO journal*, **29**, 606–618.
- Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.-P., Ahmann, G.J., Adli, M., Anderson, K.C., Ardlie, K.G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P.L., Bernstein, B.E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S.B., Hofmeister, C.C., et al (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, **471**, 467–472.
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N. & Anderson, K.C. (2007) A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, **26**, 2374–2380.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. & Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science (New York, N.Y.)*, **278**, 1966–1968.
- Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Hardwick, J.M. (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature*, **379**, 554–556.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S.J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, **8**, 705–711.
- Cheng, E.H.Y., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J. & Korsmeyer, S.J. (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 513–517.
- 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. & Huang, D.C.S. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, **17**, 393–403.
- Chen, Z., Sangwan, V., Banerjee, S., Mackenzie, T., Dudeja, V., Li, X., Wang, H., Vickers, S.M. & Saluja, A.K. (2013) miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death. *Molecular Cancer*, **12**, 105.
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. & Rashmi, R. (2008) BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, **27 Suppl 1**, S20–29.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. &

- Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **303**, 1010–1014.
- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I. & Shin, H.S. (1995) A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, **11**, 1693–1698.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J. & Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, **96**, 615–624.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.-G., Kipps, T.J., Negrini, M. & Croce, C.M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13944–13949.
- Cinar, M., Hamedani, F., Mo, Z., Cinar, B., Amin, H.M. & Alkan, S. (2013) Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leukemia Research*, **37**, 1271–1277.
- Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M. & Sinclair, D.A. (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, **13**, 627–638.
- Cory, S. & Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer*, **2**, 647–656.
- Coultas, L., Bouillet, P., Stanley, E.G., Brodnicki, T.C., Adams, J.M. & Strasser, A. (2004) Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Blk/Nbk is expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 1570–1581.
- Coultas, L., Terzano, S., Thomas, T., Voss, A., Reid, K., Stanley, E.G., Scott, C.L., Bouillet, P., Bartlett, P., Ham, J., Adams, J.M. & Strasser, A. (2007) Hrk/DP5 contributes to the apoptosis of select neuronal populations but is dispensable for haematopoietic cell apoptosis. *Journal of Cell Science*, **120**, 2044–2052.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **15**, 49–63.
- Danial, N.N. (2007) BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **13**, 7254–7263.

- Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, **116**, 205–219.
- Davids, M.S.P., John M. Kahl, Brad S. Wierda, William G. Miller, Thomas P. Gerecitano, John F. Kipps, Thomas J. Anderson, Mary-Ann Huang, David C.S. Rudersdorf, Nikita K. Gressick, Lori A. Montalvo, Nicholas P. CCRP, Yang, Jianning Busman, Todd A. Dunbar, Martin DPH, Cerri, Elisa Enschede, Sari H. Humerickhouse, Rod A. Roberts, Andrew W. (2013) Bcl-2 Inhibitor ABT-199 (GDC-0199) Monotherapy Shows Anti-Tumor Activity Including Complete Remissions In High-Risk Relapsed/Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Small Lymphocytic Lymphoma (SLL). *Blood*, **122**, 872–872.
- Davids, M.S., Roberts, A.W., Anderson, M.A., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Gerecitano, J.F., Darden, D.E., Nolan, C.E., Gressick, L.A., Yang, J., Chyla, B.J., Busman, T.A., Graham, A.M., Cerri, E., Enschede, S.H., Humerickhouse, R.A. & Seymour, J.F. (2012) The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*, **120**, 304.
- Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S. & Hinds, M.G. (2005) Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 4738–4744.
- Decaux, O., Lodé, L., Magrangeas, F., Charbonnel, C., Gouraud, W., Jézéquel, P., Attal, M., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Bataille, R., Campion, L., Avet-Loiseau, H., Minvielle, S. & Intergroupe Francophone du Myélome (2008) Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 4798–4805.
- Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, **22**, 8543–8567.
- Van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., Adams, J.M., Roberts, A.W. & Huang, D.C.S. (2006) The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, **10**, 389–399.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q. & Cheng, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **14**, 193–209.

- Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M. & 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**, 171–185.
- Dengler, M.A., Weilbacher, A., Gutekunst, M., Staiger, A.M., Vöhringer, M.C., Horn, H., Ott, G., Aulitzky, W.E. & van der Kuip, H. (2014) Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma. *Cell Death & Disease*, **5**, e1013.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T. & May, W.S. (2004) Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 153–158.
- Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B. & May, W.S. (2000) Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 1578–1583.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P. & May, W.S. (2001) Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 23681–23688.
- Denisov, A.Y., Madiraju, M.S.R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C. & Gehring, K. (2003) Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 21124–21128.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Bataille, R. & 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**, 194–199.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J. & Zeiher, A.M. (1999) Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, **189**, 1815–1822.
- Dimopoulos, M., Kyle, R., Fermand, J.-P., Rajkumar, S.V., San Miguel, J., Chanan-Khan, A., Ludwig, H., Joshua, D., Mehta, J., Gertz, M., Avet-Loiseau, H., Beksac, M., Anderson, K.C., Moreau, P., Singhal, S., Goldschmidt, H., Boccadoro, M., Kumar, S., Giralt, S., Munshi, N.C., et al (2011) Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, **117**, 4701–4705.
- Dispenzieri, A., Stewart, A.K., Chanan-Khan, A., Rajkumar, S.V., Kyle, R.A., Fonseca, R., Kapoor, P., Bergsagel, P.L., McCurdy, A., Gertz, M.A., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Russell,

- S.J., Zeldenrust, S.R., Reeder, C., Roy, V., Buadi, F., Dingli, D., Hayman, S.R., Leung, N., et al (2013) Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? *Blood*, **122**, 4172–4181.
- Dodou, K., Anderson, R.J., Small, D.A.P. & Groundwater, P.W. (2005) Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **14**, 1419–1434.
- Doi, K., Li, R., Sung, S.-S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., Amin, S., Cheng, C., Qin, Y., Schonbrunn, E., Daughdrill, G., Loughran, T.P., Sebti, S. & Wang, H.-G. (2012) Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 10224–10235.
- Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K. & Schöneich, C. (2004) Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *The Biochemical Journal*, **383**, 361–370.
- Dreyling, M., Geisler, C., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H.C., Le Gouill, S., Rule, S., Shpilberg, O., Walewski, J., Ladetto, M. & ESMO Guidelines Working Group (2014) Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **25 Suppl 3**, iii83–iii92.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S. & Scott, F.L. (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, **7**, 988–994.
- Egan, J.B., Shi, C.-X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., Middha, S., Asmann, Y., Schmidt, J., Braggio, E., Keats, J.J., Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Craig, D.W., Carpten, J.D. & Stewart, A.K. (2012) Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, **120**, 1060–1066.
- Eichhorn, J.M., Alford, S.E., Hughes, C.C., Fenical, W. & Chambers, T.C. (2013) Purported Mcl-1 inhibitor marinopyrrole A fails to show selective cytotoxicity for Mcl-1-dependent cell lines. *Cell Death & Disease*, **4**, e880.
- Ek, S., Högerkorp, C.-M., Dictor, M., Ehinger, M. & Borrebaeck, C.A.K. (2002) Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Research*, **62**, 4398–4405.

- Facon, T., Mary, J.Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J.L., Guillermin, G., Chaletteix, C., Dib, M., Voillat, L., Maisonneuve, H., Troncy, J., Dorvaux, V., Monconduit, M., Martin, C., Casassus, P., Jaubert, J., Jardel, H., et al (2007) Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*, **370**, 1209–1218.
- Fan, F., Tonon, G., Bashari, M.H., Vallet, S., Antonini, E., Goldschmidt, H., Schulze-Bergkamen, H., Opferman, J.T., Sattler, M., Anderson, K.C., Jäger, D. & Podar, K. (2014) Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer Letters*, **343**, 286–294.
- Fernández de Larrea, C., Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Ludwig, H., Usmani, S., Vesole, D.H., Hajek, R., San Miguel, J.F., Sezer, O., Sonneveld, P., Kumar, S.K., Mahindra, A., Comenzo, R., Palumbo, A., Mazumber, A., Anderson, K.C., Richardson, P.G., Badros, A.Z., Caers, J., Cavo, M., et al (2013) Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*, **27**, 780–791.
- Fisher, R.I., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Stadtmauer, E.A., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L. & Goy, A. (2006) Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **24**, 4867–4874.
- Foight, G.W., Ryan, J.A., Gullá, S.V., Letai, A. & Keating, A.E. (2014) Designed BH3 Peptides with High Affinity and Specificity for Targeting Mcl-1 in Cells. *ACS chemical biology*.
- Von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. (1997) The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*, **7**, 147–154.
- Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M.J. & Martinez-Climent, J.A. (2014) Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood*, **123**, 4111–4119.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J. & Yeh, E.T. (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 39458–39465.

- Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., et al (2005) Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, **106**, 4315–4321.
- Fulda, S. (2014) Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins in hematological malignancies: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*, **28**, 1414–1422.
- Fulda, S. & Vucic, D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **11**, 109–124.
- Furukawa, Y., Iwase, S., Kikuchi, J., Terui, Y., Nakamura, M., Yamada, H., Kano, Y. & Matsuda, M. (2000) Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 21661–21667.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D. & Letai, A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**, 112–121.
- Del Gaizo Moore, V., Schlis, K.D., Sallan, S.E., Armstrong, S.A. & Letai, A. (2008) BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **111**, 2300–2309.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, **14**, 1237–1243.
- Gandhi, L., Camidge, D.R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C.L., McKeegan, E.M., Litvinovich, E., Hemken, P.M., Dive, C., Enschede, S.H., Nolan, C., Chiu, Y.-L., Busman, T., Xiong, H., Krivoschik, A.P., Humerickhouse, R., Shapiro, G.I. & Rudin, C.M. (2011) Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 909–916.
- Garand, R., Avet-Loiseau, H., Accard, F., Moreau, P., Harousseau, J.L. & Bataille, R. (2003) t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia*, **17**, 2032–2035.
- Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F.,

- Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G.S. & Machleidt, W. (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 27217–27226.
- Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M. & Barillé, S. (2001) Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, **98**, 3527–3533.
- Golstein, P. & Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, **32**, 37–43.
- Gomez-Bougie, P., Ménoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C. & Amiot, M. (2011) Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **413**, 460–464.
- Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.-X., Yuan, Y. & Zhuang, S.-M. (2013) MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*, **32**, 3071–3079.
- Le Gouill, S., Kröger, N., Dhedin, N., Nagler, A., Bouabdallah, K., Yakoub-Agha, I., Kanouni, T., Bulabois, C.E., Tournilhac, O., Buzyn, A., Rio, B., Moles, M.P., Shimoni, A., Bacher, U., Ocheni, S., Milpied, N., Harousseau, J.L., Moreau, P., Leux, C. & Mohty, M. (2012) Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a multicenter experience. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **23**, 2695–2703.
- Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P.G., Harousseau, J.-L. & Anderson, K.C. (2004) VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood*, **104**, 2886–2892.
- Goy, A., Sinha, R., Williams, M.E., Kalayoglu Basisik, S., Drach, J., Ramchandren, R., Zhang, L., Cicero, S., Fu, T. & Witzig, T.E. (2013) Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 3688–3695.
- Green, D.R. & Kroemer, G. (2004) The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science*, **305**, 626–629.
- Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro,

- M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., et al (2005) International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 3412–3420.
- Gressin, R., Caulet-Maugendre, S., Deconinck, E., Tournilhac, O., Gyan, E., Moles, M.P., El Yamani, A., Cornillon, J., Rossi, J.F., Le Gouill, S., Lepeu, G., Damaj, G., Celigny, P.S., Maisonneuve, H., Corront, B., Vilque, J.P., Casassus, P., Lamy, T., Colonna, M., Colombat, P., et al (2010) Evaluation of the (R)VAD+C regimen for the treatment of newly diagnosed mantle cell lymphoma. Combined results of two prospective phase II trials from the French GOELAMS group. *Haematologica*, **95**, 1350–1357.
- Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Darzentas, N., Murray, F., Delfau-Larue, M.-H., Pedersen, L.B., Lopez, A.N., Dagklis, A., Rombout, P., Beldjord, K., Kolstad, A., Dreyling, M.H., Anagnostopoulos, A., Tsaftaris, A., Mavragani-Tsipidou, P., Rosenwald, A., Ponzoni, M., Groenen, P., Ghia, P., Sander, B., et al (2011) Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*, **118**, 3088–3095.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100**, 57–70.
- Harousseau, J.-L., Avet-Loiseau, H., Attal, M., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Michallet, M., Facon, T., Garderet, L., Marit, G., Ketterer, N., Lamy, T., Voillat, L., Guilhot, F., Doyen, C., Mathiot, C. & Moreau, P. (2009) Achievement of at least very good partial response is a simple and robust prognostic factor in patients with multiple myeloma treated with high-dose therapy: long-term analysis of the IFM 99-02 and 99-04 Trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 5720–5726.
- Hartmann, E., Fernández, V., Moreno, V., Valls, J., Hernández, L., Bosch, F., Abrisqueta, P., Klapper, W., Dreyling, M., Hoster, E., Müller-Hermelink, H.K., Ott, G., Rosenwald, A. & Campo, E. (2008) Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 4966–4972.
- Heist, R.S., Fain, J., Chinnasami, B., Khan, W., Molina, J.R., Sequist, L.V., Temel, J.S., Fidias, P., Brainerd, V., Leopold, L. & Lynch, T.J. (2010) Phase I/II study of AT-101 with topotecan in relapsed and refractory small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung*

Cancer, **5**, 1637–1643.

- Hendriks, R.W., Yuvaraj, S. & Kil, L.P. (2014) Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature Reviews. Cancer*, **14**, 219–232.
- Hermine, O., Hoster, E., Walewski, J., Ribrag, V., Brousse, N., Thieblemont, C., Bouabdallah, R., Dohner, H., Feugier, P., Forspointner, R., Haioun, C., Kneba, M., Hanel, M., Casasnovas, O., Mertelsmann, R.H., Hallek, M., Bosly, A., Nowacki, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., et al (2012) Alternating Courses of 3x CHOP and 3x DHAP Plus Rituximab Followed by a High Dose ARA-C Containing Myeloablative Regimen and Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) Increases Overall Survival When Compared to 6 Courses of CHOP Plus Rituximab Followed by Myeloablative Radiochemotherapy and ASCT in Mantle Cell Lymphoma: Final Analysis of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). *ASH Annual Meeting Abstracts*, **120**, 151.
- Hernández, L., Beà, S., Pinyol, M., Ott, G., Katzenberger, T., Rosenwald, A., Bosch, F., López-Guillermo, A., Delabie, J., Colomer, D., Montserrat, E. & Campo, E. (2005) CDK4 and MDM2 Gene Alterations Mainly Occur in Highly Proliferative and Aggressive Mantle Cell Lymphomas with Wild-type INK4a/ARF Locus. *Cancer Research*, **65**, 2199–2206.
- Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, M.A., Piris, M.A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E.S., Campo, E. & Raffeld, M. (1996) p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, **87**, 3351–3359.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 425–479.
- Hershko, T. & Ginsberg, D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 8627–8634.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L. & Coiffier, B. (2009) Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 3822–3829.
- Hofmann, W.-K., Vos, S. de, Tsukasaki, K., Wachsman, W., Pinkus, G.S., Said, J.W. & Koeffler, H.P. (2001) Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*, **98**, 787–794.

- Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Adams, J.M. & Cory, S. (1999) Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death and Differentiation*, **6**, 525–532.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H.C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W.-D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W. & Unterhalt, M. (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 558–565.
- Hoster, E., Klapper, W., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H.C., Walewski, J., van Hoof, A., Trneny, M., Geisler, C.H., Di Raimondo, F., Szymczyk, M., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Hallek, M., Forstpointner, R., Pott, C., Ribrag, V., Doorduijn, J., Hiddemann, W., Dreyling, M.H. & Unterhalt, M. (2014) Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 1338–1346.
- Houot, R., Le Gouill, S., Ojeda Uribe, M., Mounier, C., Courby, S., Dartigeas, C., Bouabdallah, K., Alexis Vigier, M., Moles, M.P., Tournilhac, O., Arakelyan, N., Rodon, P., El Yamani, A., Sutton, L., Fornecker, L., Assouline, D., Harousseau, J.L., Maisonneuve, H., Caulet-Maugendre, S., Gressin, R., et al (2012) Combination of rituximab, bortezomib, doxorubicin, dexamethasone and chlorambucil (RiPAD+C) as first-line therapy for elderly mantle cell lymphoma patients: results of a phase II trial from the GOELAMS. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **23**, 1555–1561.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. & Hsueh, A.J.W. (1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 12401–12406.
- Huang, D.C., Adams, J.M. & Cory, S. (1998) The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *The EMBO journal*, **17**, 1029–1039.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M. & 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**, 191–199.

- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N. & Núñez, G. (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 4386–4391.
- Jamil, S., Mojtabavi, S., Hojabrpour, P., Cheah, S. & Duronio, V. (2008) An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 3212–3220.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J. & Duronio, V. (2005) A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *The Biochemical Journal*, **387**, 659–667.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B.D., Bryan, R.N., van Elsas, A., Müller, M., Wolff, K., Eichler, H.G. & Pehamberger, H. (1998) bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nature Medicine*, **4**, 232–234.
- Jardin, F., Picquenot, J.-M., Parmentier, F., Ruminy, P., Cornic, M., Penther, D., Bertrand, P., Lanic, H., Cassuto, O., Humbrecht, C., Lemasle, E., Wautier, A., Bastard, C. & Tilly, H. (2009) Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *British Journal of Haematology*, **146**, 607–618.
- Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. (2007) Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Reviews. Cancer*, **7**, 750–762.
- Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. (2012) Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, **122**, 3416–3423.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., McKinnon, P.J., Cleveland, J.L. & Zambetti, G.P. (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, **4**, 321–328.
- Kahl, B.S., Spurgeon, S.E., Furman, R.R., Flinn, I.W., Coutre, S.E., Brown, J.R., Benson, D.M., Byrd, J.C., Peterman, S., Cho, Y., Yu, A., Godfrey, W.R. & Wagner-Johnston, N.D. (2014) A phase 1 study of the PI3K δ inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*, **123**, 3398–3405.
- Kasper, S., Breitenbuecher, F., Heidel, F., Hoffarth, S., Markova, B., Schuler, M. & Fischer, T. (2012) Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies. *Blood Cancer Journal*, **2**, e60.
- Keats, J.J., Chesi, M., Egan, J.B., Garbitt, V.M., Palmer, S.E., Braggio, E., Van Wier, S.,

- Blackburn, P.R., Baker, A.S., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S.V., Carpten, J.D., Barrett, M., Fonseca, R., Stewart, A.K. & Bergsagel, P.L. (2012) Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, **120**, 1067–1076.
- Kelly, P.N., White, M.J., Goschnick, M.W., Fairfax, K.A., Tarlinton, D.M., Kinkel, S.A., Bouillet, P., Adams, J.M., Kile, B.T. & Strasser, A. (2010) Individual and overlapping roles of BH3-only proteins Bim and Bad in apoptosis of lymphocytes and platelets and in suppression of thymic lymphoma development. *Cell Death and Differentiation*, **17**, 1655–1664.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**, 239.
- Khoury, J.D., Medeiros, L.J., Rassidakis, G.Z., McDonnell, T.J., Abruzzo, L.V. & Lai, R. (2003) Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *The Journal of Pathology*, **199**, 90–97.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D. & Cheng, E.H.-Y. (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*, **8**, 1348–1358.
- Kim, J.-Y., Ahn, H.-J., Ryu, J.-H., Suk, K. & Park, J.-H. (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, **199**, 113–124.
- Kirkin, V., Joos, S. & Zörnig, M. (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1644**, 229–249.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, **14**, 5579–5588.
- Kitada, S., Leone, M., Sareth, S., Zhai, D., Reed, J.C. & Pellecchia, M. (2003) Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 4259–4264.
- Kline, M.P., Rajkumar, S.V., Timm, M.M., Kimlinger, T.K., Haug, J.L., Lust, J.A., Greipp, P.R. & Kumar, S. (2007) ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia*, **21**, 1549–1560.
- Kluin-Nelemans, H.C., Hoster, E., Hermine, O., Walewski, J., Trneny, M., Geisler, C.H.,

- Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Vehling-Kaiser, U., Doorduijn, J.K., Coiffier, B., Forstpointner, R., Tilly, H., Kanz, L., Feugier, P., Szymczyk, M., Hallek, M., Kremers, S., Lepeu, G., Sanhes, L., et al (2012) Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*, **367**, 520–531.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V.R., McQueen, T., Schober, W.D., Watt, J.C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F.C., Harris, D., et al (2006) Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, **10**, 375–388.
- Konopleva, M., Tari, A.M., Estrov, Z., Harris, D., Xie, Z., Zhao, S., López-Berestein, G. & Andreeff, M. (2000) Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood*, **95**, 3929–3938.
- Kouroukis, C.T., Belch, A., Crump, M., Eisenhauer, E., Gascoyne, R.D., Meyer, R., Lohmann, R., Lopez, P., Powers, J., Turner, R., Connors, J.M. & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2003) Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **21**, 1740–1745.
- Kouroukis, C.T., Fernandez, L.A.V., Crump, M., Gascoyne, R.D., Chua, N.S., Buckstein, R., Turner, R., Assouline, S., Klasa, R.J., Walsh, W., Powers, J. & Eisenhauer, E. (2011) A phase II study of bortezomib and gemcitabine in relapsed mantle cell lymphoma from the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (IND 172). *Leukemia & Lymphoma*, **52**, 394–399.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. & Craig, R.W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 3516–3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K. & Reed, J.C. (1995) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *The American Journal of Pathology*, **146**, 1309–1319.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789–795.

- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. & Kirchhoff, S. (2001) FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 8247–8254.
- Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Gertz, M.A., Buadi, F.K., Pandey, S., Kapoor, P., Dingli, D., Hayman, S.R., Leung, N., Lust, J., McCurdy, A., Russell, S.J., Zeldenrust, S.R., Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2014) Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, **28**, 1122–1128.
- Kunami, N., Katsuya, H., Nogami, R., Ishitsuka, K. & Tamura, K. (2014) Promise of Combining a Bcl-2 Family Inhibitor with Bortezomib or SAHA for Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Anticancer Research*, **34**, 5287–5294.
- Kurowska, M., Rudnicka, W., Kontny, E., Janicka, I., Chorazy, M., Kowalczewski, J., Ziółkowska, M., Ferrari-Lacraz, S., Strom, T.B. & Maśliński, W. (2002) Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **169**, 1760–1767.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell*, **17**, 525–535.
- Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Lust, J.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.E., Therneau, T.M. & Greipp, P.R. (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, **78**, 21–33.
- 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. & Rajkumar, S.V. (2007) Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, **356**, 2582–2590.
- Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., Manzl, C., Frenzel, A., O'Reilly, L., Strasser, A. & Villunger, A. (2008) Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *The Journal of Experimental Medicine*, **205**, 641–655.
- Lecluse, Y., Lebailly, P., Roulland, S., Gac, A.-C., Nadel, B. & Gauduchon, P. (2009) t(11;14)-

- positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*, **23**, 1190–1193.
- Lee, E.F. & Fairlie, W.D. (2012) Structural biology of the intrinsic cell death pathway: what do we know and what is missing? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **1**, e201204007.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. & Cheng, G. (1999) NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9136–9141.
- Lee, Y.K., Shanafelt, T.D., Bone, N.D., Strege, A.K., Jelinek, D.F. & Kay, N.E. (2005) VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*, **19**, 513–523.
- Lei, K. & Davis, R.J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 2432–2437.
- Leroux, D., Le Marc'Hadour, F., Gressin, R., Jacob, M.C., Keddari, E., Monteil, M., Caillot, P., Jalbert, P. & Sotto, J.J. (1991) Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? *British Journal of Haematology*, **77**, 346–353.
- Lessene, G., Czabotar, P.E. & Colman, P.M. (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **7**, 989–1000.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., Flygare, J.A., Gibbons, P., Kersten, W.J.A., Kulasegaram, S., Moss, R.M., Parisot, J.P., Smith, B.J., Street, I.P., Yang, H., Huang, D.C.S., et al (2013) Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nature Chemical Biology*, **9**, 390–397.
- Letai, A. (2005) BCL-2: found bound and drugged! *Trends in Molecular Medicine*, **11**, 442–444.
- Letai, A. (2006) Restoring cancer's death sentence. *Cancer Cell*, **10**, 343–345.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. & Korsmeyer, S.J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **2**, 183–192.
- Letai, A.G. (2008) Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews. Cancer*, **8**, 121–132.

- Leux, C., Maynadié, M., Troussard, X., Cabrera, Q., Herry, A., Le Guyader-Peyrou, S., Le Gouill, S. & Monnereau, A. (2014) Mantle cell lymphoma epidemiology: a population-based study in France. *Annals of Hematology*, **93**, 1327–1333.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, **115**, 2679–2688.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491–501.
- Lin, C.-F., Chen, C.-L., Chang, W.-T., Jan, M.-S., Hsu, L.-J., Wu, R.-H., Fang, Y.-T., Tang, M.-J., Chang, W.-C. & Lin, Y.-S. (2005) Bcl-2 Rescues Ceramide- and Etoposide-induced Mitochondrial Apoptosis through Blockage of Caspase-2 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 23758–23765.
- Linette, G.P., Li, Y., Roth, K. & Korsmeyer, S.J. (1996) Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9545–9552.
- Linkermann, A. & Green, D.R. (2014) Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, **370**, 455–465.
- Liu, G., Kelly, W.K., Wilding, G., Leopold, L., Brill, K. & Somer, B. (2009) An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 3172–3176.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P. & Kappler, J.W. (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*, **19**, 341–352.
- Lucas, K.M., Mohana-Kumaran, N., Lau, D., Zhang, X.D., Hersey, P., Huang, D.C., Weninger, W., Haass, N.K. & Allen, J.D. (2012) Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **18**, 783–795.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481–490.
- Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Gouraud, W., Lodé, L., Decaux, O., Godmer, P., Garderet, L., Voillat, L., Facon, T., Stoppa, A.M., Marit, G., Hulin, C., Casassus, P., Tiab, M., Voog, E., Randriamalala, E., Anderson, K.C., Moreau, P., Munshi, N.C. & Minvielle, S. (2013) Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*, **27**, 473–481.

- Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I.M. & Roccaro, A.M. (2012) Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, **2012**, 157496.
- Marcucci, G., Stock, W., Dai, G., Klisovic, R.B., Liu, S., Klisovic, M.I., Blum, W., Kefauver, C., Sher, D.A., Green, M., Moran, M., Maharry, K., Novick, S., Bloomfield, C.D., Zwiebel, J.A., Larson, R.A., Grever, M.R., Chan, K.K. & Byrd, J.C. (2005) Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 3404–3411.
- Martin, P., Chadburn, A., Christos, P., Weil, K., Furman, R.R., Ruan, J., Elstrom, R., Niesvizky, R., Ely, S., Diliberto, M., Melnick, A., Knowles, D.M., Chen-Kiang, S., Coleman, M. & Leonard, J.P. (2009) Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 1209–1213.
- Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., Huang, D.C.S. & Kile, B.T. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, **128**, 1173–1186.
- Mateos, M.-V., Hernández, M.-T., Giraldo, P., de la Rubia, J., de Arriba, F., López Corral, L., Rosiñol, L., Paiva, B., Palomera, L., Bargay, J., Oriol, A., Prosper, F., López, J., Olavarria, E., Quintana, N., García, J.-L., Bladé, J., Lahuerta, J.-J. & San Miguel, J.-F. (2013) Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, **369**, 438–447.
- Mazel, S., Burtrum, D. & Petrie, H.T. (1996) Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *The Journal of Experimental Medicine*, **183**, 2219–2226.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. & Korsmeyer, S.J. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, 79–88.
- McDonnell, T.J. & Korsmeyer, S.J. (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*, **349**, 254–256.
- McIlwain, D.R., Berger, T. & Mak, T.W. (2013) Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, a008656.
- Ménoret, E., Gomez-Bougie, P., Surget, S., Trichet, V., Oliver, L., Pellat-Deceunynck, C. &

- Amiot, M. (2010) Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS letters*, **584**, 487–492.
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., Rosenwald, A., Sugimoto, K.-J., Wheat, L.M., Karran, E.L., García, J.F., Sanchez, L., Prosper, F., Staudt, L.M., Pinkel, D., Dyer, M.J.S., et al (2007) Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood*, **109**, 271–280.
- Morales, A.A., Kurtoglu, M., Matulis, S.M., Liu, J., Siefker, D., Gutman, D.M., Kaufman, J.L., Lee, K.P., Lonial, S. & Boise, L.H. (2011) Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood*, **118**, 1329–1339.
- Moreau, P., Cavo, M., Sonneveld, P., Rosinol, L., Attal, M., Pezzi, A., Goldschmidt, H., Lahuerta, J.J., Marit, G., Palumbo, A., van der Holt, B., Bladé, J., Petrucci, M.T., Neben, K., san Miguel, J., Patriarca, F., Lokhorst, H., Zamagni, E., Hulin, C., Gutierrez, N., et al (2014) Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 2173–2180.
- Moreau, P., Miguel, J.S., Ludwig, H., Schouten, H., Mohty, M., Dimopoulos, M. & Dreyling, M. (2013) Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, **24**, vi133–vi137.
- Moreau, P., Richardson, P.G., Cavo, M., Orlowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A. & Harousseau, J.-L. (2012) Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, **120**, 947–959.
- Moreau, P. & Touzeau, C. (2013) Initial treatment of transplant candidates with multiple myeloma. *Seminars in Oncology*, **40**, 585–591.
- Moreau, P. & Touzeau, C. (2014) Elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *Future Oncology (London, England)*, **10**, 949–956.
- Morgan, G.J., Walker, B.A. & Davies, F.E. (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews. Cancer*, **12**, 335–348.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F. & Gores, G.J. (2007) mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, **26**, 6133–6140.
- Munshi, N.C., Hideshima, T., Carrasco, D., Shamma, M., Auclair, D., Davies, F., Mitsiades,

- N., Mitsiades, C., Kim, R.S., Li, C., Rajkumar, S.V., Fonseca, R., Bergsagel, L., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2004) Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood*, **103**, 1799–1806.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, **256**, 12–18.
- Nakano, K. & Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell*, **7**, 683–694.
- Nakazawa, K., Dashzeveg, N. & Yoshida, K. (2014) Tumor suppressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2 in the apoptotic response to DNA damage. *FEBS Journal*, **281**, 2937–2944.
- Navarro, A., Clot, G., Royo, C., Jares, P., Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Bikos, V., Darzentas, N., Papadaki, T., Salaverria, I., Pinyol, M., Puig, X., Palomero, J., Vegliante, M.C., Amador, V., Martinez-Trillos, A., Stefancikova, L., Wiestner, A., Wilson, W., Pott, C., et al (2012) Molecular Subsets of Mantle Cell Lymphoma Defined by the IGHV Mutational Status and SOX11 Expression Have Distinct Biologic and Clinical Features. *Cancer Research*, **72**, 5307–5316.
- Neutznier, A., Li, S., Xu, S. & Karbowski, M. (2012) The ubiquitin/proteasome system-dependent control of mitochondrial steps in apoptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **23**, 499–508.
- Newton, K., Dugger, D.L., Wickliffe, K.E., Kapoor, N., de Almagro, M.C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R.E., French, D.M., Webster, J., Roose-Girma, M., Warming, S. & Dixit, V.M. (2014) Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **343**, 1357–1360.
- Nguyen, M., Marcellus, R.C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S.R., Goulet, D., Viallet, J., Bélec, L., Billot, X., Acoca, S., Purisima, E., Wiegmanns, A., Cluse, L., Johnstone, R.W., Beauparlant, P. & Shore, G.C. (2007) Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 19512–19517.
- Ni Chonghaile, T., Sarosiek, K.A., Vo, T.-T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.-T., Mitsiades, C.S., Matulonis, U.A., Drapkin, R., Stone, R., Deangelo, D.J., McConkey, D.J., Sallan, S.E., Silverman, L., Hirsch, M.S., Carrasco, D.R., et al (2011) Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, **334**, 1129–1133.

- Niture, S.K. & Jaiswal, A.K. (2011) INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, **18**, 439–451.
- Nutt, S.L., Taubenheim, N., Hasbold, J., Corcoran, L.M. & Hodgkin, P.D. (2011) The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Seminars in Immunology*, **23**, 341–349.
- Oakes, S.A., Lin, S.S. & Bassik, M.C. (2006) The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Current Molecular Medicine*, **6**, 99–109.
- Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., Ward, T., Fox, S.B., Generali, D., Smyth, G.K., Strasser, A., Huang, D.C.S., Visvader, J.E. & Lindeman, G.J. (2012) Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 2766–2771.
- O'Brien, S.M., Claxton, D.F., Crump, M., Faderl, S., Kipps, T., Keating, M.J., Viallet, J. & Cheson, B.D. (2009a) Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **113**, 299–305.
- O'Brien, S.M., Cunningham, C.C., Golenkov, A.K., Turkina, A.G., Novick, S.C. & Rai, K.R. (2005) Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 7697–7702.
- O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A.B., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Gribben, J., Itri, L.M. & Rai, K.R. (2009b) 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 5208–5212.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. & Huang, D.C.S. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO Journal*, **17**, 384–395.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 1053–1058.
- Ofengeim, D. & Yuan, J. (2013) Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **14**, 727–736.

- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettekheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., et al (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, **435**, 677–681.
- Onodera, N., McCabe, N.R., Nachman, J.B., Johnson, F.L., Le Beau, M.M., Rowley, J.D. & Rubin, C.M. (1992) Hyperdiploidy arising from near-haploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **4**, 331–336.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C. & Korsmeyer, S.J. (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, **426**, 671–676.
- Orchard, J., Garand, R., Davis, Z., Babbage, G., Sahota, S., Matutes, E., Catovsky, D., Thomas, P.W., Avet-Loiseau, H. & Oscier, D. (2003) A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*, **101**, 4975–4981.
- O'Reilly, L.A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C. & Strasser, A. (2000) The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *The American Journal of Pathology*, **157**, 449–461.
- O'Reilly, L.A., Harris, A.W. & Strasser, A. (1997) bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8- T cell progenitors. *International Immunology*, **9**, 1291–1301.
- O'Reilly, L.A., Huang, D.C. & Strasser, A. (1996) The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *The EMBO journal*, **15**, 6979–6990.
- Oshima, T., Abe, M., Asano, J., Hara, T., Kitazoe, K., Sekimoto, E., Tanaka, Y., Shibata, H., Hashimoto, T., Ozaki, S., Kido, S., Inoue, D. & Matsumoto, T. (2005) Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*, **106**, 3160–3165.
- Owens, B. (2013) Kinesin inhibitor marches toward first-in-class pivotal trial. *Nature Medicine*, **19**, 1550.
- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M. & Green, D.R. (2005) The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 17975–17980.

- Paik, P.K., Rudin, C.M., Pietanza, M.C., Brown, A., Rizvi, N.A., Takebe, N., Travis, W., James, L., Ginsberg, M.S., Juergens, R., Markus, S., Tyson, L., Subzwari, S., Kris, M.G. & Krug, L.M. (2011) A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, **74**, 481–485.
- Palmer, A.E., Jin, C., Reed, J.C. & Tsien, R.Y. (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 17404–17409.
- Pandey, M.K., Gowda, K., Doi, K., Sharma, A.K., Wang, H.-G. & Amin, S. (2013) Proteasomal degradation of Mcl-1 by maritoclax induces apoptosis and enhances the efficacy of ABT-737 in melanoma cells. *PloS One*, **8**, e78570.
- Pan, R., Hogdal, L.J., Benito, J.M., Bucci, D., Han, L., Borthakur, G., Cortes, J., DeAngelo, D.J., Debose, L., Mu, H., Döhner, H., Gaidzik, V.I., Galinsky, I., Golfman, L.S., Haferlach, T., Harutyunyan, K.G., Hu, J., Levenson, J.D., Marcucci, G., Müschen, M., et al (2014) Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discovery*, **4**, 362–375.
- Paoluzzi, L., Gonen, M., Bhagat, G., Furman, R.R., Gardner, J.R., Scotto, L., Gueorguiev, V.D., Heaney, M.L., Manova, K. & O'Connor, O.A. (2008) The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies. *Blood*, **112**, 2906–2916.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D. & Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, **122**, 927–939.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z. & Lou, Z. (2011) MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, **470**, 124–128.
- Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S.L. & Tarlinton, D.M. (2013) Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nature Immunology*, **14**, 290–297.
- Peponi, E., Drakos, E., Reyes, G., Leventaki, V., Rassidakis, G.Z. & Medeiros, L.J. (2006) Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *The American Journal of Pathology*, **169**, 2171–2180.

- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E. & Colomer, D. (2006) The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, **107**, 257–264.
- Del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. & Nuñez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)*, **278**, 687–689.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T. & Fesik, S.W. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 3012–3017.
- Pighi, C., Gu, T.-L., Dalai, I., Barbi, S., Parolini, C., Bertolaso, A., Pedron, S., Parisi, A., Ren, J., Cecconi, D., Chilosì, M., Menestrina, F. & Zamò, A. (2011) Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, **34**, 141–153.
- Pinton, P. & Rizzuto, R. (2006) Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death & Differentiation*, **13**, 1409–1418.
- Podar, K., Gouill, S.L., Zhang, J., Opferman, J.T., Zorn, E., Tai, Y.-T., Hideshima, T., Amiot, M., Chauhan, D., Harousseau, J.-L. & Anderson, K.C. (2008) A pivotal role for Mcl-1 in Bortezomib-induced apoptosis. *Oncogene*, **27**, 721–731.
- Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M.-H., Beldjord, K., Böttcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van Dongen, J.J.M., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van Hoof, A.L., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., et al (2010) Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood*, **115**, 3215–3223.
- Pro, B., Leber, B., Smith, M., Fayad, L., Romaguera, J., Hagemester, F., Rodriguez, A., McLaughlin, P., Samaniego, F., Zwiebel, J., Lopez, A., Kwak, L. & Younes, A. (2008) Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, **143**, 355–360.
- Puthalakath, H. & Strasser, A. (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translation control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death & Differentiation*, **9**, 505.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C. & Strasser, A. (2001) Bim: a proapoptotic BH3-only protein regulated by

- interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 1829–1832.
- Puthier, D., Bataille, R. & Amiot, M. (1999a) IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *European Journal of Immunology*, **29**, 3945–3950.
- Puthier, D., Derenne, S., Barillé, S., Moreau, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. & Amiot, M. (1999b) Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *British Journal of Haematology*, **107**, 392–395.
- Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H., Ruddy, D., Kauffmann, A., Farsidjani, A., Derti, A., Rakiec, D., Naylor, T., Pfister, E., Kovats, S., Kim, S., Dietze, K., Dörken, B., Steidl, C., et al (2014) Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature Medicine*, **20**, 87–92.
- Raje, N. & Roodman, G.D. (2011) Advances in the Biology and Treatment of Bone Disease in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, **17**, 1278–1286.
- Ranger, A.M., Zha, J., Harada, H., Datta, S.R., Danial, N.N., Gilmore, A.P., Kutok, J.L., Le Beau, M.M., Greenberg, M.E. & Korsmeyer, S.J. (2003) Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9324–9329.
- Renner, C., Zinzani, P.L., Gressin, R., Klingbiel, D., Dietrich, P.-Y., Hitz, F., Bargetzi, M., Mingrone, W., Martinelli, G., Trojan, A., Bouabdallah, K., Lohri, A., Gyan, E., Biaggi, C., Cogliatti, S., Bertoni, F., Ghilmini, M., Brauchli, P., Ketterer, N. & Swiss SAKK and French GOELAMS group from European Mantle Cell Lymphoma Network (2012) A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica*, **97**, 1085–1091.
- Reuland, S.N., Goldstein, N.B., Partyka, K.A., Smith, S., Luo, Y., Fujita, M., Gonzalez, R., Lewis, K., Norris, D.A. & Shellman, Y.G. (2012) ABT-737 synergizes with Bortezomib to kill melanoma cells. *Biology Open*, **1**, 92–100.
- Richardson, P.G., Baz, R., Wang, M., Jakubowiak, A.J., Laubach, J.P., Harvey, R.D., Talpaz, M., Berg, D., Liu, G., Yu, J., Gupta, N., Di Bacco, A., Hui, A.-M. & Lonial, S. (2014) Phase 1 study of twice-weekly ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in relapsed/refractory multiple myeloma patients. *Blood*, **124**, 1038–1046.
- Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **8**, 405–413.

- Rinaldi, A., Kwee, I., Tadorelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., Baldini, L., Pruneri, G., Capella, C., Zucca, E., Cotter, F.E., Cigudosa, J.C., Catapano, C.V., Tibiletti, M.G. & Bertoni, F. (2006) Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, **132**, 303–316.
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K. & Korsmeyer, S.J. (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes & Development*, **14**, 23–27.
- Rizzatti, E.G., Falcão, R.P., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W.T., Okamoto, O.K. & Zago, M.A. (2005) Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *British Journal of Haematology*, **130**, 516–526.
- Roberts, A.W., Seymour, J.F., Brown, J.R., Wierda, W.G., Kipps, T.J., Khaw, S.L., Carney, D.A., He, S.Z., Huang, D.C.S., Xiong, H., Cui, Y., Busman, T.A., McKeegan, E.M., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H. & Humerickhouse, R. (2012) Substantial Susceptibility of Chronic Lymphocytic Leukemia to BCL2 Inhibition: Results of a Phase I Study of Navitoclax in Patients With Relapsed or Refractory Disease. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 488–496.
- Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Garand, R., Moreau, P., Pineau, D., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L. & Bataille, R. (2003) CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood*, **102**, 1070–1071.
- Romaguera, J.E., Medeiros, L.J., Hagemeister, F.B., Fayad, L.E., Rodriguez, M.A., Pro, B., Younes, A., McLaughlin, P., Goy, A., Sarris, A.H., Dang, N.H., Samaniego, F., Brown, H.M., Gagneja, H.K. & Cabanillas, F. (2003) Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer*, **97**, 586–591.
- Roué, G., Pérez-Galán, P., López-Guerra, M., Villamor, N., Campo, E. & Colomer, D. (2007) Selective inhibition of IkappaB kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **178**, 1923–1930.
- Rubio-Moscardo, F., Climent, J., Siebert, R., Piris, M.A., Martín-Subero, J.I., Nieländer, I., Garcia-Conde, J., Dyer, M.J.S., Terol, M.J., Pinkel, D. & Martinez-Climent, J.A. (2005) Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*, **105**, 4445–4454.

- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T.H.-T., Fend, F., Jaffe, E.S., Quintanilla-Martinez, L. & Raffeld, M. (2006) Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, **108**, 1668–1676.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., Ranson, M.R., Dive, C., McKeegan, E.M., Chyla, B.J., Dowell, B.L., Chakravarty, A., Nolan, C.E., Rudersdorf, N., Busman, T.A., Mabry, M.H., et al (2012) Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **18**, 3163–3169.
- Rummel, M.J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G.A., von Grünhagen, U., Losem, C., Kofahl-Krause, D., Heil, G., Welslau, M., Balser, C., Kaiser, U., Weidmann, E., Dürk, H., Ballo, H., Stauch, M., Roller, F., Barth, J., Hoelzer, D., Hinke, A., Brugger, W., et al (2013) Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **381**, 1203–1210.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K. & May, W.S. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25436–25442.
- Ryan, J. & Letai, A. (2013) BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods (San Diego, Calif.)*, **61**, 156–164.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861–2874.
- Samaha, H., Dumontet, C., Ketterer, N., Moullet, I., Thieblemont, C., Bouafia, F., Callet-Bauchu, E., Felman, P., Berger, F., Salles, G. & Coiffier, B. (1998) Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*, **12**, 1281–1287.
- San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K.M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M.-V., Anderson, K.C., Esseltine, D.L., Liu, K., Cakana, A., van de Velde, H., et al (2008) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, **359**, 906–917.
- San Miguel, J., Weisel, K., Moreau, P., Lacy, M., Song, K., Delforge, M., Karlin, L.,

- Goldschmidt, H., Banos, A., Oriol, A., Alegre, A., Chen, C., Cavo, M., Garderet, L., Ivanova, V., Martinez-Lopez, J., Belch, A., Palumbo, A., Schey, S., Sonneveld, P., et al (2013) Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, **14**, 1055–1066.
- Sarkozy, C., Terré, C., Jardin, F., Radford, I., Roche-Lestienne, C., Penther, D., Bastard, C., Rigaudeau, S., Pilorge, S., Morschhauser, F., Bouscary, D., Delarue, R., Farhat, H., Rousselot, P., Hermine, O., Tilly, H., Chevret, S. & Castaigne, S. (2014) Complex karyotype in mantle cell lymphoma is a strong prognostic factor for the time to treatment and overall survival, independent of the MCL international prognostic index. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **53**, 106–116.
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P. & Letai, A. (2013) BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Molecular Cell*, **51**, 751–765.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. & Fesik, S.W. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **275**, 983–986.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D.C.S. & Dixit, V.M. (2010) Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, **463**, 103–107.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7834–7838.
- Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R.D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P. & Korsmeyer, S.J. (1988) Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *The EMBO journal*, **7**, 123–131.
- Shoemaker, A.R., Mitten, M.J., Adickes, J., Ackler, S., Refici, M., Ferguson, D., Oleksijew, A., O'Connor, J.M., Wang, B., Frost, D.J., Bauch, J., Marsh, K., Tahir, S.K., Yang, X., Tse, C., Fesik, S.W., Rosenberg, S.H. & Elmore, S.W. (2008) Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **14**, 3268–3277.
- Simmons, M.J., Fan, G., Zong, W.-X., Degenhardt, K., White, E. & Gélinas, C. (2008) Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene*, **27**, 1421–1428.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C.S., Hymowitz, S.G., Jin, S., Khaw, S.L., Kovar, P.J., Lam, L.T., Lee, J., Maecker, H.L., Marsh, K.C., Mason, K.D., et al (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, **19**, 202–208.
- Sprynski, A.C., Hose, D., Caillot, L., Réme, T., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., Seckinger, A., Moreaux, J., Hundemer, M., Jourdan, M., Meissner, T., Jauch, A., Mahtouk, K., Kassambara, A., Bertsch, U., Rossi, J.F., Goldschmidt, H. & Klein, B. (2009) The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood*, **113**, 4614–4626.
- Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**, 645–654.
- Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P. & Woodman, P. (1999) Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene*, **18**, 1781–1787.
- Swerdlow, S.H., International Agency for Research on Cancer & World Health Organization (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Tahir, S.K., Yang, X., Anderson, M.G., Morgan-Lappe, S.E., Sarthy, A.V., Chen, J., Warner, R.B., Ng, S.-C., Fesik, S.W., Elmore, S.W., Rosenberg, S.H. & Tse, C. (2007) Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Research*, **67**, 1176–1183.
- Tam, C.C.S.S., John F. Bell, Anthony Westerman, David A Juneja, Surender Huang, David C.S. Roberts, Andrew W. (2013) Selective Bcl-2 Inhibition With ABT-199 Is Highly Active Against Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Irrespective Of TP53 Mutation Or Dysfunction. *Blood*, **122**, 1304–1304.
- Tarte, K., Jourdan, M., Veyrune, J.L., Berberich, I., Fiol, G., Redal, N., Shaughnessy, J. & Klein, B. (2004) The Bcl-2 family member Bfl-1/A1 is strongly repressed in normal and malignant plasma cells but is a potent anti-apoptotic factor for myeloma cells. *British Journal of Haematology*, **125**, 373–382.

- Thomas, L.W., Lam, C. & Edwards, S.W. (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Letters*, **584**, 2981–2989.
- Tolcher, A.W., Chi, K., Kuhn, J., Gleave, M., Patnaik, A., Takimoto, C., Schwartz, G., Thompson, I., Berg, K., D'Aloisio, S., Murray, N., Frankel, S.R., Izbicka, E. & Rowinsky, E. (2005) A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 3854–3861.
- Touzeau, C., Brosseau, C., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., Gouill, S.L. & Amiot, M. (2013a) Mantle-Cell Lymphoma (MCL) Cells Are Highly Sensitive To ABT-199 But Their Sensitivity May Be Altered By The Microenvironment Via The Up-Regulation Of Bcl-Xl and Bcl2A1. *Blood*, **122**, 4285–4285.
- Touzeau, C., Dousset, C., Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Bonnaud, S., Moreau, A., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M. & Gouill, S.L. (2011) ABT-737 Induces Apoptosis in Mantle Cell Lymphoma Cells with a Bcl-2high/Mcl-1low Profile and Synergizes with Other Antineoplastic Agents. *Clinical Cancer Research*, **17**, 5973–5981.
- Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J.D., Souers, A.J., Maïga, S., Béné, M.C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C. & Amiot, M. (2013b) The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*.
- Touzeau, C., Leux, C., Bouabdallah, R., Roussel, M., Delarue, R., Bouabdallah, K., Thieblemont, C., Cacheux, V., Cartron, G., Compain, L., Gyan, E., Morschhauser, F., Casasnovas, O., Moles, M.-P., Michallet, A.-S., Gressin, R., Damaj, G., Rose, C., Sirvent, A., Hermine, O., et al (2014) Autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a report from the SFGM-TC. *Annals of Hematology*, **93**, 233–242.
- Tracey, L., Pérez-Rosado, A., Artiga, M.J., Camacho, F.I., Rodríguez, A., Martínez, N., Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Martinez, B., Cuadros, M., Garcia, J.F., Lawler, M. & Piris, M.A. (2005) Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *The Journal of Pathology*, **206**, 123–134.
- Tromp, J.M., Geest, C.R., Breij, E.C.W., Elias, J.A., van Laar, J., Luijckx, D.M., Kater, A.P., Beaumont, T., van Oers, M.H.J. & Eldering, E. (2012) Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **18**,

- Trudel, S., Stewart, A.K., Li, Z., Shu, Y., Liang, S.-B., Trieu, Y., Reece, D., Paterson, J., Wang, D. & Wen, X.-Y. (2007) The Bcl-2 Family Protein Inhibitor, ABT-737, Has Substantial Antimyeloma Activity and Shows Synergistic Effect with Dexamethasone and Melphalan. *Clinical Cancer Research*, **13**, 621–629.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S.K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S.H. & Elmore, S.W. (2008) ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Research*, **68**, 3421–3428.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)*, **226**, 1097–1099.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal*, **23**, 1889–1899.
- Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A. & Adams, J.M. (2000) Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4745–4753.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440–442.
- Vikstrom, I., Carotta, S., Lüthje, K., Peperzak, V., Jost, P.J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S.L. & Tarlinton, D.M. (2010) Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 1095–1099.
- Vogler, M. (2012) BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death and Differentiation*, **19**, 67–74.
- Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R.J., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S. & Cohen, G.M. (2009a) Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **113**, 4403–4413.
- Vogler, M., Dinsdale, D., Sun, X.-M., Young, K.W., Butterworth, M., Nicotera, P., Dyer, M.J.S. & Cohen, G.M. (2008) A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells. *Cell Death and Differentiation*, **15**, 820–830.

- Vogler, M., Furdas, S.D., Jung, M., Kuwana, T., Dyer, M.J.S. & Cohen, G.M. (2010) Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **16**, 4217–4225.
- Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M.J.S. & Cohen, G.M. (2009b) Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death and Differentiation*, **16**, 1030–1039.
- Vo, T.-T., Ryan, J., Carrasco, R., Neuberg, D., Rossi, D.J., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Frattini, M.G. & Letai, A. (2012) Relative Mitochondrial Priming of Myeloblasts and Normal HSCs Determines Chemotherapeutic Success in AML. *Cell*, **151**, 344–355.
- Vucic, D., Dixit, V.M. & Wertz, I.E. (2011) Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **12**, 439–452.
- Walsh, S.H., Theisélius, M., Johnson, A., Söderberg, O., Jerkeman, M., Björck, E., Eriksson, I., Thunberg, U., Landgren, O., Ehinger, M., Löfvenberg, E., Wallman, K., Enblad, G., Sander, B., Porwit-MacDonald, A., Dictor, M., Olofsson, T., Sundström, C., Roos, G. & Rosenquist, R. (2003) Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood*, **101**, 4047–4054.
- Wang, M.L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B.S., Jurczak, W., Advani, R.H., Romaguera, J.E., Williams, M.E., Barrientos, J.C., Chmielowska, E., Radford, J., Stilgenbauer, S., Dreyling, M., Jędrzejczak, W.W., Johnson, P., Spurgeon, S.E., Li, L., Zhang, L., et al (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, **369**, 507–516.
- Wang, M., Popplewell, L.L., Collins, R.H., Winter, J.N., Goy, A., Kaminski, M.S., Bartlett, N.L., Johnston, P.B., Lister, J., Fanning, S.R., Tuscano, J.M., Beck, J.T., Kaya, H., Robeva, A., Fan, J., Klimovsky, J., Cheung, W., Cherfi, A. & O'Connor, O.A. (2014) Everolimus for patients with mantle cell lymphoma refractory to or intolerant of bortezomib: multicentre, single-arm, phase 2 study. *British Journal of Haematology*, **165**, 510–518.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, **292**, 727–730.
- Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S. & Kuehl, W.M. (2009) A monoclonal

- gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, **113**, 5418–5422.
- Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., Kneba, M., Du, M.Q., Kusec, R., Drach, J., Raderer, M., Mannhalter, C., Lechner, K., Nadel, B. & Jaeger, U. (2001) Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Research*, **61**, 1629–1636.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E. & Kluck, R.M. (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1813**, 521–531.
- Willimott, S. & Wagner, S.D. (2010) Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochemical Society Transactions*, **38**, 1571–1575.
- Willimott, S. & Wagner, S.D. (2012) miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 2608–2617.
- Wilson, W.H., O'Connor, O.A., Czuczman, M.S., LaCasce, A.S., Gerecitano, J.F., Leonard, J.P., Tulpule, A., Dunleavy, K., Xiong, H., Chiu, Y.-L., Cui, Y., Busman, T., Elmore, S.W., Rosenberg, S.H., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H. & Humerickhouse, R.A. (2010) Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *The Lancet. Oncology*, **11**, 1149–1159.
- Wuillème-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Amiot, M. & Bataille, R. (2005) Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*, **19**, 1248–1252.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. & Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 8469–8478.
- Yang, T., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. (1995) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *The Journal of Cell Biology*, **128**, 1173–1184.
- Yao, Y., Bobkov, A.A., Plesniak, L.A. & Marassi, F.M. (2009) Mapping the interaction of pro-apoptotic tBID with pro-survival BCL-XL. *Biochemistry*, **48**, 8704–8711.
- Yecies, D., Carlson, N.E., Deng, J. & Letai, A. (2010) Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*, **115**, 3304–3313.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, **369**, 321–323.

- Yoon, J.-H., Werneburg, N.W., Higuchi, H., Canbay, A.E., Kaufmann, S.H., Akgul, C., Edwards, S.W. & Gores, G.J. (2002) Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover via an epidermal growth factor receptor/Raf-1-dependent mechanism. *Cancer Research*, **62**, 6500–6505.
- Youle, R.J. & Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**, 47–59.
- Yu, J. & Zhang, L. (2003) No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, **4**, 248–249.
- 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. & Shaughnessy, J.D. (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, **108**, 2020–2028.
- Zhang, Z., Song, T., Zhang, T., Gao, J., Wu, G., An, L. & Du, G. (2011) A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, **128**, 1724–1735.
- Zhou, Y., Wang, H., Fang, W., Romaguer, J.E., Zhang, Y., Delasalle, K.B., Kwak, L., Yi, Q., Du, X.L. & Wang, M. (2008) Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer*, **113**, 791–798.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. & Gélinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes & Development*, **13**, 382–387.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405–413.

Titre de la thèse : BH3 mimétiques ciblant Bcl-2 : évaluation pré-clinique dans le myélome multiple et le lymphome à cellules du manteau.

RESUME:

Les interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la survie de la cellule tumorale. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 constituent donc une cible thérapeutique prometteuse. Les BH3 mimétiques représentent une nouvelle classe thérapeutique de petites molécules se fixant avec une forte affinité aux protéines anti-apoptotiques, et déclenchant la mort cellulaire en libérant les protéines pro-apoptotiques activatrices de l'apoptose. Ce travail a évalué l'activité anti-tumorale de deux BH3 mimétiques, l'ABT-737 (ciblant Bcl-2 et Bcl-XL) et l'ABT-199 (ciblant Bcl-2) sur les cellules tumorales de myélome multiple et de lymphome à cellules du manteau, deux hémopathies lymphoïdes B considérées incurable à l'heure actuelle. Nous avons pu mettre en évidence une importante hétérogénéité de sensibilité à ces drogues. L'expression relative de Bcl-2 et de Mcl-1 a été montrée comme le principal facteur sous-tendant la sensibilité aux BH3 mimétiques. L'analyse de la dépendance mitochondriale à Bcl-2 par la technique de *BH3 profiling* permet également de prédire la sensibilité aux BH3 mimétiques. De manière intéressante, la sensibilité des cellules de MM à l'ABT-199 est principalement retrouvée chez les patients présentant une translocation t(11;14), un sous-groupe représentant près de 20% des patients. L'ABT-199 connaît actuellement un développement clinique très prometteur. Il nous apparaît important de valider de manière prospective, dans le cadre d'essais cliniques, les bio-marqueurs décrits dans ce travail de thèse (ratio Bcl-2/Mcl-1, *BH3 profiling*), afin de pouvoir à terme sélectionner les patients les plus à même de bénéficier de cette drogue.

MOTS-CLES :

Apoptose, Bcl-2, myélome multiple, lymphome à cellules du manteau