

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**Étude des mécanismes moléculaires dans la balance
survie/apoptose des cellules de Myélome Multiple :
rôle de Bik et effet de l'ABT-737**

THESE DE DOCTORAT

École Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Hématologie

Présentée et soutenue publiquement par :

BODET Linda Edith Céline

Le : 28 février 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	M. D. Bouscary	Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, INSERM U101, Paris
	M. A. Vazquez	Directeur de Recherche, INSERM U1014, Paris
Examineurs	M. JC Bories	Directeur de Recherche, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris

Directrice de thèse : Dr M. AMIOT

Co-encadrante : Dr P. GOMEZ-BOUGIE

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
L' APOPTOSE	2
A. <i>Historique</i>	2
1. Découverte de l'apoptose	2
2. Les différents types de mort cellulaires non apoptotique	3
3. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	6
A. Au niveau de la membrane plasmique	6
B. Au niveau nucléaire	6
C. Au niveau mitochondrial	7
B. <i>Les différentes voies d'apoptose</i>	7
1. les effecteurs de l'apoptose : les caspases	7
A. Les caspases initiatrices	9
B. Les caspases effectrices	9
C. Les inhibiteurs des caspases	11
2. Les différentes voies d'activation de l'apoptose	12
A. La voie des « récepteurs de mort » ou voie extrinsèque	12
B. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque	15
C. Couplage de la voie extrinsèque et intrinsèque (tBid)	20
D. Rôle du réticulum endoplasmique	20
C. <i>L'apoptose et pathologies</i>	22
1. Excès d'apoptose	22
2. Défaut d'apoptose	22
LES PROTEINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2	23
A. <i>Généralités</i>	23
1. Découverte	23
2. Structure	23
3. Localisation	24
B. <i>Les protéines anti-apoptotiques</i>	24
1. Structure des membres anti-apoptotiques	25
2. Bcl-2	26
A. Structure	26
B. Fonctions biologiques	27
C. Synthèse et dégradation	30
D. Localisation tissulaire	35
3. Mcl-1	35
A. Structure	35

B. Fonctions biologiques	36
C. Synthèse et dégradation	38
D. Localisation tissulaire.....	42
4. Autres protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2	42
A. Bcl-xL	42
B. Bcl-w.....	43
C. Bfl-1	44
<i>C. Les Protéines pro-apoptotiques à multidomaines : Bax et Bak</i>	<i>44</i>
1. Structure	44
2. Activation de Bax et Bak	45
3. Perméabilisation mitochondriale	46
<i>D. Les Protéines proapoptotiques à domaine « BH3 seul »</i>	<i>46</i>
1. Structure des protéines à domaine « BH3 seul ».....	47
2. Fonction des protéines à domaine « BH3 seul ».....	47
3. Bik/Nbk : une protéine sensibilisatrice	47
A. Structure	48
B. Fonctions biologiques	48
C. synthèse et dégradation.....	49
D. Localisation tissulaire	51
4. Les autres protéines à domaine « BH3 seul ».....	52
A. Bim	52
B. Bid	53
C. Noxa	53
D. Puma	54
<i>E. Modèles d'interactions entre les membres de la famille de Bcl-2</i>	<i>54</i>
1. Mécanisme d'activation directe	55
2. Mécanisme d'activation indirecte	55
3. Mécanisme d'activation « combiné ».....	56
THERAPIES CIBLEES PAR LES INHIBITEURS DE BCL-2 : L'ABT-737	57
A. Les inhibiteurs de Bcl-2	57
B. L'ABT-737 : un inhibiteur spécifique	57
1. Construction	58
2. Structure et affinités.....	59
C. Intérêt dans le traitement des cancers	59
1. En agent simple	60
2. En co-traitement.....	60
3. L'ABT-263 en clinique	61
LE MYELOME MULTIPLE	62
A. Généralités	62
B. La biologie du MM.....	63
1. Différenciation et maturation plasmocytaire	63

A. Différenciation indépendante des antigènes	63
B. Différenciation dépendante des antigènes	64
2. L'origine de la cellule myélomateuse	65
3. L'oncogenèse du MM un processus en deux étapes	66
A. Évolution en MGUS	66
B. Transformation d'un MGUS en MM	66
4. Classification moléculaire	68
A. Hyperdiploïdies	68
B. Les translocations récurrentes	68
C. Autres anomalies chromosomiques	70
5. Classification fonctionnelle	72
6. Facteurs pronostiques	72
<i>C. Le rôle de l'environnement médullaire</i>	<i>74</i>
<i>D. Pathogénicité du MM</i>	<i>76</i>
1. Dérégulation de la prolifération	77
2. Dérégulation de l'apoptose	77
<i>E. Les Thérapies du MM</i>	<i>78</i>
RESULTATS	80
ARTICLE 1 : LA PROTEINE BIK EST IMPLIQUEE DANS L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET LA SENSIBILITE AU STRESS OXYDATIF DANS LE MYELOME MULTIPLE.	83
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	85
ARTICLE 2 : L'ABT-737 DANS LA THERAPIE D'UN GROUPE DE PATIENTS ATTEINTS D'UN MYELOME MULTIPLE	92
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	95
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	98
CONCLUSION	116
ANNEXE	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

Index des figures

Figure 1 : Illustration des différentes caractéristiques de l'apoptose	3
Figure 2 : Structure et classification des caspases	8
Figure 3 : Mécanisme d'activation d'une caspase	8
Figure 4 : Schéma de l'ensemble de l'activation des caspases	9
Figure 5 : les caspases coordonnent la destruction des structures et organites cellulaires	11
Figure 6 : Mode d'action des IAPs, Flip et Hsp70 dans les voies intrinsèque et extrinsèque....	12
Figure 7 : Schéma des récepteurs de type FAS et DR4 de la superfamille du TNF	14
Figure 8 : Signalisation via le TNFR1 : survie ou apoptose ?	15
Figure 9 : Apoptose par la voie mitochondriale	16
Figure 10 : Formation de l'apoptosome	18
Figure 11 : Mécanisme d'induction de l'apoptose par un stress réticulaire.....	21
Figure 12 : Classification et structure des membres de la famille de Bcl-2	24
Figure 13 : Représentation « Ribbons » de la structure tridimensionnelle de Bcl-2	25
Figure 14 : Structure générale d'un membre anti-apoptotique	25
Figure 15 : Structure de Bcl-2	27
Figure 16 : Implication de Bcl-2 dans le cycle cellulaire.....	29
Figure 17 : Gène de Bcl-2	30
Figure 18 : Sites de phosphorylation connus de Bcl-2	32
Figure 19 : Sites de clivage par les caspases et calpaïnes de Bcl-2	33
Figure 20 : Nur77 rend Bcl-2 pro-apoptotique.....	34
Figure 21 : Structure des trois isoformes de Mcl-1	35
Figure 22 : Sites de phosphorylation de Mcl-1.....	39
Figure 23 : Tableau récapitulatif des phosphorylations de Mcl-1	40
Figure 24 : Schéma du clivage de Mcl-1 par les caspases	41
Figure 25 : Activation et homo-dimérisation de Bax et Bak	45
Figure 26 : Structure de Bik	48
Figure 27 : Modèle d'activation directe des protéines pro-apoptotiques à multidomaines.....	55
Figure 28 : Modèle d'activation indirecte des protéines pro-apoptotiques à multidomaines..	56
Figure 29 : Modèle d'activation « combiné » de Bax et Bak.....	56
Figure 30 : Les grandes lignes de la stratégie « SAR by RMN ».....	58
Figure 31 : Structure chimique de l'ABT-737	59
Figure 32 : Développement et différenciation des lymphocytes B.....	65
Figure 33 : Translocations primaires retrouvées dans les cellules MGUS et MM	66
Figure 34 : Oncogénèse du MM et dépendance aux cellules stromales	68
Figure 35 : Survie globale, incidence des rémissions complètes et durée des rémissions complètes pour les huit sous-groupes de MM.	74
Figure 36 : Principales voies de signalisation impliquées dans la biologie du MM.	76

Figures supplémentaires

Partie résultat :

Figure R1 : Profil d'expression de Bik avant et après traitement au Melphalan (5 μ M) sur XG-6.....	85
Figure R2 : Analyse de l'expression de Bik sous traitement au 5'Aza	87
Figure R3 : Profil d'expression protéique de Bik et Mcl-1 après transfection de Bik.....	88
Figure R4 : Profil d'expression protéique de Bik et Bcl-2 sous traitement à l'ABT-737	88
Figure R5 : Expression protéique de Bik après transfection de Bcl-2 ou Bcl-xL dans la lignée HEK 293 ..	89
Figure R6 : Profil d'expression protéique de Bik et de Bcl-2 sous traitement au MG132.....	89
Figure R7 : Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et de Mcl-1 des LMM	95
Figure R8 : La diminution de l'expression d'USP9X sensibilise la lignée KMM-1 à l'ABT-737	96
Figure R9 : Effet de l'association ABT-737 avec du PS341	97

Partie discussion :

Figure D1 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'ABT-737 et de la réponse à ce traitement en fonction du ratio Bcl-2/Mcl-1 des cellules	110
--	-----

Partie conclusion :

Figure C1 : Schéma bilan de l'effet de l'ABT-737 et de chaque agent anticancéreux proposé pour un traitement en association avec l'ABT-737 sur les cellules de MM.....	118
--	-----

Liste des Abréviations

A

Ag: Antigène
AIF : "Apoptosis inducing factor"
Apaf-1 : "Apoptotic protease activating factor 1"

B

Bad : "BCL2-associated agonist of cell death"
Bak : "Bcl-2 antagonist/killer 1"
Bax : "Bcl-2-associated X protein"
Bcl-2 : "B cell lymphoma 2"
BH : "Bcl-2 homology"
Bid : "BH3 interacting domain death agonist"
Bik/Nbk : "Bcl-2 interacting killer/Natural born killer"
Bmf: "Bcl2 modifying factor »
Bnip1: "BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1"

C

CARD : "Caspase recruitment domain"
Caspase : « Cystein aspartate protéase »
CDK : « Cyclin-dependant kinases »

D

DD : "Death domain"
DED : "Death effector domain"
DISC : "Death inducing signaling complex"

E

EIM : Espace intermembranaire mitochondrial

H

Hrk : "Harakiri"
Hsp70 : "Heat shock protein 70"
HtrA2/Omi : "High-temperature requirement A2"

I

IAP : "Inhibitor of apoptosis protein"
Ig: Immunoglobuline

J

JNK: "c-Jun NH2-terminal kinase"

L

LAL: Leucémie aiguë lymphoblastique
LB: Lymphocyte B
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LMM : Lignée de myélome multiple
LT: Lymphocyte T

M

Mcl-1: « Myeloid cell leukemia-1"
MGUS : Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MM : Myélome multiple
MME : Membrane mitochondriale externe
MO : moelle osseuse
Mule : "Mcl-1 ubiquitin ligase E3"

N

NF-kB: "Nuclear factor-kappaB"

P

PS: Phosphatidylsérines
Puma: "p53 upregulated modulator of apoptosis"

R

RC : Rémission complète
RE : Réticulum endoplasmique
RMN : Résonance magnétique nucléaire

S

Smac/DIABLO : "Second mitochondria-derived activator of caspase"

T

TM: Transmembranaire
TNF: "Tumor necrosis factor"
TRAIL: "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand"

U

UPR: « Unfolded protein response »

V

VDAC : Canaux anioniques voltage dépendants
VEGF : Facteur de croissance de l'épithélium vasculaire

Introduction bibliographique

L'APOPTOSE

On nomme apoptose un des processus physiologiques par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal de mort. Elle constitue l'une des voies possibles de mort cellulaire. Ce processus physiologique permet le développement harmonieux de tout organisme multicellulaire par le contrôle du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre précis entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. En effet, les cellules surnuméraires, endommagées, infectées, ou encore potentiellement dangereuses pour l'organisme sont éliminées par apoptose. Ce processus joue un rôle déterminant au cours de l'embryogenèse avec, par exemple, l'individualisation des doigts ; dans l'homéostasie cellulaire et dans le fonctionnement du système immunitaire notamment l'apprentissage du soi par les lymphocytes.

Le dérèglement pathologique du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies comme les cancers, certaines maladies immunitaires, des maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson) ou encore le SIDA.

A. HISTORIQUE

1. Découverte de l'apoptose

C'est en 1972, que le terme « apoptose » est introduit pour désigner un modèle de mort cellulaire, en opposition avec le modèle de nécrose déjà connu à l'époque. L'apoptose est, en effet, un phénomène actif, organisé, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications biochimiques, morphologiques et structurales aboutissant à sa destruction complète « sans laisser de trace » (Kerr et al., 1972). Kerr et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence, sur des cellules de rat, deux étapes de modifications structurelles distinctes. La première comprend la condensation cytoplasmique et nucléaire aboutissant à des fragments qui ont une ultrastructure préservée. Dans la seconde étape, les corps apoptotiques tombent des cellules épithéliales de surface ou sont phagocytés par d'autres cellules (Figure 1).

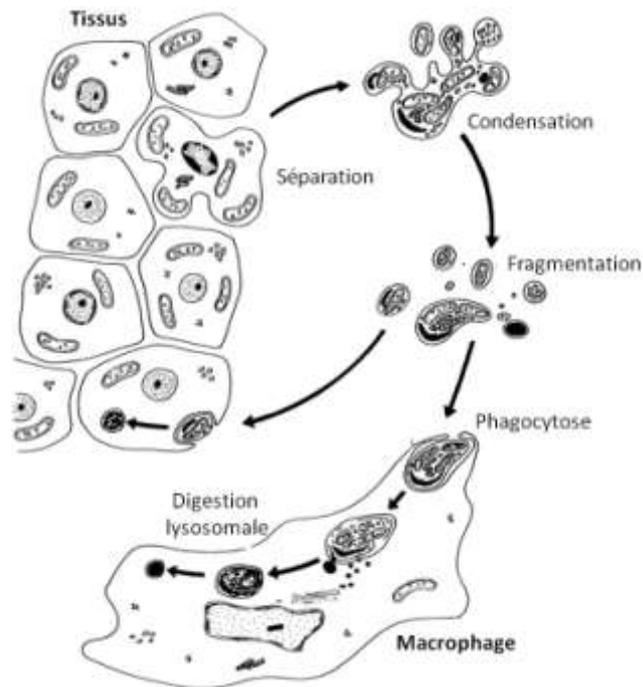


Figure 1 : Illustration des différentes caractéristiques de l'apoptose
(d'après Kerr et al 1972)

Ce sont les recherches de ces 30 dernières années qui ont permis de déchiffrer le programme génétique et moléculaire associé au déclenchement et à la transduction du signal apoptotique. De nos jours, l'emploi du terme « mort cellulaire programmée » pour décrire l'apoptose est à éviter. En effet, ce terme laisse suggérer que tous les programmes de mort cellulaire suivent le schéma de l'apoptose alors que l'ensemble des données morphologiques et biochimiques suggère clairement que la mort cellulaire programmée ne serait pas restreinte à l'apoptose.

2. Les différents types de mort cellulaires non apoptotique

La mort cellulaire joue un rôle primordial pour le maintien de l'homéostasie et la défaillance de ces processus a des conséquences désastreuses sur l'organisme. Afin de parer à toute éventualité, la cellule possède plusieurs programmes d'autodestruction afin de contrecarrer la défaillance de l'une d'entre elles, le cas échéant.

- La nécrose

La nécrose est la principale forme de mort d'une cellule, elle est aussi la première à avoir été identifiée. Elle a longtemps été considérée comme un processus désorganisé. Cependant, on sait maintenant que certaines formes de nécrose peuvent être régulées et les mécanismes d'induction et de transduction de ce phénomène commencent à être identifiés.

La nécrose se caractérise morphologiquement par l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme et par la rupture de la membrane cytoplasmique conduisant à la libération des composants cellulaires dans le milieu extracellulaire. Ce processus fait suite à des traumatismes importants (ischémie, choc thermique, lésion) subis par la cellule et est caractérisé par une inflammation locale (Zong et Thompson, 2006).

- L'oncose

L'oncose est une forme passive ou accidentelle de mort cellulaire qui se rapproche de la nécrose. Elle est caractérisée par un gonflement nucléaire et cytoplasmique, une vacuolisation du cytoplasme, un gonflement mitochondrial, mais surtout la conservation de l'intégrité de la membrane plasmique qui la différencie de la nécrose (Majno et Joris, 1995).

- La sénescence

Décrite pour la première fois en 1961, la sénescence est synonyme de vieillissement cellulaire (Hayflick et Moorhead, 1961). Dans les conditions favorables, les cellules se dupliquent régulièrement. Chaque cellule a un nombre de doublement prédéfini et lorsque celui-ci est atteint, la cellule s'arrête en phase G0, d'où elle ne ressortira pas. Les cellules engagées dans ce processus montrent des signes de dégénérescence mais conservent cependant l'intégrité de leur membrane plasmique. Elles présentent néanmoins des changements morphologiques caractéristiques comme un cytoplasme aplati, une augmentation de la granularité, des involutions au niveau de la chromatine et de l'ADN circulaire extra-chromosomique (Okada et Mak, 2004).

- L'autophagie

Dans les cellules saines, il existe un équilibre entre synthèse et dégradation protéique, biogénèse et renouvellement des organites. Les protéines à longue durée de vie ainsi que les

organites cellulaires sont détruits par autophagie. C'est un processus catabolique lysosomal qui implique la formation de structures particulières à double membrane nommées autophagosomes qui fusionneront par la suite avec les lysosomes. L'autophagie est en premier lieu un mécanisme de survie et d'adaptation aux stress par contrôle et élimination des protéines et structures obsolètes.

Bien que l'autophagie soit clairement définie comme une voie de survie cellulaire, on parle également de plus en plus de mort cellulaire par autophagie (Cecconi et Levine, 2008). Il est à noter que la mort par autophagie est souvent observée dans les cellules dont l'apoptose est déficiente. D'autre part, les voies apoptotiques et autophagiques peuvent être connectées, notamment, *via* les membres de la famille de Bcl-2 (Okada et Mak, 2004).

- La catastrophe mitotique

Le terme de catastrophe mitotique a été initialement décrit en 1986 chez *Schizosaccharomyces pombe* comme un phénotype létal consécutif à une entrée en mitose prématurée. Depuis, sa définition a évolué décrivant la catastrophe mitotique comme le type de mort induite par une mitose aberrante. Ce processus, morphologiquement distinct de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie, se caractérise par la formation de noyaux multiples, de cellules géantes, une condensation des chromosomes (Okada et Mak, 2004).

- La paraptose

Dans plusieurs types cellulaires, la paraptose est définie par une expression du récepteur 1 du facteur de croissance à l'insuline et est associée avec une vacuolisation du cytoplasme et un gonflement des mitochondries sans les autres caractéristiques de l'apoptose. Les inhibiteurs de caspase ainsi que la surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 n'inhibent pas la mort par paraptose (Kroemer et al., 2009).

- L'Entose

A l'origine, l'entose a été décrite comme une forme de « cannibalisme cellulaire » des lymphoblastes des patients atteints de la maladie de Huntington. C'est une nouvelle forme de mort cellulaire par laquelle les cellules phagocytent une cellule voisine vivante qui meurt dans le phagosome. L'entose a également été observée dans une lignée du cancer du sein (MCF-7)

qui est déficiente en caspase 3 et beclin 1 et qui sont ainsi incompetentes pour l'apoptose et l'autophagie (Le Bot, 2007).

- Les autres types de mort

D'autres types de mort ont également été décrits dans la littérature, cependant ils sont propres à un type cellulaire particulier. Ainsi, la cornification est une forme très spécifique de mort cellulaire programmée de l'épiderme aboutissant à la formation de kératinocytes (Lippens et al., 2009). Les macrophages infectés par des bactéries ont, quant à eux, deux types de mort qui leur sont dédiées : la pyroptose et la pyronécrose. La première implique l'activation de la caspase 1 tandis que la seconde se rapproche d'une mort par nécrose (Kroemer et al., 2009).

3. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Consécutivement à la réception d'un signal de mort, les cellules engagées dans le processus apoptotique présentent les caractéristiques morphologiques typiques suivantes :

A. Au niveau de la membrane plasmique

L'intégrité de la membrane plasmique est conservée durant tout le processus apoptotique. Cependant, cette dernière subit des modifications biochimiques comme l'externalisation des phosphatidylsérines (PS) qui sont des phospholipides anioniques du feuillet interne de la membrane plasmique. Les PS ainsi présentées à la surface membranaire sont reconnues par des récepteurs spécifiques présents sur les macrophages. L'élimination des cellules en apoptose par phagocytose assure une réponse non inflammatoire au processus apoptotique (Fadok et al., 1998).

B. Au niveau nucléaire

Au niveau nucléaire, il y a une condensation de la chromatine suivie par le clivage de l'ADN. La dégradation de l'ADN est liée, d'une part, à l'activation de DNAses telles que les déoxyribonucléases (activés par les caspases) et d'autre part à l'endonucléase G qui, ensembles, dégradent l'ADN accessible entre les nucléosomes (Wyllie et al., 1980).

C. Au niveau mitochondrial

Le rôle physiologique principal de cet organe intracellulaire est la production d'énergie pour les cellules eucaryotes. Cette énergie est produite sous forme d'ATP, par la chaîne respiratoire, *via* la création d'une différence de potentiel entre la membrane interne et la membrane externe mitochondriale. Au cours de l'apoptose un gonflement de cet organe est observé ainsi qu'une disparition du potentiel de membrane. Ce gonflement de la matrice mitochondriale induit la rupture de la membrane externe ayant pour conséquence la libération dans le cytoplasme des facteurs apoptogènes tel que le cytochrome c (Grimm et Brdiczka, 2007). Ces facteurs régulent l'activité protéolytique des caspases qui sont les effecteurs finaux du programme de mort.

B. LES DIFFERENTES VOIES D'APOPTOSE

Il existe trois voies principales de mort par apoptose : la voie extrinsèque dite des « récepteurs de mort » ; la voie intrinsèque ou « mitochondriale », et la voie réticulaire. Toutes ces voies induisent l'activation des caspases qui sont les effecteurs de l'apoptose.

1. les effecteurs de l'apoptose : les caspases

Le rôle central des caspases au cours de l'apoptose a été mis en évidence par de nombreuses études faites chez le nématode, la souris et l'homme (Li et Yuan, 2008). Les différentes phases d'initiation de l'apoptose aboutissent à l'activation des caspases. Ce sont des protéases à cystéine appartenant à la famille des ICE (« interleukine-1 converting enzyme »). Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leur substrat (après un résidu aspartate). C'est sur cette base que ces protéases sont nommées : caspase pour « cystein aspartate protéase » (Alnemri et al., 1996).

Toutes les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Elles ont principalement des localisations cytoplasmique, mitochondriale et à la surface du réticulum endoplasmique.

Selon leur fonction, trois groupes de caspases se distinguent. Un premier groupe joue un rôle dans l'inflammation et les deux autres dans l'apoptose. Pour ces deux derniers, nous

pouvons distinguer les caspases initiateuses (2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (3, 6 et 7) (Chang et Yang, 2000).

La structure des formes inactives des caspases présente trois domaines très conservés au cours de l'évolution : une petite sous-unité de 10 à 14kDa en position C-terminale, une grande sous-unité de 17 à 21kDa portant le site catalytique à résidu cystéine dans un motif consensus (QACxG) et un pro-domaine en position N-terminale (Figure 2).

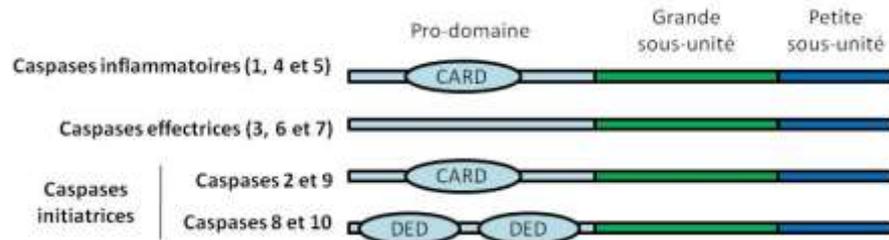


Figure 2 : Structure et classification des caspases

(d'après Chang et Yang, 2000)

L'activation des caspases en réponse à ces stimuli de mort fait intervenir deux événements de clivage successifs. Les sites de clivage sont dus à la présence de plusieurs résidus aspartate entre la petite et la grande sous-unité mais également entre la grande sous-unité et le pro-domaine. Ces clivages vont permettre la libération du pro-domaine et l'association des deux sous-unités afin de former le site actif de l'enzyme. La forme active de l'enzyme correspond à un tétramère constitué de l'association de deux petites sous-unités et de deux grandes (Figure 3).

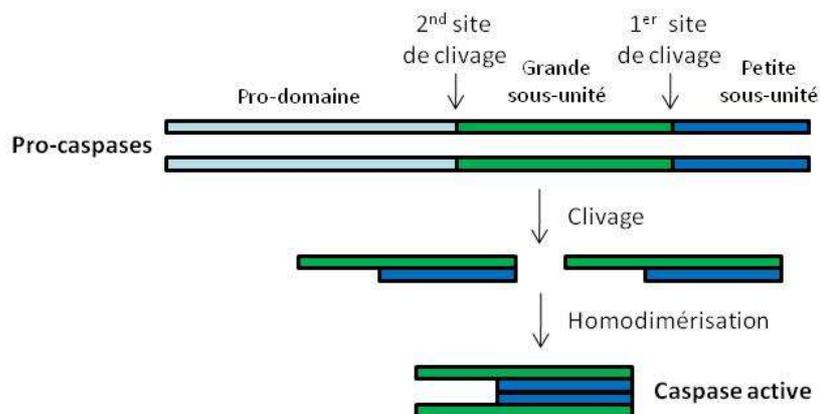


Figure 3 : Mécanisme d'activation d'une caspase

(d'après Chang et Yang, 2000)

A. Les caspases initiatrices

Les caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 se caractérisent par un long pro-domaine au sein duquel se trouvent des domaines d'interactions protéine-protéine. Ainsi, les caspases 8 et 10 possèdent deux domaines DED (« death effector domain ») permettant l'accrochage de ces protéines aux molécules adaptatrices FADD (« Fas associated protein with death domain ») ou TRADD (« TNFRSF1A-associated *via* death domain ») ; tandis que les caspases 2 et 9 possèdent un domaine CARD (« caspase recruitment domain ») intervenant dans l'interaction directe entre les caspases ou avec les molécules régulatrices. Ces domaines DED et CARD participent au recrutement des caspases initiatrices au sein des complexes multiprotéiques induisant leur activation. La caspase 8 est spécifique de la voie extrinsèque et la caspase 9 de la voie intrinsèque (Chang et Yang, 2000).

B. Les caspases effectrices

Les caspases effectrices ont, quant à elles, un pro-domaine plus court que les caspases initiatrices, ne possèdent pas de domaine de recrutement et sont activées principalement par les caspases initiatrices. Les caspases effectrices agissent en cascade et peuvent également activer des caspases en amont grâce à une boucle d'amplification. La caspase la plus en aval de cette cascade est la caspase 3, activée par les caspases initiatrices, elle représente un point de non retour dans le processus apoptotique (Figure 4) (Stennicke et al., 1998) (Chang et Yang, 2000).

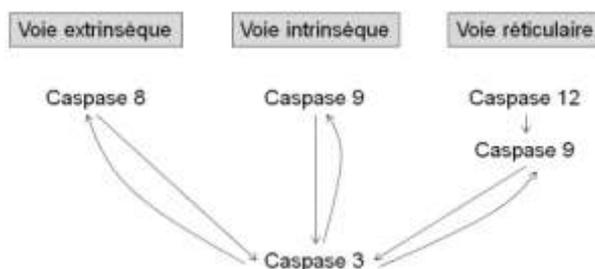


Figure 4 : Schéma de l'ensemble de l'activation des caspases

Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) orchestrent la destruction des diverses structures cellulaires par clivage de substrats spécifiques. Globalement, ces événements protéolytiques induisent un changement phénotypique caractéristique de l'apoptose, dont voici quelques exemples (Figure 5) :

- Le clivage d'ICAD (« inhibitor of caspase-activated DNase ») libère CAD qui peut alors catalyser le clivage inter-nucléosomique de l'ADN.
- Les caspases régulent le clivage des lamines nucléaires ce qui a pour effet la fragmentation nucléaire et la protéolyse des protéines de l'enveloppe nucléaire.
- La dégradation des protéines d'adhésion entraîne le détachement cellulaire et la rétractation de la cellule.
- L'activation des caspases est nécessaire à la présentation des phosphatidylsérines (PS) et d'autres signaux de phagocytose à la surface de la cellule.
- La protéolyse de ROCK1 (effecteur de Rho) induit la contraction du cytosquelette d'actine, la formation de blebs à la membrane plasmique ainsi que la fragmentation du noyau.
- Les caspases clivent également la protéine GRASP65 de l'appareil de Golgi ce qui induit la fragmentation de cet organite cellulaire.
- La kinase MST1 (« mammalian steril-20 ») est clivée par les caspases. Le fragment actif de MST1 transloque au noyau où, il va phosphoryler l'histone H2B et ainsi induire la condensation de la chromatine.
- Enfin, les fonctions cellulaires importantes sont interrompues par la protéolyse de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction (eIFs) (Taylor et al., 2008).

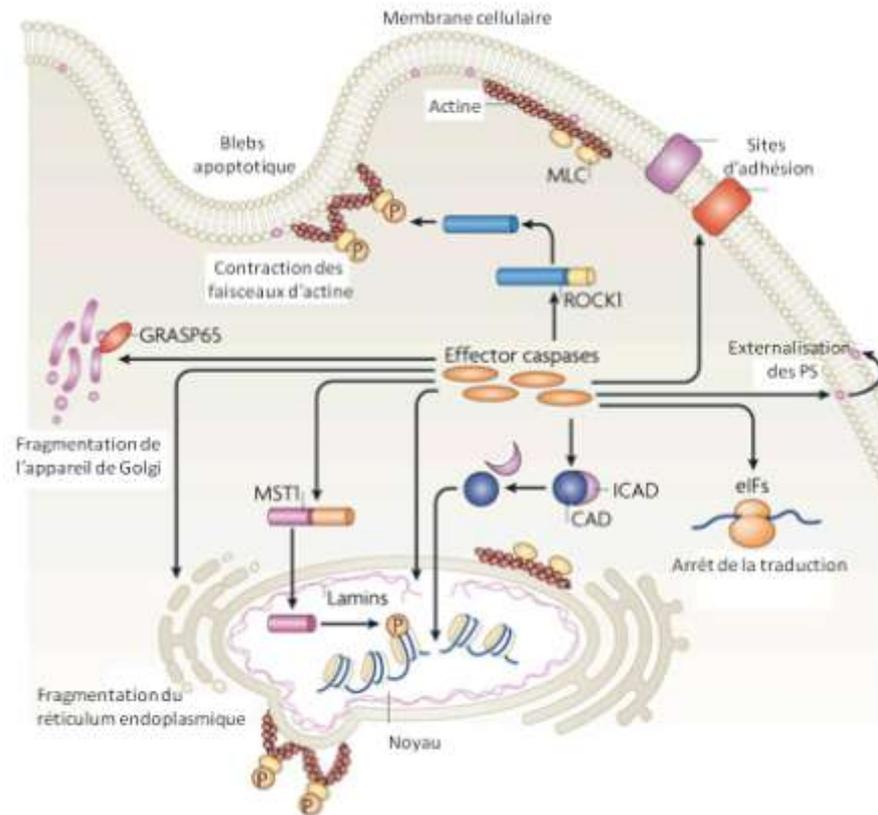


Figure 5 : les caspases coordonnent la destruction des structures et organites cellulaires
(d'après (Taylor et al., 2008))

C. Les inhibiteurs des caspases

L'activation des caspases n'est pas un événement anodin pour la cellule, c'est pourquoi, ces protéases sont contrôlées par des molécules inhibitrices que sont les IAPs (« inhibitor of apoptosis protein »), Hsp70 (« heat shock protein 70 ») ou encore Flip (« FLICE-inhibitory protein »).

Les protéines membres de la famille des IAPs présentent un ou plusieurs domaines BIR (« baculovirus IAP repeat ») leur permettant d'inhiber les caspases en interagissant directement avec elles et en bloquant l'activation de celles-ci. Certains membres des IAPs possèdent un domaine RING en C terminal qui leur confère une activité ubiquitine ligase permettant d'induire la dégradation des caspases par le protéasome (Figure 6) (Shi, 2004).

En réponse à un stress, la protéine Hsp70 joue son rôle anti-apoptotique à plusieurs niveaux. En effet, cette protéine inhibe la translocation de Bax à la mitochondrie, bloque la

libération du cytochrome c, empêche la formation de l'apoptosome, et inhibe l'activation des caspases initiatrices (Figure 6) (Arya et al., 2007).

La protéine Flip est un analogue structural de la caspase 8 dépourvue d'activité protéolytique. Lors de l'activation de la voie des récepteurs de mort, Flip régule l'activation de la caspase 8 *via* la compétition entre la caspase 8 et Flip. (Figure 6) (Krueger et al., 2001).

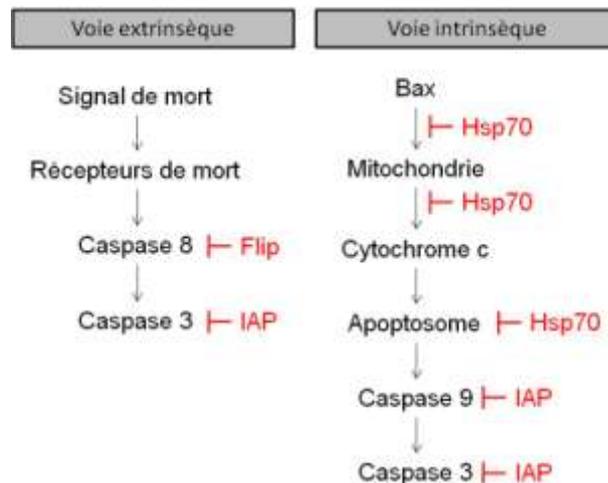


Figure 6 : Mode d'action des IAPs, Flip et Hsp70 dans les voies intrinsèque et extrinsèque

2. Les différentes voies d'activation de l'apoptose

Trois voies principales d'activation des caspases sont actuellement décrites. La première est activée par les récepteurs de mort, la seconde (intrinsèque) fait intervenir la mitochondrie ; enfin, la troisième voie a comme particularité de faire intervenir le réticulum endoplasmique (Heath-Engel et al., 2008).

A. La voie des « récepteurs de mort » ou voie extrinsèque

La voie des récepteurs permet l'activation des caspases effectrices à partir d'un signal de mort détecté par les récepteurs membranaires de la superfamille du TNF (« tumor necrosis factor »).

1. LES RECEPTEURS DE MORT

La famille des récepteurs du TNF compte une trentaine de membres et comprend à la fois des récepteurs et leurs ligands naturels. Cette famille est divisée en trois sous-groupes de

récepteurs basés sur la structure de leur partie cytoplasmique et des voies de signalisation induites (Dempsey et al., 2003).

- Les récepteurs de type I contiennent un DD (« death domain ») dans leur partie cytoplasmique. Ce sont les récepteurs : Fas, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et DR6.
- Les récepteurs du second type incluent entre autres TNF-R2, CD40, et RANK. Ces récepteurs contiennent dans la partie cytoplasmique un ou plusieurs domaines TIM (« TRAF-interacting motifs ») afin de recruter les membres de la famille TRAF et activer les voies de signalisations tels que NF- κ B, JNK, p38, ERK et PI3K.
- Le troisième et dernier groupe est constitué des récepteurs qui n'ont pas de domaines ou motifs cytoplasmiques fonctionnels tels que : TRAIL-R3, TRAIL-R4, decoy-R3 et OPG. Bien que ces récepteurs n'activent pas de voies de signalisation, leur fonction de leurre limite l'activation des autres voies de transductions activées par les membres de la famille des TNF.

2. SIGNALISATION DE LA VOIE EXTRINSEQUE

Parmi tous ces récepteurs, seuls ceux du premier type peuvent induire un signal de mort (Figure 7). Le modèle classique de ce sous groupe est le couple Fas/FasL. La liaison de FasL sur son récepteur induit un changement conformationnel du récepteur, notamment dans sa partie cytoplasmique ce qui abouti au rapprochement de trois domaines DD. La molécule adaptatrice FADD/MORT1 est recrutée au niveau de la partie intracellulaire du récepteur par son propre DD. La protéine FADD possède un domaine DED qui lui permet d'interagir avec la pro-caspase 8 *via* la dimérisation de leurs domaines DED respectifs. Cet ensemble protéique constitue le DISC (« death inducing signaling complex »). L'augmentation de la concentration locale en pro-caspase 8 induit une activité autoprotéolytique et la libération dans le cytoplasme des formes actives de cette protéase qui va, à son tour, activer les caspases effectrices 3 et 7. Cependant, la caspase 8 peut également provoquer le clivage de la protéine Bid (membre de la famille Bcl-2), qui déclenche la voie mitochondriale de l'apoptose.

Les récepteurs DR4 et DR5, quant à eux, semblent fonctionner uniquement par déclenchement de la voie mitochondriale subséquent au clivage de la protéine Bid (Danial et Korsmeyer, 2004) (Figure 7).

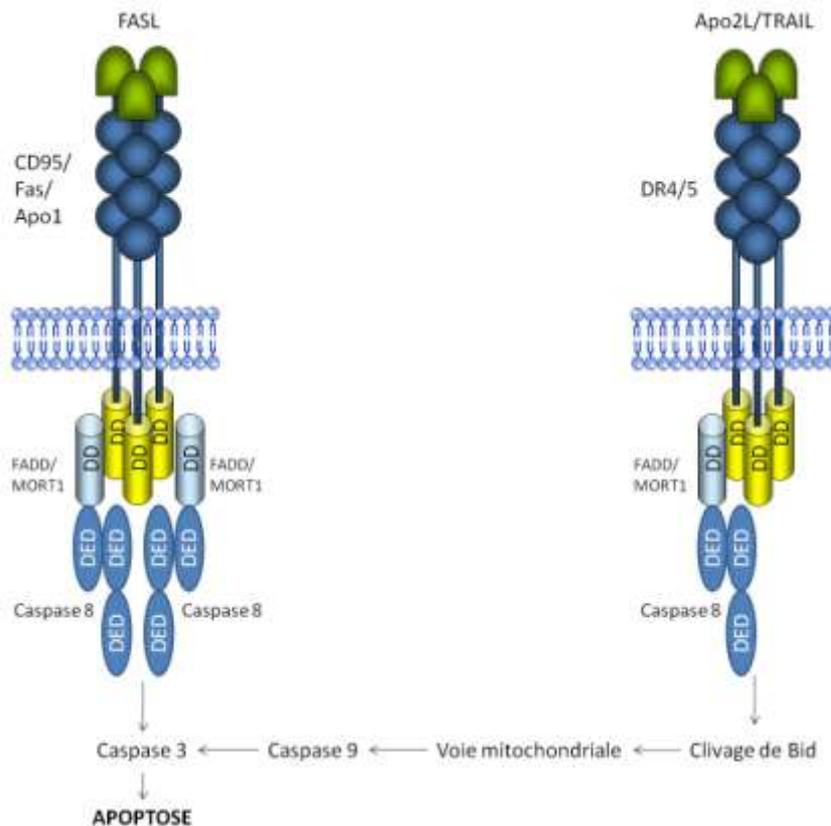


Figure 7 : Schéma des récepteurs de type FAS et DR4 de la superfamille du TNF

(D'après Danial et Korsmeyer, 2004)

Aussi paradoxal que cela puisse paraître, certains membres de ce sous-groupe déclenchent, dans certaines conditions, une signalisation de survie, c'est le cas de TNFR1, DR3 et DR6. En effet, ces récepteurs une fois activés recrutent en premier lieu les protéines adaptatrices TRADD. Ces dernières, contenant un domaine DD, fixent la kinase RIP1 (« receptor interacting protein ») qui permet l'accrochage des protéines TRAF2, c-IAP1/2 (« inhibitor of apoptosis protein ») et la formation du complexe 1. Le complexe 1 entraîne le recrutement de la protéine IKK (« IκB kinase ») et l'activation de la voie NF-κB (« nuclear factor-kappaB »). NF-κB est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes de la prolifération et l'inhibition de l'apoptose, cette activation soutient, de ce fait, la survie cellulaire. Dans un second temps, les protéines adaptatrices TRADD vont se dissocier des récepteurs et ce sont les protéines FADD qui seront recrutées afin d'induire l'apoptose *via* le recrutement de la caspase 8 et la formation du complexe 2 (Figure 8) (Micheau et Tschopp, 2003).

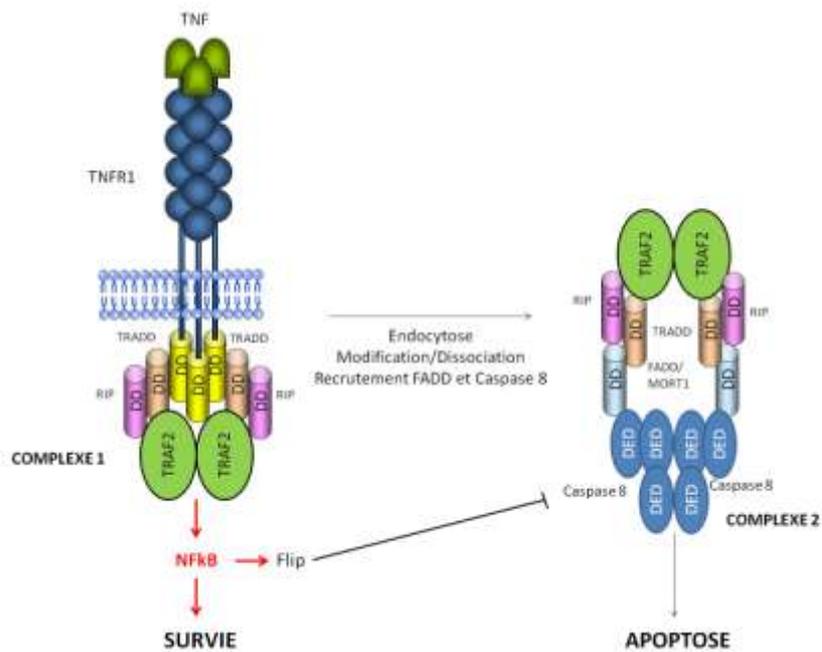


Figure 8 : Signalisation via le TNFR1 : survie ou apoptose ?

(d'après Micheau & Tschopp 2003)

3. REGULATION DE LA VOIE DES RECEPTEURS DE MORT

La régulation de l'apoptose par la voie extrinsèque réside principalement dans sa capacité à déclencher elle-même des voies de signalisation de survie, de prolifération, de différenciation ou de mort. Tout d'abord, la balance qui existe entre les membres des complexes 1 et 2 induira le déclenchement de l'apoptose seulement en cas d'insuffisance de l'activation de la voie NF- κ B. En cas contraire, cFLIP est exprimée pour inhiber la caspase 8. c-Flip contient deux domaines DED grâce auxquels elle va se lier aux DED de FADD et de la pro-caspase 8 ce qui empêche l'activation de cette dernière. De plus, d'un point de vue plus général, c'est la sommation des signaux perçus par les trois sous-groupes et, de ce fait, la voie de signalisation prépondérante qui va s'en dégager qui va déterminer si oui ou non l'activation des récepteurs de mort induira la survie ou l'apoptose.

B. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La voie intrinsèque (ou mitochondriale) peut être activée en réponse aux rayonnements ionisants, aux drogues utilisées en chimiothérapie, aux infections virales, aux dommages à l'ADN ou encore une privation en facteurs de croissance. Elle peut également être activée pour

apporter un renfort aux autres voies d'induction de l'apoptose telles que la voie des récepteurs de mort ou encore la voie réticulaire.

La mitochondrie est un centre décisionnel aussi bien dans l'intégration qu'au niveau de la propagation des signaux de mort. En effet, la voie apoptotique dépendante de la mitochondrie est finement régulée au niveau de cet organite par les protéines de la famille de Bcl-2. Cette voie conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) et à la libération de protéines apoptogéniques de l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM) dans le cytoplasme. Ces protéines sont : le cytochrome c, AIF (« apoptosis inducing factor »), l'endonucléase G, Smac/DIABLO, et HtrA2/Omi. Le cytochrome c ainsi libéré va permettre la formation de l'apoptosome, complexe multiprotéique permettant l'activation des caspases (Figure 9) (Kroemer et al., 2007).

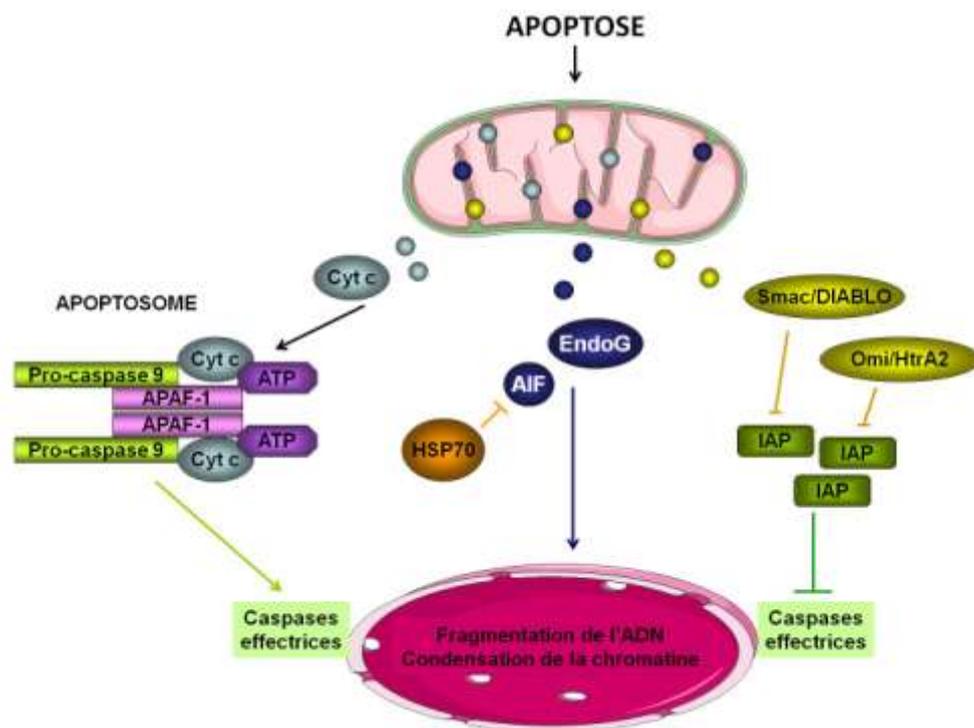


Figure 9 : Apoptose par la voie mitochondriale

(d'après (Kroemer et al., 2007))

1. LE CYTOCHROME C ET LA FORMATION DE L'APOPTOSOME

Le cytochrome c est un composant essentiel de la chaîne de transfert des électrons mitochondriaux. Il induit l'activation des caspases suite à sa libération de la mitochondrie lors de l'apoptose (Liu et al., 1996).

L'utilisation de cytochrome c marqué par de la GFP (« Green fluorescent protein ») a permis de mettre en évidence que cinq minutes étaient nécessaires au cytochrome c pour être presque complètement libéré dans le cytoplasme et que cet événement précède l'exposition des phosphatidylsérines à la membrane plasmique (Goldstein et al., 2000). Contrairement à certaines idées, il existe deux groupes de cytochrome c. La majorité du cytochrome c est fortement associée aux lipides mitochondriaux, tandis qu'une minorité diffuse librement dans l'EIM (Ott et al., 2002).

Lorsqu'un signal apoptotique induit une modification du potentiel de membrane mitochondrial, le cytochrome c agit comme un oxydant sur les lipides et induit sa propre sortie ainsi que celle des protéines apoptogéniques de l'EIM (Kagan et al., 2005).

Comme illustré sur la figure 10, le cytochrome c cytoplasmique se lie à Apaf-1 (« Apoptotic protease activating factor 1 »), protéine cytosolique qui possède un domaine de recrutement des caspases (CARD), un domaine de liaison aux nucléotides (NBD) et plusieurs domaines WD-40 (Zou et al., 1997). Le domaine NBD d'Apaf-1 lui confère la capacité de lier l'ATP après un changement conformationnel induit par sa liaison avec le cytochrome c grâce à son domaine WD40. Ce changement de conformation permet également à la protéine Apaf-1 de s'oligomériser, *via* son domaine NDB, et de se fixer à la pro-caspase 9 grâce à la présence de son domaine CARD. Le complexe heptamérique ainsi formé Apaf-1/Cytochrome c/pro-caspase 9 est nommé apoptosome. La pro-caspase 9, grâce à sa forte concentration locale au sein de l'apoptosome, s'active par autoprotéolyse et entraîne, en tant que caspase initiatrice, l'activation des caspases effectrices 3 et 7 (Wang, 2001).

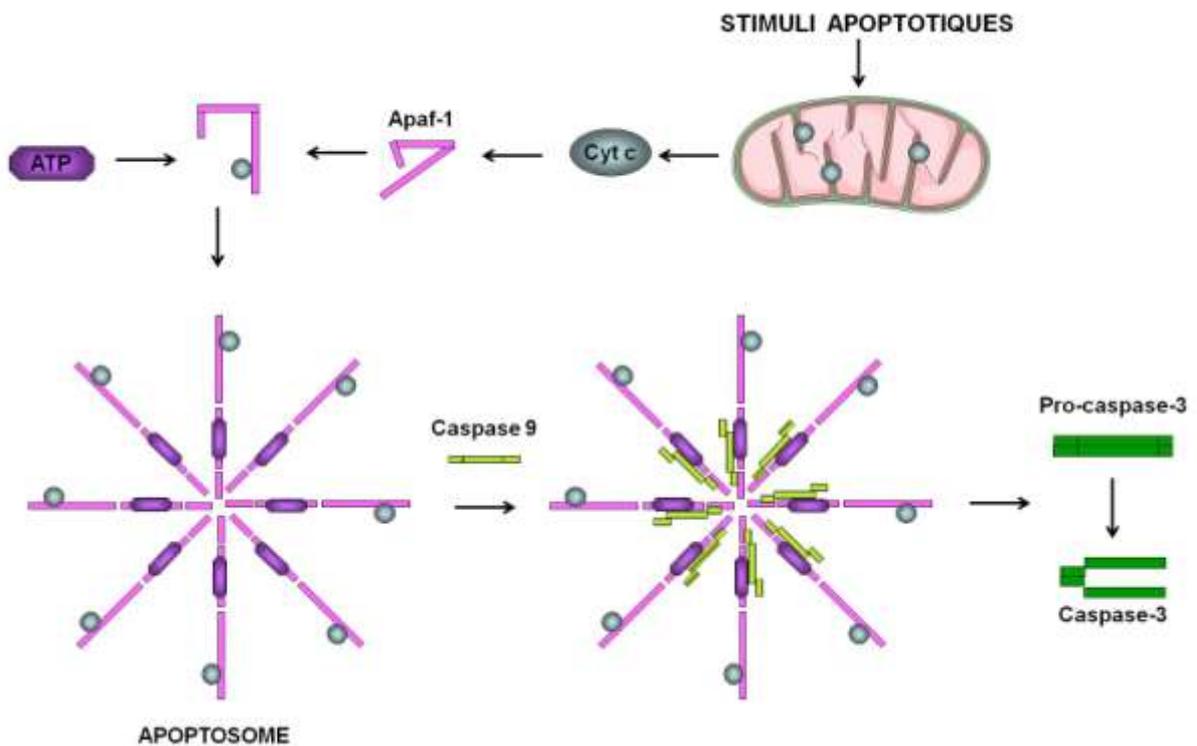


Figure 10 : Formation de l'apoptosome

(d'après Wang, 2001)

2. AIF

AIF (« apoptosis inducing factor ») est une flavoprotéine de 57kDa localisée dans l'EIM. Cette protéine possède une fonction oxydo-réductrice importante dans les neurones, et une fonction apoptogénique. AIF est physiologiquement nécessaire pour la détoxification correcte des espèces réactives de l'oxygène et pour l'assemblage et la maintenance de la chaîne respiratoire par ses propriétés d'oxydoréduction. Lors d'un stimulus apoptotique, AIF est transloquée au noyau où elle va jouer son rôle apoptotique (Daugas et al., 2000). Une fois au noyau, AIF induit une condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation de l'ADN en fragments d'environ 50kb par un mécanisme qui implique la liaison directe de AIF à l'ADN (Loeffler et al., 2001). Le rôle d'AIF dans l'apoptose est indépendant de ses fonctions d'oxydoréductions et des caspases (Miramar et al., 2001).

3. ENDONUCLEASE G

L'endonucléase G est synthétisée dans le cytoplasme puis est dirigée vers la mitochondrie *via* une signature mitochondriale. C'est une enzyme localisée dans l'EIM qui joue

un rôle dans plusieurs fonctions biologiques comme la réplication de l'ADN mitochondrial, la prolifération cellulaire, l'initiation de la recombinaison du virus de l'herpes simplex et enfin dans l'apoptose (Wu et al., 2009). Lors d'un stress apoptotique, l'endonucléase G est transloquée vers le noyau. Ce changement de localisation subcellulaire induit son activation pour fragmenter l'ADN de façon oligonucléosomale (Li et al., 2001).

4. OMI/HTRA2

Omi/HtrA2 (« high-temperature requirement A2 ») est une protéine de 49kDa composée de 5 domaines distincts. Cette protéine est localisée dans l'EIM *via* ses domaines MLS (« mitochondrial localization signal ») et TM (transmembranaire). Omi/HtrA2 possède un domaine IBM (« IAP-binding motif ») qui lui confère la capacité de lier les protéines de la famille des IAPs, son domaine PDZ permet, quant à lui, la stabilisation de ces interactions. Elle possède également une activité protéase à sérine.

Des dommages à l'ADN, une activation de récepteurs de mort ou d'autres stress apoptotiques induisent la translocation d'Omi/HtrA2 dans le cytoplasme où elle contribue au mécanisme apoptotique de façon dépendante ou indépendante des caspases.

En l'absence de stress apoptotique, les caspases sont maintenues sous forme inactive par les IAPs. De ce fait, la translocation d'Omi/HtrA2 dans le cytoplasme, lors d'un signal de mort, induit la rupture des complexes IAPs/caspases libérant les caspases qui pourront alors être activées.

Omi/HtrA2 fonctionne également comme une protéase à sérine et est à même d'induire la mort indépendamment des caspases. En effet, une dizaine de protéines ont récemment été décrites comme étant des substrats d'Omi/HtrA2. C'est notamment le cas de protéines associées au cytosquelette, à la synthèse protéique ou encore à l'apoptose.

5. SMAC/DIABLO

Conjointement avec la libération des protéines apoptogéniques, Smac/DIABLO (« second mitochondria-derived activator of caspase » ou son homologue murin DIABLO) est libéré depuis l'EIM vers le cytoplasme lors d'un stress apoptotique (Du et al., 2000). Smac/DIABLO est une protéine de 55 acides-aminés formant une séquence de signature mitochondriale en N-terminal. Lors de son arrivée à la mitochondrie Smac/DIABLO perd cette séquence laissant apparaître un nouveau domaine permettant la liaison de Smac/DIABLO aux

domaines BIR (« baculoviral inverted repeat ») des IAPs. Cette liaison neutralise les inhibiteurs des caspases, ce qui privilégie l'activation de ces dernières. Smac/DIABLO peut se lier à plusieurs IAPs dont XIAP (X-linked IAP), cIAP1, cIAP-2, Survivine et Apollon (Vaux et Silke, 2003).

C. Couplage de la voie extrinsèque et intrinsèque (tBid)

Les deux voies précédemment décrites peuvent communiquer entre elles *via* une protéine de la famille de Bcl-2 : Bid. En effet, la voie des récepteurs de mort induit l'activation par le DISC de la caspase 8, caspase qui active les caspases effectrices mais qui peut également cliver la protéine Bid. La forme tronquée de Bid notée tBid va être transloquée à la mitochondrie et induire un déséquilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 en faveur d'un signal pro-apoptotique. Ceci conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à la libération dans le cytoplasme des protéines apoptogéniques de la voie mitochondriale (Luo et al., 1998).

D. Rôle du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire qui représente le site majeur de stockage du calcium de la cellule. Il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique cellulaire, la production de macromolécules, le transfert des substances vers l'appareil de Golgi et la modification des protéines. Il a en effet un rôle crucial dans le repliement correct des protéines.

En plus de propager le signal de stress apoptotique, le RE contribue, de façon fondamentale, à la voie de l'apoptose induite par Fas et à la voie dépendante de p53 (résultant d'un dommage à l'ADN ou d'une expression d'oncogène). La libération du calcium stocké dans le RE peut alors initier l'activation de la voie de mort réticulaire mais également sensibiliser la mitochondrie à un stress pro-apoptotique.

1. ACTIVATION DE LA VOIE UPR

Lors d'un stress cellulaire tel qu'une carence en facteurs nutritifs, une modification du pH ou du taux de calcium intraréticulaire, une surexpression de certaines protéines ou encore quand la capacité du RE à replier correctement les protéines est compromise, une voie de signalisation est activée : la voie UPR (« unfolded protein response »). La voie UPR induit une augmentation du nombre de protéines chaperonnes et d'autres

protéines régulatrices permettant à la cellule de corriger ce stress (Patil et Walter, 2001). Cependant, si le stress est trop important et que l'homéostasie ne peut pas être restaurée la cellule va entrer en apoptose.

2. L' APOPTOSE INDUITE PAR UN STRESS RETICULAIRE

Lors d'un stress réticulaire, la membrane du RE devient perméable au calcium, ce qui induit l'activation des calpaïnes. Ces protéines vont activer les caspases, premièrement la caspase 12 puis la caspase 9 et enfin la caspase 3. Cette voie est renforcée par la mitochondrie et la voie PERK/eIF2 α /ATF4. En effet, le calcium libéré du RE induit une surcharge de la mitochondrie en calcium qui se traduit par la libération des facteurs apoptogènes. L'activation de la protéine CHOP par PERK/eIF2 α /ATF4 induit une augmentation des membres proapoptotiques et une diminution des membres anti-apoptotiques renforçant ainsi l'apoptose (Figure 11) (Rasheva et Domingos, 2009).

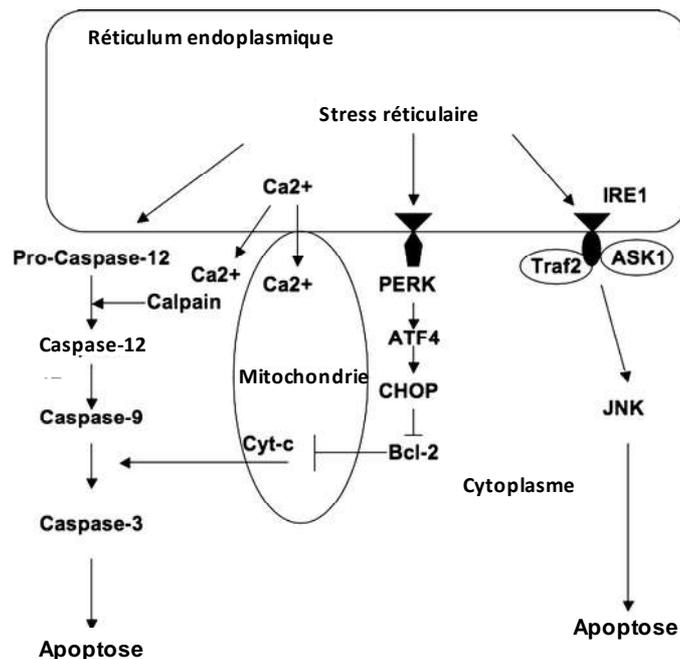


Figure 11 : Mécanisme d'induction de l'apoptose par un stress réticulaire

(d'après (Rasheva et Domingos, 2009))

C. L'APOPTOSE ET PATHOLOGIES

L'apoptose est un processus qui permet la construction, la maintenance, la défense et la réparation des tissus. Ainsi, un excès, ou, *a contrario*, un défaut d'apoptose est responsable de nombreuses pathologies. La liste des maladies dont un dysfonctionnement de l'apoptose est directement ou indirectement impliquée ne cesse de s'allonger.

1. Excès d'apoptose

Les maladies associées à un excès d'apoptose sont, par exemple, le SIDA (« syndrome d'immunodéficience acquise ») qui est caractérisé par une mort des lymphocytes T, des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson liées à la disparition respectivement des cellules cholinergiques ou dopaminergiques. Les maladies autoimmunes induisant une production d'anticorps détruisant du tissu sain (Thyroïdite d'Hashimoto, ...), les lésions ischémiques (infarctus du myocarde, attaque cérébrale, ...) ou encore le diabète de type 1 sont des pathologies causées par une apoptose excessive dans des tissus donnés.

2. Défaut d'apoptose

A l'inverse, un déficit en apoptose peut causer diverses pathologies comme des maladies auto-immunes liées à la non dégradation de cellules reconnaissant le « soi » (Polyarthrite rhumatoïde). Certaines infections virales induisent une résistance des cellules infectées aux signaux apoptotiques (adénovirus, herpes, ...). Les cancers, quels qu'ils soient, sont caractérisés, entre autre, par un défaut d'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2000). Cette caractéristique est à l'origine de l'accumulation de cellules cancéreuses dans l'organisme car elles survivent aux signaux de mort intrinsèques et présentent une résistance aux traitements.

LES PROTEINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2

A. GENERALITES

1. Découverte

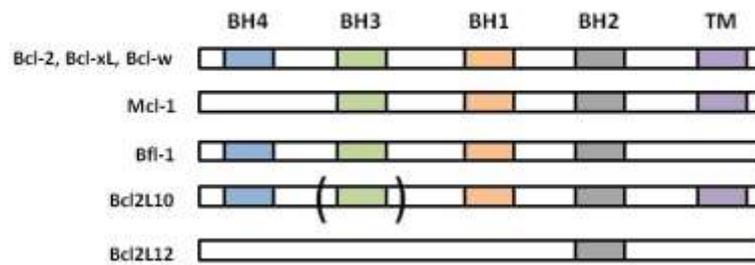
Bcl-2 (« B cell lymphoma 2 »), le membre fondateur de cette famille de protéine, qui compte près d'une vingtaine de membres, a été découvert dans les lymphomes B de type folliculaire. Dans cette pathologie, une translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) associe le locus du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines avec le gène de *Bcl-2* (Tsujimoto et al., 1984). Cette translocation induit la surexpression de Bcl-2 et confère aux cellules un avantage au niveau de la survie. De plus, Bcl-2 est le premier oncogène à avoir été identifié comme étant impliqué dans la survie cellulaire et non dans la prolifération (Vaux et al., 1988).

2. Structure

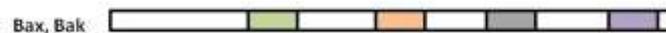
L'alignement des séquences des membres de la famille de Bcl-2 a permis la mise en évidence de séquences conservées d'acides aminés nommées domaine BH pour « Bcl-2 homology ». Ces protéines possèdent de un à quatre domaines BH participant à la formation d'hélices α . Selon le nombre de ces domaines, on peut diviser les membres de cette famille en trois groupes : (i) les protéines anti-apoptotiques qui possèdent plusieurs domaines BH ; (ii) les protéines pro-apoptotiques à multidomaines qui possèdent trois domaines BH ; et (iii) les protéines pro-apoptotiques dites à domaine « BH3 seul » caractérisées par la seule présence du domaine BH3.

Enfin, ces protéines possèdent souvent en position C-terminale une hélice α hydrophobe qui correspond à un segment transmembranaire (TM) (Figure 12).

ANTI-APOPTOTIQUES



PRO-APOPTOTIQUES A MULTIDOMAINE



PRO-APOPTOTIQUES A DOMAINE BH3 SEUL

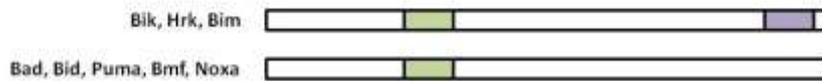


Figure 12 : Classification et structure des membres de la famille de Bcl-2

3. Localisation

La localisation subcellulaire des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 est variable en fonction des protéines. D'une manière générale, les protéines membres de cette famille sont retrouvées dans le cytoplasme et/ou liées à la membrane de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique. Cette différence de localisation s'explique en partie par la présence ou non d'un domaine transmembranaire (TM). En effet, la présence de ce dernier permet, lors d'un stress apoptotique, une relocalisation membranaire des protéines cytoplasmiques qui en sont pourvues.

B. LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES

Depuis la découverte de Bcl-2 en 1984, d'autres membres anti-apoptotiques ont été caractérisés. On compte désormais sept membres anti-apoptotiques chez l'Homme qui sont, dans l'ordre chronologique de leur découverte : Bcl-xL (Boise et al., 1993), Mcl-1 (Kozopas et al., 1993), Bfl-1 (Lin et al., 1993), Bcl-w (Gibson et al., 1996), Bcl2L10 (Song et al., 1999) et Bcl2L12 (Scorilas et al., 2001).

1. Structure des membres anti-apoptotiques

Malgré une grande diversité dans les séquences primaires des protéines, des données de RMN (« résonance magnétique nucléaire ») ont montré que les structures tridimensionnelles de Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-w sont très proches les unes des autres (Figure 13) (Denisov et al., 2003) (Petros et al., 2001).

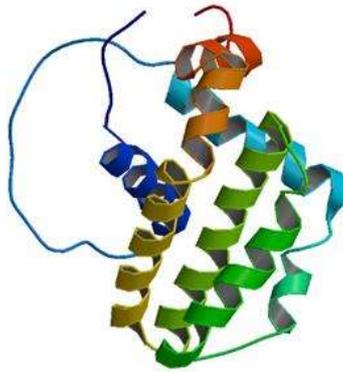


Figure 13 : Représentation « Ribbons » de la structure tridimensionnelle de Bcl-2

(D'après Petros et al., 2001)

En effet, les protéines anti-apoptotiques présentent une structure globulaire composée de 9 hélices α formées en partie par les domaines d'homologie à Bcl-2 (BH). 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 (Figure 14) (Sattler et al., 1997).

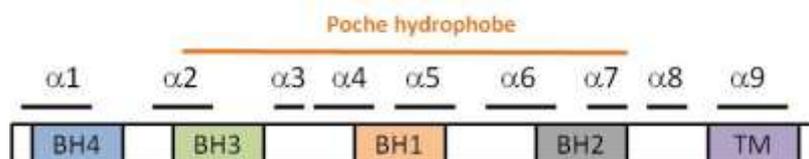


Figure 14 : Structure générale d'un membre anti-apoptotique

Ainsi, le domaine BH3 est plus particulièrement impliqué dans la liaison avec les partenaires protéiques tandis que les hélices $\alpha5$ et $\alpha6$ des domaines BH1 et BH2 sont indispensables à la formation des pores dans la membrane mitochondriale (Matsuyama et al.,

1998). Bien qu'essentielles à la fonction anti-apoptotique, les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ ne sont pas suffisantes pour inhiber la mort cellulaire et nécessitent la présence d'un domaine BH3.

Le domaine BH4, quant à lui, n'est pas présent sur tous les membres de cette famille. Ce domaine, localisé dans la partie N-terminale des protéines anti-apoptotiques, est lié au reste de la protéine par une boucle flexible de structure et de longueur variable (Aouacheria et al., 2005). Ce domaine serait impliqué dans l'activité anti-apoptotique des membres qui la possède. En effet, la suppression du domaine BH4 de Bcl-2 et de Bcl-xL rend ces protéines inactives bien que les interactions avec les membres pro-apoptotiques soient conservées (Huang et al., 1998). De plus, des études portant sur le domaine BH4 de ces deux protéines ont montré que ce domaine, à lui seul, confère la capacité d'inhiber l'apoptose en bloquant les flux calciques pro-apoptotiques (Rong et al., 2009) (Soto et Smith, 2009). Enfin, le clivage du domaine BH4 peut convertir une protéine anti-apoptotique, telle que Bcl-2, en une protéine pro-apoptotique (Cheng et al., 1997).

Lors de mes travaux, je me suis intéressée à Bcl-2 et Mcl-1, c'est pourquoi, dans cette partie, j'ai choisi de développer, plus particulièrement, ces deux membres anti-apoptotiques.

2. Bcl-2

Suite à sa découverte en 1984, de nombreuses études ont montré le rôle de Bcl-2 dans la différenciation, dans l'apoptose et dans le cycle cellulaire (Tsujimoto et al., 1984). De plus, l'expression de cette protéine est fortement contrôlée par des mécanismes agissant tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que protéique.

A. Structure

Le gène codant pour Bcl-2 est localisé en 18q21. Il est composé de 3 exons et code pour 2 protéines : Bcl-2 α et Bcl-2 β . Ces deux protéines diffèrent par leur domaine C-terminal qui est plus long dans Bcl-2 α (Tsujimoto et Croce, 1986). Bcl-2 β , dépourvue de son fragment TM, a perdu son activité anti-apoptotique ainsi que sa localisation mitochondriale (Tanaka et al., 1993). Ainsi, la protéine Bcl-2 α (ou Bcl-2), très étudiée dans la littérature, est une protéine de 25kDa (239 acides aminés) (Tsujimoto et Croce, 1986). Bcl-2 β , quant à elle, est très peu étudiée mais l'on sait, néanmoins, qu'elle est composée de 205 acides aminés pour une masse moléculaire de 22kDa.

Bcl-2 est constituée de quatre domaines BH et d'un domaine TM. Sa structure se compose de neuf hélices α , d'un coude et de deux feuillets β (Figure 15).

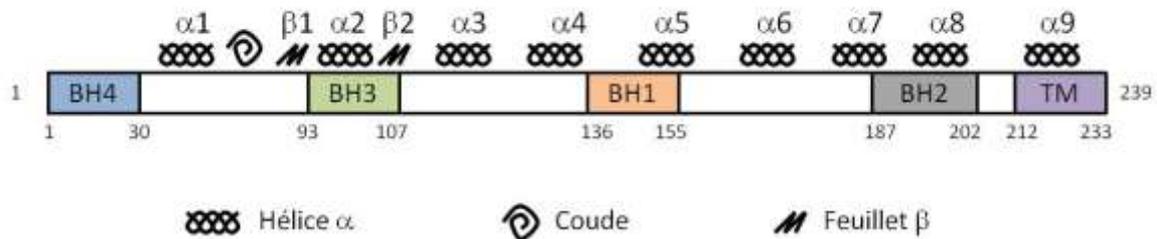


Figure 15 : Structure de Bcl-2

B. Fonctions biologiques

1. ROLE DANS L'APOPTOSE

Lors de l'apoptose par la voie mitochondriale, les protéines pro-apoptotiques à multidomaines, telles que Bax, sont activées et forment des pores au niveau de la membrane externe mitochondriale pour libérer les molécules apoptogéniques. Bcl-2, de par sa poche hydrophobe peut interagir et séquestrer les protéines de type Bax afin d'inhiber la formation de pores (Antonsson et al., 1997). Cette fonction de Bcl-2 dans l'apoptose est la mieux caractérisée.

Bien que le rôle principal de Bcl-2 dans l'apoptose soit basé sur sa capacité de bloquer l'apoptose en amont de la mitochondrie, cette dernière a également été décrite comme agissant en aval de celle-ci (Yang et al., 1997). En effet, il a été décrit que Bcl-2 peut se lier à Apaf-1 (Zou et al., 1997) et bloquer la cascade d'activation des caspases en empêchant la formation de l'apoptosome (Cosulich et al., 1999). De plus, une étude de 2005 a montré que Bcl-2 est impliquée dans la régulation de l'activation de la caspase 2, lors d'un stress induit par un dommage à l'ADN (étoposide). En effet, bien que le mécanisme d'activation de cette caspase ne soit pas encore bien documenté, cette étude montre que la surexpression de Bcl-2 bloque l'activation de cette caspase (Lin et al., 2005). Ces dernières études montrent donc que Bcl-2 est à même d'inhiber l'activation des caspases.

D'autre part, Bcl-2 joue également un rôle anti-apoptotique en régulant l'homéostasie de la membrane mitochondriale par maintien de la différence de potentiel entre l'EIM et le

cytoplasme (Schendel et al., 1997). En effet, Bcl-2 peut former des pores dans les membranes lipidiques avec des propriétés similaires à celles des toxines bactériennes ou de la diphtérie (Muchmore et al., 1996). Il est à noter que les hélices $\alpha 5$ et 6 ainsi que l'homodimérisation de Bcl-2 sont nécessaires à l'insertion dans la membrane et à la formation de ces pores. De ce fait, des expériences *in vitro* ont montré que ces pores sont fermés à pH neutre et qu'une diminution du pH permet l'ouverture de ces canaux cationiques (Schendel et al., 1997). Enfin, les interactions de Bcl-2 avec d'autres protéines peuvent modifier la formation de ces pores. Ainsi, l'interaction avec BAG1 induit la formation des pores et renforce l'activité anti-apoptotique de Bcl-2, tandis que l'interaction avec des antagonistes (Bcl-xS ou Bad) empêche la formation de ces derniers.

2. ROLE DANS LE CYCLE CELLULAIRE

Plusieurs observations ont montré que Bcl-2 joue également un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et ce de façon indépendante de son rôle anti-apoptotique.

Les premières observations qui ont permis de poser cette hypothèse montraient que la surexpression de Bcl-2 augmentait le nombre de cellules en G0 ou arrêtées en phase G1 suite à une privation en facteur de croissance (Vaux et al., 1988) (Marvel et al., 1994). Cette hypothèse a ensuite été confirmée par d'autres études portant sur des cellules B et T (Mazel et al., 1996) (O'Reilly et al., 1997).

Les domaines structuraux de Bcl-2 impliqués dans son rôle au niveau du cycle cellulaire sont multiples. Ainsi, certains sont également impliqués dans la fonction anti-apoptotiques de Bcl-2, c'est le cas de la glycine 145 et du tryptophane 188 qui appartiennent aux domaines BH1 et BH2 respectivement. Le domaine BH4 semble également impliqué dans les deux fonctions de Bcl-2 car la délétion de celui-ci induit la perte des activités anti-apoptotiques et anti-prolifératives de Bcl-2 sans pour autant interférer dans la liaison aux membres pro-apoptotiques (O'Reilly et al., 1996). Un autre domaine de Bcl-2 est, quant à lui, impliqué uniquement dans la fonction de régulation du cycle. Ce domaine, riche en résidus sérine et thréonine, correspond à la boucle présente entre les domaines BH4 et BH3. En effet, la délétion d'une grande partie de cette boucle (acides aminés : 51-85) donne naissance à une protéine anti-apoptotique qui n'interfère pas dans le cycle cellulaire (Uhlmann et al., 1996). De plus, la thréonine 28, bien qu'elle appartienne au domaine BH4 de Bcl-2, semble être impliquée

uniquement dans le cycle cellulaire (Linette et al., 1994). Ces données montrent que la fonction anti-proliférative de Bcl-2 peut être dissociée de son rôle anti-apoptotique.

En raison de son rôle majeur dans l'apoptose, l'implication de Bcl-2 dans la régulation du cycle cellulaire est moins décrite. Cependant, différentes études ont permis de définir quelques voies de signalisation par lesquelles Bcl-2 régule le cycle cellulaire. Ainsi, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 induisait l'augmentation de p130 et p27 qui sont toutes deux des inhibiteurs du cycle cellulaire (Vairo et al., 2000). En effet, l'accumulation de p130 (membre de la famille de Rb) induit l'inhibition d'E2F4 par interaction directe. E2F4 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, quant à elle, 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 (Figure 16).

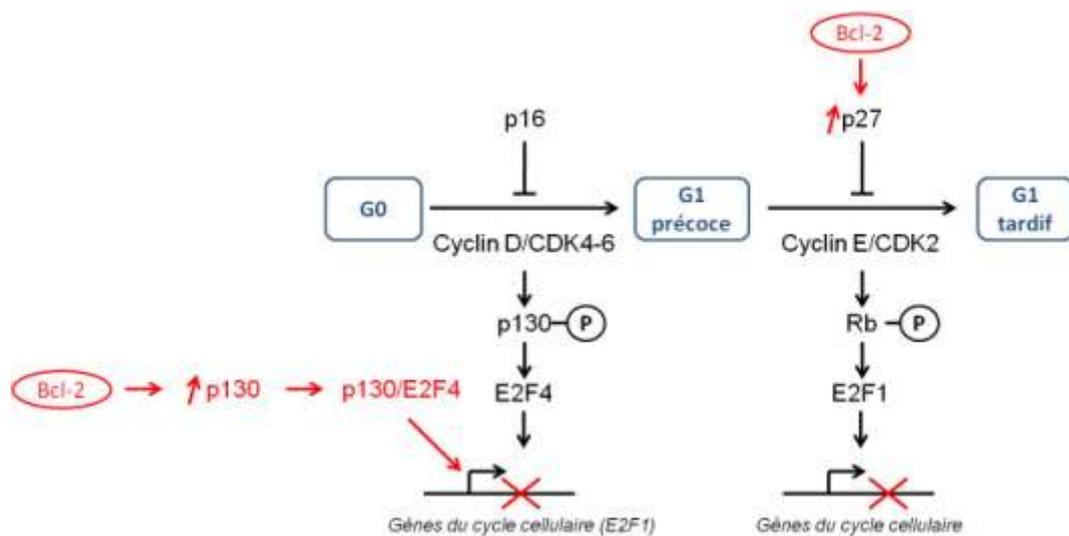


Figure 16 : Implication de Bcl-2 dans le cycle cellulaire

De plus, il est à noter que l'effet anti-prolifératif de Bcl-2 est fortement contrôlé. En effet, le statut de phosphorylation de Bcl-2 serait impliqué dans cette fonction. Ainsi, une étude portant sur des mutants de Bcl-2 mimant les formes phosphorylées de Bcl-2 en thréonine 69, sérines 70 et 87 montre une diminution de la prolifération ainsi qu'une accumulation des cellules en G0/G1 (Deng et al., 2003). D'autres études ont également rapporté l'implication de

la phosphorylation de la tyrosine 28 ou 56 dans l'arrêt du cycle en phase G1 (Linette et al., 1996) (Janumyan et al., 2008).

Enfin, il a été récemment mis en évidence que Bcl-2 peut jouer un rôle dans la mitose. En effet, lors de cette phase, Bcl-2 fait parti d'un complexe formé, entre autre, de CDC2 et de PP1 (Barboule et al., 2005). CDC2 est une kinase régulatrice majeure de la transition G2/M qui phosphoryle Bcl-2 sur la thréonine 56. Cette phosphorylation est corrélée avec un arrêt des cellules en G2/M et la mutation de ce site abroge l'effet anti-prolifératif de Bcl-2 (Furukawa et al., 2000). De plus, PP1, qui fait parti de ce complexe, peut déphosphoryler Bcl-2 et ainsi permettre l'entrée en anaphase et la sortie de mitose (Cheng et al., 2000) (Brichese et Valette, 2002).

C. Synthèse et dégradation

1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

Le gène codant pour Bcl-2 est composé de trois exons et deux introns. La transcription de ce gène se fait par deux régions promotrices distinctes (P1 et P2) (Figure 17). P2 est localisée en 5' de l'ORF (« open reading frame ») dans l'exon 2 et contient une TATA box et une CAAT box. Ce promoteur donne généralement peu de transcrits. P1 est, quant à elle, localisée dans l'exon 1 dans une région riche en CG. Elle ne contient pas de TATA box ou CAAT box mais possède plusieurs sites de liaison de Sp1 et plusieurs sites d'initiation de la transcription (Seto et al., 1988). Il est à noter que cet exon ne sera pas traduit par la suite.

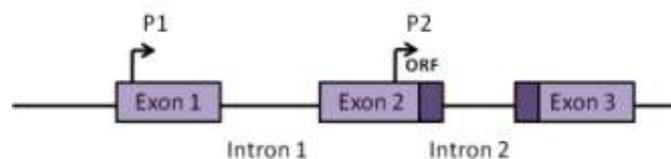


Figure 17 : Gène de Bcl-2

Les facteurs de transcriptions qui ont été identifiés comme induisant la transcription de Bcl-2 sont : Brn3a dans les cellules neuronales, WT1, Aiolos dans les cellules T, HIV tat, Gli1 et Pax8. En plus de ces facteurs de transcription, P1 possède un site de liaison de Pie1 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).

Enfin, bien que le mécanisme d'induction ne soit pas précisément connu, plusieurs études ont décrit que l'expression du gène de Bcl2 peut être augmentée par l'IL-7 (von Freeden-Jeffry et al., 1997), l'IL-15 (Kurowska et al., 2002), l'IGF-1 (Beierle et al., 2002) et par p53 (Miyashita et al., 1994).

2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

L'expression de Bcl-2 peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel par les micro-ARN. Il a été montré dans des lignées de leucémie lymphoïde chronique (LLC) que le niveau d'expression de Bcl-2 est inversement corrélé au niveau d'expression des micro-ARN miR-15 et miR-16 et que l'expression de ces micro-ARN induit une diminution de l'expression de Bcl-2 (Cimmino et al., 2005).

L'ARNm de Bcl-2 peut aussi être dégradé *via* hnRNPL (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L ») et AUF-1. En effet, ces protéines se lient sur la région 3'UTR de l'ARNm de Bcl-2 et recrutent les protéines de l'exosome conduisant à la dégradation de l'ARNm (Lee et al., 2009). *A contrario*, l'ARNm de Bcl-2 possède également, dans cette région, une séquence riche en AU qui est impliquée dans sa stabilité. De fait, il a été montré que la liaison de la nucléoline à cette région augmente le temps de demie-vie de cet ARNm (Ishimaru et al., 2010) (Sengupta et al., 2004).

3. REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE

La dérégulation de l'expression et/ou des modifications post-traductionnelles de Bcl-2 ont été décrites dans de nombreuses pathologies. Ainsi, la phosphorylation, le clivage ou la dégradation de cette protéine modifient l'activité de Bcl-2 et, par conséquent, le devenir de la cellule (Fadeel et al., 1999).

a. Phosphorylation

Les phosphorylations de Bcl-2 ont lieu dans la région reliant les domaines BH3 et BH4. Cette région, constituée des acides aminés 30 à 93, est riche en proline et contient plusieurs résidus sérine et thréonine pouvant être phosphorylés (Blagosklonny, 2001). La figure 18 représente les sites de phosphorylation connus de Bcl-2.

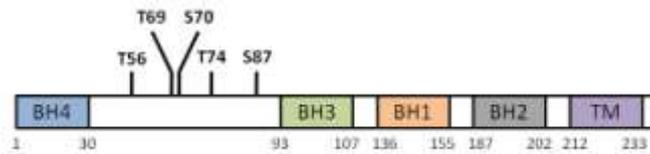


Figure 18 : Sites de phosphorylation connus de Bcl-2

L'effet des phosphorylations de Bcl-2 sur sa stabilité ou sa fonction sont très variables (Blagosklonny, 2001). En effet, certaines phosphorylations ont été reportées comme augmentant le rôle anti-apoptotique de Bcl-2 tandis que d'autres l'abrogent. Par exemple, les phosphorylations induites par Raf-1 (Blagosklonny et al., 1997) ou par la PKA (Srivastava et al., 1998) rompent des complexes que Bcl-2 forme avec les membres pro-apoptotiques afin de renforcer un signal apoptotique. D'autres phosphorylations induisent, quant à elles, la dégradation de Bcl-2 par le protéasome, c'est notamment le cas de la phosphorylation sur la S70 (Lin et al., 2006). A l'inverse, certaines phosphorylations de Bcl-2 confèrent à cette protéine un renforcement de son activité anti-apoptotique. En effet, la phosphorylation de Bcl-2 par la voie MAPK/ERK1-2 augmente la stabilité de cette protéine (Breitschopf et al., 2000).

De plus, il a été rapporté récemment que la phosphorylation de Bcl-2 par JNK, sur les résidus T69, S70 et S87, rompait les complexes Bcl-2/Beclin-1. La libération de Beclin-1 activerait alors la voie autophagique (Pattingre et al., 2009).

Enfin, comme il a été décrit dans la partie traitant du rôle de Bcl-2 dans le cycle cellulaire, certaines études suggèrent que la phosphorylation de Bcl-2 peut être associée à la régulation du cycle plutôt qu'à la régulation de l'apoptose (Barboule et al., 2009) (Janumyan et al., 2008) (Furukawa et al., 2000).

De ce fait, le rôle de la phosphorylation de Bcl-2 dans l'apoptose dépend non seulement des sites de phosphorylation impliqués mais également du contexte cellulaire dans lequel ces événements prennent place (Blagosklonny, 2001).

b. Clivage

Plusieurs études ont montré que Bcl-2 pouvait être le substrat des caspases 3 et 9 et des calpaïnes (Chen et al., 2007). En effet, Bcl-2 possède deux sites de clivage par les caspases et un site de clivage par les calpaïnes, présentés en figure 19.

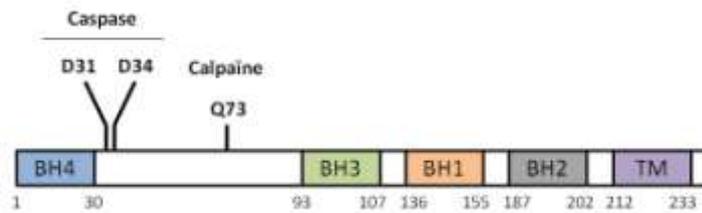


Figure 19 : Sites de clivage par les caspases et calpaïnes de Bcl-2

De plus, il a été mis en évidence que l'utilisation d'inhibiteurs des caspases et des calpaïnes bloquent la formation du fragment clivé (Grandgirard et al., 1998) (Gil-Parrado et al., 2002). Le clivage de Bcl-2 induit la perte du domaine BH4. Le clivage des 34 premiers acides aminés, bien que ce site de clivage soit protégé par FKBP38 (« FK506-binding protein 38 »), inactive l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et libère un fragment pro-apoptotique (Choi et al., 2010). En effet, les autres domaines (BH1, BH2 et BH3) de la protéine clivée peuvent être fonctionnels et faire de cette protéine initialement anti-apoptotique une protéine pro-apoptotique par l'exposition du domaine BH3. Bien que Bcl-2 soit supposée inhiber l'activation des caspases en aval de la mitochondrie, Bcl-2 peut également être leur substrat, ce qui suggère l'existence d'une boucle d'amplification conduisant à la mort de la cellule (Cheng et al., 1997).

4. MODIFICATION CONFORMATIONNELLE

Bcl-2 peut être phosphorylée, clivée mais elle peut également subir des modifications conformationnelles qui font varier son activité.

Le domaine BH3 de la protéine Bcl-2 native est dissimulé dans la structure globulaire et participe à la formation de la poche hydrophobe responsable de son activité anti-apoptotique. Il a été récemment décrit que Bcl-2 peut devenir pro-apoptotique suite à un changement de conformation *via* Nur77 (TR3), de la famille des récepteurs nucléaires orphelins (Kolluri et al., 2008). Nur77 a une localisation principalement cytoplasmique en conditions normales et peut transloquer aussi bien au noyau qu'à la mitochondrie en fonction des signaux reçus. Cette protéine intervient dans la mort des cellules cancéreuses induite par des agents antinéoplasiques *via* son domaine LBD (« ligand-binding domain »). Le domaine LBD de Nur77 interagit avec la partie N-terminale de Bcl-2 (Zhang, 2007) et le complexe Nur77/Bcl-2, ainsi

formé, déplace le domaine BH4 de Bcl-2 exposant ainsi le domaine BH3 (Figure 20). Ce complexe transloque ensuite à la mitochondrie où il induit l'apoptose (Lin et al., 2004).

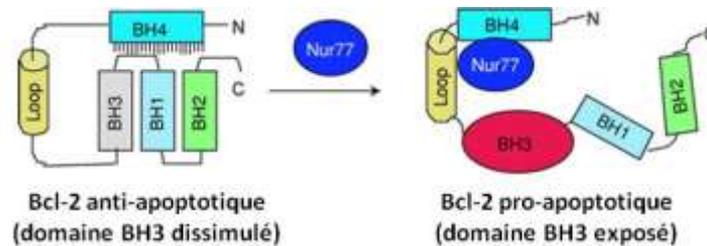


Figure 20 : Nur77 rend Bcl-2 pro-apoptotique

(d'après Zhang 2007)

5. DEGRADATION PAR LE PROTEASOME

La dégradation de Bcl-2 se fait par le protéasome qui est le principal mode de dégradation protéique des cellules eucaryotes (Breitschopf et al., 2000). Dans cette voie de dégradation, les protéines qui vont être dégradées sont marquées par la liaison d'une chaîne de poly-ubiquitine par le biais de l'intervention de trois enzymes (E1, E2 et E3).

Il a récemment été décrit que le complexe Cul3-Rbx1 est responsable de l'ubiquitylation de Bcl-2 sur la lysine 17. En effet, ce complexe est recruté par l'intermédiaire de la protéine INrf2 (« cytosolic inhibitor of NF-E2 related factor 2 ») qui interagit avec le domaine BH2 de Bcl-2 *via* son domaine DGR (Niture et Jaiswal, 2010).

Une fois poly-ubiquitylée, Bcl-2, est dégradée par le protéasome. Celui-ci est constitué de l'assemblage de deux sous-unités : la sous-unité 20S possède les sites catalytiques à activité protéase tandis que la sous-unité 19S, composée d'ATPases, est impliquée dans la spécificité d'action du protéasome. Le protéasome génère plusieurs types de produits : des peptides libres, des peptides ubiquitylés et des chaînes d'ubiquitines qui seront ensuite dégradées complètement par des hydrolases et des isopeptidases.

Plusieurs évidences montrent que les phosphorylations ou autres modifications post-traductionnelles induisent un changement de conformation de Bcl-2 et ont un effet direct sur la stabilité de Bcl-2. En effet, la phosphorylation de Bcl-2 sur la S70 est nécessaire pour rompre l'interaction entre INrf2 et Bcl-2, suggérant que le statut de phosphorylation de Bcl-2 est impliqué dans sa dégradation (Niture et Jaiswal, 2010). De plus, il a été décrit dans la littérature

que la S-Nitrosylation de Bcl-2 sur les résidus cystéines 158 et 229 inhiberait la dégradation de Bcl-2 par le protéasome et ce, quelque soit son statut de phosphorylation (Azad et al., 2006).

D. Localisation tissulaire

Le gène de Bcl-2 est exprimé dans une grande variété de tissus. Ainsi, de forts niveaux d'expression de Bcl-2 sont retrouvés dans les cellules pro-B et B matures, dans le thymus, le foie, l'utérus, le placenta et les organes lymphoïdes. Une diminution de son niveau d'expression est observée dans les motoneurons durant la période embryonnaire et post-natale (Michaelidis et al., 1996) aussi bien que lors de la différenciation des lymphocytes B et T (Murasawa et al., 2002) (Linette et al., 1994). Bcl-2 est exprimée dans les glandes mammaires uniquement en absence de grossesse (Schorr et al., 1999). Bcl-2 est également fortement impliquée dans la survie des lymphocytes T matures (Kirkin et al., 2004).

3. Mcl-1

Mcl-1 (« myeloid cell leukemia-1 ») ou Bcl2L3 (« Bcl-2 like 3 ») est une protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 qui a été identifiée en 1993 dans la lignée myéloïde ML-1 (Kozopas et al., 1993). Depuis, Mcl-1 a été décrite dans de nombreux types cellulaires comme une molécule clé de l'apoptose.

A. Structure

Le gène humain qui code pour Mcl-1 est localisé sur le chromosome 1 (1q21). Ce gène, composé de 3 exons et 2 introns, code pour trois protéines du fait d'un épissage alternatif (Craig et al., 1994). La figure 21 représente la structure des trois isoformes de Mcl-1.

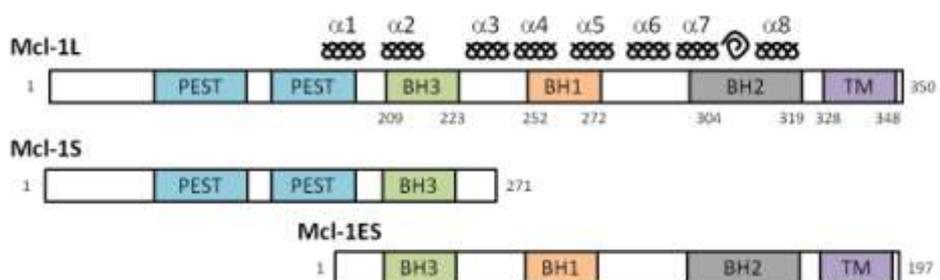


Figure 21 : Structure des trois isoformes de Mcl-1

Ainsi, la forme longue de Mcl-1 autrement nommée Mcl-1_L est une protéine de 37 kDa qui possède trois domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1, BH2 et BH3) et un domaine TM. Cette protéine anti-apoptotique ne possède pas de domaine BH4 en N-terminal, contrairement à la plupart des protéines anti-apoptotiques de cette famille, mais possède des domaines PEST (séquence riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine). Ces domaines jouent un rôle prépondérant dans la stabilité de la protéine, car les protéines possédant des domaines PEST sont rapidement dégradées (Kozopas et al., 1993). Les résidus 170 à 300 de Mcl-1 (Mcl-1_L) contenant les trois domaines BH présentent une forte homologie structurelle et fonctionnelle avec Bcl-2 et Bcl-xL ce qui lui confère la capacité de s'hétérodimériser avec d'autres membres de la famille de Bcl-2 (Lutz, 2000).

Mcl-1_S est produite suite à un épissage alternatif conduisant à la perte de l'exon 2. Cette protéine a perdu les domaines BH1, BH2 et TM et joue un rôle pro-apoptotique *via* son domaine BH3 unique et peut interagir avec Mcl-1_L pour l'inhiber (Bae et al., 2000).

La troisième isoforme, Mcl-1_{ES} est le produit d'un épissage alternatif caractérisé par la perte de l'exon 1 et qui se traduit par l'absence de 53 acides aminés dans le domaine PEST. Cette protéine de 197 acides aminés possède les trois domaines BH et le domaine TM. L'exposition du domaine BH3 lui permet de jouer un rôle pro-apoptotique en interagissant et neutralisant Mcl-1_L (Kim et al., 2009).

B. Fonctions biologiques

1. ROLE DANS L'APOPTOSE

Mcl-1 présente à la surface de sa structure tridimensionnelle une poche hydrophobe nécessaire à la liaison des protéines à domaine BH3. Cette poche hydrophobe permet à Mcl-1 (Mcl-1_L) de bloquer l'initiation de l'apoptose par inhibition de contact des protéines pro-apoptotiques à multidomaines telles que Bak. Ces dernières, séquestrées par Mcl-1, seront incapables de former des pores dans la membrane mitochondriale et donc d'enclencher l'apoptose par la voie mitochondriale (Zhai et al., 2008).

Mcl-1 peut également se lier et inhiber les protéines à domaine « BH3 seul ». La force d'interaction entre Mcl-1 et ces membres de la famille de Bcl-2 varie en fonction de leur affinité. Ainsi, Mcl-1 interagit fortement avec Bim, Puma ou Noxa et faiblement avec Hrk, Bik, Bmf et Bid. L'interaction de Mcl-1 avec ces protéines induit la dissociation des complexes que

Mcl-1 forme avec les membres pro-apoptotiques à multidomains (Chen et al., 2005). Cela a pour effet la libération des membres pro-apoptotiques de type Bak et, de ce fait, la mort par apoptose.

Implication dans la tumorigénèse

Mcl-1 est souvent induite par des signaux de survie et confère donc aux cellules une protection vis-à-vis de l'apoptose. En effet, notre équipe a montré que l'IL-6, qui est le facteur de croissance principal des cellules de MM, augmente l'expression de cette protéine dans les lignées, leur conférant ainsi une résistance envers ce mécanisme de mort cellulaire (Puthier et al., 1999a).

La surexpression de Mcl-1 est retrouvée dans certains cancers et est toujours associée à une résistance accrue de ces cellules vis-à-vis des agents anticancéreux, tel que TRAIL (« Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand ») (Son et al., 2010) La diminution de Mcl-1 s'avère nécessaire pour permettre un traitement efficace contre ces tumeurs (Olberding et al., 2010).

Implication dans la différenciation cellulaire

A l'origine, Mcl-1 a été identifiée par l'augmentation de son expression lors de la différenciation d'une lignée de leucémie myéloïde, ML-1. En effet, lors d'un stimulus de différenciation par le TPA, une augmentation rapide de Mcl-1 est observée, précédant même l'apparition des marqueurs de différenciation (Kozopas et al., 1993). Puis, il a été montré que l'expression de Mcl-1 est essentielle à la différenciation hématopoïétique. De fait, l'inhibition de cette protéine au cours de cette étape induit la mort des monocytes (Moulding et al., 2000). De plus, Mcl-1 est également impliquée dans la différenciation des cellules lymphoïdes car une expression faible de Mcl-1 est retrouvée dans les LB naïfs et les LB mémoires tandis que les cellules B des centres germinatifs expriment fortement Mcl-1 (Krajewski et al., 1995).

Enfin, une augmentation de Mcl-1 a également été observée dans de nombreuses lignées myéloïdes et lymphoïdes en réponse à différents stimuli de différenciation (Yang et al., 1996) (Klampfer et al., 1999). Bien qu'un lien direct entre les programmes de mort et de différenciation n'ait pas été clairement établi, Mcl-1 permet néanmoins la protection de ces cellules vis-à-vis de l'apoptose lors de la différenciation cellulaire (Craig, 2002).

2. ROLE DANS L'EMBRYOGENESE

Une étude de 2000 a mis en évidence le rôle de Mcl-1 dans l'embryogénèse murine. La délétion de Mcl-1 affecte l'implantation de l'embryon dans l'utérus. En effet, ces cellules délétées ne présentent pas un taux d'apoptose plus élevé mais un retard dans la maturation. Ce modèle indique donc que Mcl-1 est essentiel pour le développement avant l'implantation et pour l'implantation elle-même, suggérant que Mcl-1 jouerait un rôle autre que celui d'anti-apoptotique (Rinkenberger et al., 2000).

3. ROLE DANS LE DOMMAGE A L'ADN

En plus de ses rôles dans l'apoptose ou l'embryogénèse, Mcl-1 est maintenant connue pour jouer un rôle dans la progression du cycle cellulaire du fait de ses interactions avec des acteurs du cycle comme CHK1 (« checkpoint 1 protein »), PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») et CDK1 (« cyclin dependant kinase »). En effet, il a été montré qu'une forme courte de Mcl-1, Mcl-1sn, peut induire la phosphorylation de CHK1 lors d'un dommage à l'ADN, activant aussi la voie de réparation par ATR (« AT mutated and Rad3 related ») (Jamil et al., 2008). Les interactions de Mcl-1sn avec PCNA et CDK1 vont, quant à elles, avoir pour effet d'inhiber leurs fonctions respectives dans le cycle cellulaire, bloquant ainsi la progression du cycle (Jamil et al., 2005) (Fujise et al., 2000).

Mcl-1sn ne serait pas issue d'un épissage alternatif mais plutôt d'une protéolyse de la forme Mcl-1_L. Mcl-1sn est une protéine de 35kDa qui aurait perdu son domaine TM et est localisée au noyau. Cette forme de Mcl-1 est, cependant, encore très peu décrite (Jamil et al., 2005).

C. Synthèse et dégradation

Mcl-1 est une protéine qui a un temps de demie-vie très court (3 heures). Sa synthèse comme sa dégradation sont très finement régulées par de nombreux facteurs (Akgul et al., 2000).

1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

De nombreux facteurs peuvent induire la transcription de Mcl-1 et parmi eux des cytokines mais aussi des facteurs de croissance. En effet, l'IL-6, l'IL-3 et le VEGF vont induire une augmentation de la transcription de Mcl-1 *via* l'activation de STAT3 (Puthier et al., 1999a) (Lee

et al., 2005). Une telle augmentation peut également être obtenue par l'activation d'autres facteurs de transcriptions comme CREB (« CRE binding protein ») par la voie PI3K/Akt (Wang et al., 1999) ou encore le facteur PU1 *via* la voie p38/MAPK (Wang et al., 2003).

A contrario, la transcription de Mcl-1 peut également être diminuée. Bien que dans la plupart des cas, l'inhibition des facteurs de transcription est seule responsable d'une telle diminution, il a cependant été décrit que le promoteur de *Mcl-1* peut être directement ciblé, lors d'une privation en facteur de croissance ou une induction d'apoptose, par E2F afin de stopper la transcription du gène (Croxtton et al., 2002).

2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

Comme la protéine, l'ARNm de Mcl-1 est connu pour avoir une très courte durée de vie. Sa transcription est très contrôlée et peut être inhibée par la liaison de microARN (miR-29) mais aussi par la liaison de la protéine CUGBP2 en 3'UTR. Ces événements ont pour effet la diminution de la prolifération et l'induction de l'apoptose (Subramaniam et al., 2008) (Mott et al., 2007).

3. REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE

Mcl-1 se différencie des autres membres anti-apoptotiques notamment par son long domaine N-terminal composé de plusieurs motifs qui modifient sa durée de vie, sa localisation sub-cellulaire et son statut de phosphorylation. L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles permettent à la protéine de répondre rapidement et de façon réversible aux différents signaux environnementaux.

a. Phosphorylation

Les domaines PEST de Mcl-1 sont riches en site de phosphorylation ce qui influence la fonction et le devenir de la protéine. Ainsi, la phosphorylation de deux résidus thréonine et de quatre résidus sérine sont maintenant connues (Figure 22).

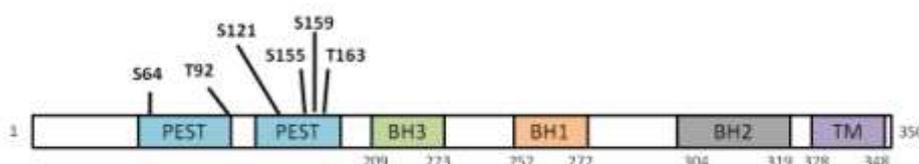


Figure 22 : Sites de phosphorylation de Mcl-1

La sérine 64 peut être phosphorylée par CDK1, CDK2 et par JNK, augmentant ainsi la capacité de liaison de Mcl-1 aux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Kobayashi et al., 2007). La voie JNK peut également induire la phosphorylation de la sérine 121 et de la T163. Bien que controversée, cette double phosphorylation semble être impliquée dans la stabilité et la fonction de Mcl-1 (Inoshita et al., 2002) (Kodama et al., 2009). La voie MAPK/ERK1 peut, quant à elle, conduire aux phosphorylations des thréonines 92 et/ou 163 augmentant, de ce fait, la stabilité de Mcl-1 (Domina et al., 2004) (Ding et al., 2008). La GSK3 (« glycogène synthase kinase 3 ») induit, pour sa part, la phosphorylation des sérines 155 et 159. Il a été rapporté que la phosphorylation de la S155 diminue l'expression de Mcl-1 et celle de la S159 (en association avec celle de la T163) provoque la rupture des liaisons de Mcl-1 avec ses partenaires ainsi que la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Maurer et al., 2006). Enfin, en association avec les phosphorylations des sérines 155 et 159, la phosphorylation de la thréonine 163 diminue le rôle anti-apoptotique de Mcl-1 en induisant le recrutement d'une E3 ligase et la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Figure 23) (Ding et al., 2007).

Sites	Kinases	Effet
S64	CDK1, CDK2, JNK	↗ Liaison aux membres pro-apoptotiques
S121 + T163	JNK	Stabilité et fonction anti-apoptotique
T163	MAPK/ERK1	↗ Stabilité
T92 + T163	MAPK/ERK1	↗ Stabilité
S155	GSK3	↗ Dégradation par le protéasome
S159 + T163	GSK3	↗ Dégradation par le protéasome
S155 + S159 + T163	GSK3	↗ Dégradation par le protéasome

Figure 23 : Tableau récapitulatif des phosphorylations de Mcl-1

b. Clivage

Mcl-1 ne semble être clivée que par les caspases. Le clivage de Mcl-1 par ces dernières a lieu au niveau de deux résidus aspartiques : Asp127 et Asp157, qui se trouvent dans les régions PEST (Figure 24) (Snowden et al., 2003) (Herrant et al., 2002).

Le clivage en Asp127 induit la formation de deux fragments de 25kDa et de 17kDa. Le fragment de 25kDa représente la forme C1 de Mcl-1. Notre équipe a mis en évidence que Mcl-1^{C1}, générée par les caspases 3 et 9 joue un rôle pro-apoptotique *via* l'interaction directe avec Bax ce qui a pour effet d'activer et d'induire la translocation de Bax à la mitochondrie (Ménoret et al., 2010). De plus, il a été montré que cela modifie la localisation subcellulaire de Mcl-1, augmente son association avec Bim et inhibe sa fonction anti-apoptotique (Herrant et al., 2004). Le clivage en Asp157, quant à lui, forme des fragments de 23kDa et 19kDa. Le fragment le plus long est nommé C2. Mcl1^{C2} semble également jouer un rôle pro-apoptotique (Weng et al., 2005) (Herrant et al., 2004) mais ceci est cependant controversé (Clohessy et al., 2004).

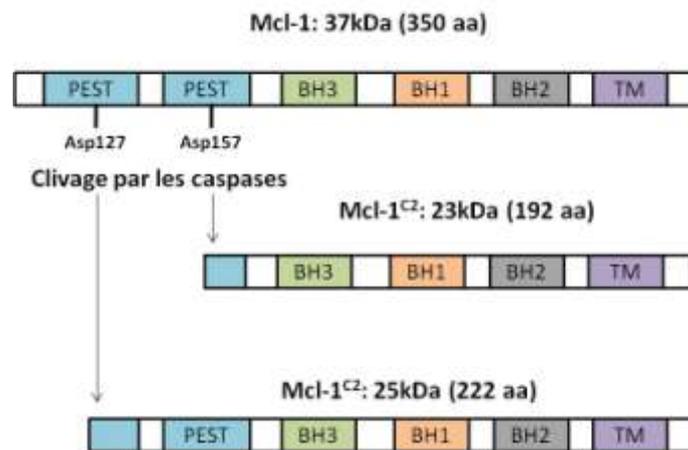


Figure 24 : Schéma du clivage de Mcl-1 par les caspases

Ces fragments de Mcl-1 (Mcl-1^{C1} et Mcl-1^{C2}) sont composés des domaines BH1, BH2, BH3 et TM ce qui leur confère une structure et une fonction similaire aux protéines pro-apoptotiques à multidomains. En effet, ces clivages, décrits dans plusieurs types cellulaires et en réponse à divers agents chimiothérapeutiques, semblent jouer un rôle dans le déclenchement de l'apoptose (Gomez-Bougie et al., 2005) (Menoret et al., 2006) (Rieber et Rieber, 2008).

4. DEGRADATION PAR LE PROTEASOME

L'ubiquitylation de Mcl-1 nécessaire à sa dégradation par le protéasome, est régulée positivement par Mule (« Mcl-1 ubiquitin ligase E3 ») et la β TrCP (« beta transducin-containing protein ») et négativement par USP9X.

Mule interagit avec Mcl-1 *via* son domaine BH3 afin de transférer la chaîne de poly-ubiquitine sur les résidus lysine K5, K40, K136, K194 et K197 de Mcl-1. Bien que Mcl-1 possède cinq sites d'ubiquitinylation, le résidu K136 semble être le site majeur d'ubiquitinylation (Zhong et al., 2005). Il est à noter qu'une surexpression de Noxa induit le recrutement de Mule sur Mcl-1. Ainsi, lorsque Noxa est complexée à Mcl-1, elle favorise la dégradation de cette dernière par le protéasome (Gomez-Bougie et al.).

La β TrCP est une autre E3 ligase impliquée dans la dégradation de Mcl-1. La phosphorylation de Mcl-1 sur la S159 par la GSK3 est nécessaire pour la liaison de la β TrCP à Mcl-1 et l'ubiquitinylation de cette dernière (Ding et al., 2007). Cette E3 ligase intervient notamment en réponse à une privation en facteur de croissance (Maurer et al., 2006).

Les déubiquitines ont pour fonction d'hydrolyser les chaînes de poly-ubiquitines des protéines afin d'empêcher leur dégradation et USP9X est l'une d'entre-elles. USP9X joue un rôle dans la déubiquitinylation de Mcl-1 par hydrolyse de la chaîne de poly-ubiquitines liée à la lysine 48 (Schwickart et al., 2010).

D. Localisation tissulaire

Mcl-1 est exprimée dans un grand nombre d'organes et de tissus épithéliaux (prostate, sein, endomètre épiderme, estomac, intestin, foie, muscles cardiaques ou squelettiques, colon et les voies respiratoires). Dans les cellules épithéliales, le niveau d'expression de Mcl-1 varie en fonction du degré de différenciation des cellules. Ainsi, une plus forte expression est retrouvée dans les cellules les plus différenciées. Dans le système lymphoïde, Mcl-1 est retrouvée dans les lymphocytes B des centres germinatifs, des lymphocytes activés et des plasmocytes. Mcl-1 est également retrouvée dans les autres cellules hématopoïétiques telles que les neutrophiles ou les macrophages (Krajewski et al., 1995) (Marriott et al., 2005).

4. Autres protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

A. Bcl-xL

Bcl-xL (Bcl2L2, Bcl-X) possède les quatre domaines BH et un domaine transmembranaire en C-terminal qui lui confèrent son activité anti-apoptotique. En effet, Bcl-xL a été décrit comme interagissant avec de nombreux membres pro-apoptotiques tels que : Puma (Yu et al.,

2001), Bad (Petros et al., 2000), Bim (Liu et al., 2003), tBid (Yao et al., 2009) ou encore Noxa (Lopez et al., 2010). Bcl-xL s'hétérodimérise également avec les membres pro-apoptotiques à multidomaines tels que Bax et Bak (Sedlak et al., 1995) (Sattler et al., 1997). De part sa structure tridimensionnelle, Bcl-xL, comme Bcl-2, est capable de former des canaux ioniques *in vitro* (Muchmore et al., 1996) (Minn et al., 1997). Cela suggère que Bcl-xL peut contrôler la survie des cellules en régulant la perméabilité des membranes mitochondriales permettant ou non la libération du cytochrome c. D'un autre côté, il semblerait que Bcl-xL puisse se lier de façon directe à APAF-1 et ainsi former un complexe protéique inhibant l'activation de la caspase 9 en aval de la mitochondrie (Zou et al., 1997). Bcl-xL peut également interagir avec les caspases et empêcher leur activation. Cependant, mais elle peut également être leur cible devenant ainsi pro-apoptotique par perte de son domaine BH4 et exposition de son domaine BH3 (Clem et al., 1998).

Le gène codant pour Bcl-xL est soumis à un épissage alternatif donnant naissance à deux autres protéines : Bcl-xS et Bcl-x γ (Grillot et al., 1997). La forme courte, nommée Bcl-xS, est une protéine pro-apoptotique à domaine « BH3 seul » qui induit l'apoptose par liaison de son domaine BH3 dans la poche hydrophobe de Bcl-2 ou Bcl-xL afin d'inhiber leur fonction anti-apoptotique (Boise et al., 1993). Le dernier variant d'épissage, Bcl-x γ , a été identifié dans les lymphocytes T. Son interaction avec le TCR (« récepteur des lymphocytes T ») régit l'activation ou la mort des LT suite à la liaison d'un peptide antigénique présenté par le CMH (« complexe majeur d'histocompatibilité ») (Yang et al., 1997).

B. Bcl-w

Bcl-w, ou encore Bcl2L2 est une protéine de 193 acides aminés qui possède tous les domaines d'homologie avec les membres de la famille de Bcl-2 ainsi qu'un domaine TM en C-terminal. Grâce à ces domaines BH, Bcl-w interagit avec les membres pro-apoptotiques suivants : Bim, Bax, Bak, Bad et Bik (O'Connor et al., 1998) (Holmgreen et al., 1999). La poche hydrophobe de Bcl-w est bloquée par l'hélice $\alpha 8$ placée en C-terminal de cette protéine (Denisov et al., 2003). Le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques partenaires de Bcl-w entre dans la poche hydrophobe ce qui libère l'hélice $\alpha 8$. Cette hélice va permettre l'encrage de Bcl-w dans la membrane mitochondriale et la neutralisation du rôle anti-apoptotique de Bcl-w (Wilson-Annan et al., 2003).

C. Bfl-1

Bfl-1/Bcl2A1 est un membre de la famille de Bcl-2 atypique. En effet, son domaine transmembranaire forme une hélice $\alpha 9$ qui lui confère une double conformation tridimensionnelle (Choi et al., 1995). Ainsi, lorsque l'hélice $\alpha 9$ est présente dans la poche hydrophobe, la molécule est rigidifiée et l'accès aux domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques est limité. Présentée en dehors de la forme globulaire, l'hélice $\alpha 9$ permet l'ancrage de Bfl-1 dans la membrane mitochondriale (Brien et al., 2009).

Bfl-1 joue principalement un rôle anti-apoptotique en inhibant la perte du cytochrome c, le clivage de la caspase 9 et de PARP. *A contrario*, elle ne peut empêcher le clivage des caspases 8 et 3 (Duriez et al., 2000). De plus, elle interagit et inhibe des membres pro-apoptotiques tels que Bok (Hsu et al., 1997), Bim (Hsu et al., 1998), Bak, Bik (Holmgreen et al., 1999), Bad (Bae et al., 2001), Bid et tBid (Werner et al., 2002). D'autres études ont montré qu'une protéolyse ou délétion de la partie N-terminale de cette protéine rend cette dernière pro-apoptotique (Ko et al., 2003). L'hélice $\alpha 9$ permet la translocation de cette protéine pro-apoptotique à la mitochondrie et induit l'apoptose *via* l'activation des caspases sans activation préalable de Bax ou Bak (Ko et al., 2007).

C. LES PROTEINES PRO-APOPTOTIQUES A MULTIDOMAINES :

BAX ET BAK

Le sous-groupe des protéines pro-apoptotiques à multidomaines est constitué de six membres. Si les mécanismes impliquant Bcl-G (Guo et al., 2001), Bfk (Coultas et al., 2003), Bcl-rambo (Kataoka et al., 2001) et Bok (Hsu et al., 1997) dans l'induction de l'apoptose sont encore mal connus, les mécanismes impliquant Bax (« Bcl-2-associated X protein ») et Bak (« Bcl-2 antagonist/killer 1 ») sont mieux caractérisés. De nombreuses études ont notamment démontrées que Bax et Bak sont indispensables à l'induction de l'apoptose (Wei et al., 2001).

1. Structure

Le gène de Bax, localisé sur le chromosome 19 en 19q13 code pour une protéine de 21kDa composée de 192 acides aminés. Bax possède les domaines BH1, BH2, BH3 et TM. Sa

structure tridimensionnelle est constituée de neuf hélices α , de trois feuillets β et d'un coude lui conférant une structure globulaire proche de celle des membres anti-apoptotiques (Suzuki et al., 2000).

Bak, quant à elle, est une protéine de 211 acides aminés pour une masse moléculaire de 23kDa. Elle possède les domaines BH1, BH2, BH3 et TM ce qui lui confère une structure tridimensionnelle globulaire formée par neuf hélices α et un coude. Le gène codant pour cette protéine est localisé en 6q21.

2. Activation de Bax et Bak

Dans la cellule saine, Bax est présente dans le cytoplasme liée à des protéines chaperonnes telles que Ku70 ou 14-3-3 qui la maintiennent sous forme inactive. En condition de stress apoptotique, Bax est libérée du fait de l'acétylation de Ku70 et de la phosphorylation de 14-3-3 (Cohen et al., 2004) (Tsuruta et al., 2004). La libération de Bax de ces protéines inhibitrices, bien que fondamentale ne suffit pas à son activation. En effet, la transduction du signal apoptotique par les membres de la famille de Bcl-2 est nécessaire à l'activation de Bax.

Bak, quant à elle, est localisée à la membrane externe mitochondriale où elle est maintenue sous forme inactive *via* une interaction avec VDAC2 (Cheng et al., 2003) ou des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-xL ou Mcl-1 (Danial, 2007). C'est la rupture de ces complexes, par les membres à domaine « BH3 seul », qui induit sa libération et son activation.

L'activation de Bax et Bak induit un changement de conformation exposant leurs hélices α_1 , α_5 , α_6 et α_9 . L'exposition des hélices α_1 et α_9 est essentielle pour la translocation de ces protéines à la mitochondrie et la formation d'homo-oligomères (Figure 25) (Wei et al., 2001) tandis que les hélices α_5 et α_6 permettent la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale (Lalier et al., 2007).

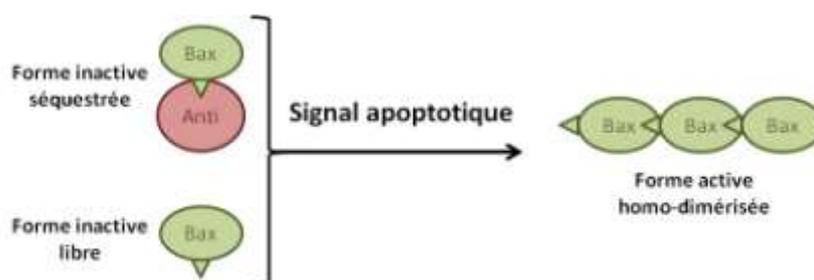


Figure 25 : Activation et homo-dimérisation de Bax et Bak

3. Perméabilisation mitochondriale

L'activation de Bax et Bak perméabilise la membrane externe mitochondriale et conduit à la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogéniques (cytochrome c,...) présentes initialement dans l'EIM. Bien que le mécanisme exact par lequel ces protéines sont libérées ne soit pas clairement défini, plusieurs hypothèses existent néanmoins. Ainsi, la libération de ces protéines peut se faire par :

- la régulation des canaux protéiques mitochondriaux existant tels que les VDAC (« canaux anioniques voltage dépendants ») par les membres de la famille de Bcl-2 (Shimizu et al., 1999).
- la formation de canaux protéiques constitués d'oligomères de Bax et/ou Bak (Dewson et Kluck, 2009).
- la création de canaux de type MAC (« mitochondrial apoptosis-induced channel »), constitués en partie par Bax (Kinnally et Antonsson, 2007).
- la formation de pores protéolipidiques (García-Sáez et al., 2010).

D. LES PROTEINES PROAPOPTOTIQUES A DOMAINE « BH3 SEUL »

Le dernier sous-groupe des membres de la famille de Bcl-2 est composé de protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique qui est composé, chez l'Homme, de onze membres: Bnip1 (Boyd et al., 1994), Bad (Yang et al., 1995), Bik (Boyd et al., 1995), Bid (Wang et al., 1996), Hrk (Inohara et al., 1997), Bim (Hsu et al., 1998), Beclin (Liang et al., 1998), Noxa (Oda et al., 2000), Puma (Nakano et Vousden, 2001), Bmf (Puthalakath et al., 2001) et Mule (Warr et al., 2005).

Dans ce chapitre, du fait de mes travaux de recherche, je ne détaillerai que certains membres de ce sous groupe en mettant un accent tout particulier sur la protéine Bik.

1. Structure des protéines à domaine « BH3 seul »

Tous ces membres possèdent un domaine d'homologie avec Bcl-2 unique, le domaine BH3. Le domaine TM n'est pas présent dans la structure de tous les membres de ce sous-groupe. En effet, seuls Bim, Bik et Hrk possèdent ce domaine TM (Gross et al., 1999a).

Il a été rapporté que les protéines Bad, Bim et Bmf ne sont pas structurées intrinsèquement et que leur domaine BH3 forme une hélice α consécutivement au contact avec la poche hydrophobe d'un membre anti-apoptotique, suggérant que ces protéine nécessitent une activation pour être pro-apoptotiques (Hinds et al., 2006). Toutefois, très peu de données structurales des protéines à domaine « BH3 seul » sont disponibles actuellement. En effet, jusqu'à aujourd'hui, seule la structure tridimensionnelle de Bid a été réalisée par RMN (McDonnell et al., 1999).

2. Fonction des protéines à domaine « BH3 seul »

Les protéines à domaine « BH3 seul » peuvent être divisées en deux groupes en fonction de leur capacité ou incapacité à activer directement les protéines pro-apoptotiques à multidomaines. En effet, les protéines à domaine « BH3 seul » dites activatrices ont la capacité d'activer ces membres par interaction directe. *A contrario*, les protéines dites sensibilisatrices n'ont pas cette propriété. Ces dernières peuvent néanmoins participer à l'activation des membres pro-apoptotiques à multidomaines au travers de la séquestration des membres anti-apoptotiques. Ainsi, Bim, Bid et Puma sont des protéines activatrices tandis que Bad, Noxa et Bik sont, quant à elles, des protéines sensibilisatrices.

3. Bik/Nbk : une protéine sensibilisatrice

Bik (« Bcl-2 interacting killer »), encore nommé Nbk (« Natural born killer »), est le troisième membre de la famille de Bcl-2 à domaine « BH3 seul » à avoir été découvert (Boyd et al., 1995). Elle est, cependant, considérée comme le membre fondateur des protéines à domaine « BH3 seul » car c'est grâce à elle que le lien entre le domaine BH3 et la fonction pro-apoptotique a été fait.

A. Structure

Le gène de Bik est localisé en 22q13 et est composé de cinq exons codant pour une protéine de 20kDa composée de 160 acides aminés. Cette protéine a un domaine TM en C-terminal et un domaine BH3 en position 57-71. Son domaine TM lui confère sa localisation membranaire, au RE (Germain et al., 2002) et à la mitochondrie (Han et al., 1996), et son domaine BH3 son activité pro-apoptotique (Chittenden et al., 1995). La prédiction de la structure secondaire de Bik montre que cette protéine serait constituée de six hélices α , avec un domaine BH3 exposé à la surface de la protéine (Figure 26) (McDonnell et al., 1999). De plus, l'analyse de l'hydrophobicité et de la charge moyenne de Bik montre que Bik aurait une structure bien définie contrairement aux autres membres « BH3 seul » (exception faite de Bid) (Hinds et al., 2006).

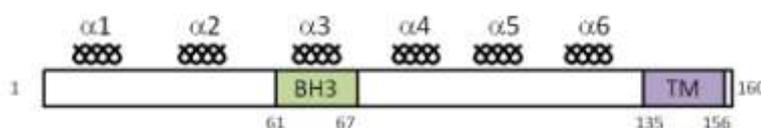


Figure 26 : Structure de Bik

B. Fonctions biologiques

1. ROLE DANS L'APOPTOSE

De part la présence de son domaine BH3 constitutivement exposé, Bik joue son rôle pro-apoptotique sans nécessiter d'activation préalable (McDonnell et al., 1999). Cette protéine est dite « sensibilisatrice » car elle induit l'activation des membres pro-apoptotiques à multidomaines de façon indirecte. En effet, Bik interagit avec les membres anti-apoptotiques ce qui conduit à la libération et à l'activation des protéines « Bax like ».

Ainsi, il a été montré que Bik peut interagir avec Bcl-2, Bcl-xL, ainsi qu'avec les protéines anti-apoptotiques virales telles que l'E1B-19kDa de l'adénovirus et BHRF1 (« BamHI fragment H rightward open reading frame 1 ») de l'EBV (« Epstein Barr virus »), permettant la libération de Bax des poches hydrophobes de ces membres anti-apoptotiques. En effet, plusieurs études ont mis en avant que la mort induite par Bik est dépendante de Bax (et non de Bak) (Gillissen et al., 2003) (Theodorakis et al., 2002). Bien que Bik ne semble pas interagir avec Mcl-1, il a cependant été montré que Bik permettrait la libération des molécules de Bax des complexes Mcl-1/Bax *via*

un mécanisme encore méconnu qui nécessiterait une coopération entre Bik et Noxa (Willis et Adams, 2005).

Le mécanisme par lequel Bik induit l'apoptose a principalement été étudié dans les cellules cancéreuses épithéliales. Ces différentes études ont démontré que Bik, bien que principalement localisée au RE, induit une mort apoptotique par la voie mitochondriale caractérisée par la libération du cytochrome c de l'EIM et l'activation de la caspase 9 (Germain et al., 2002) (Gillissen et al., 2003) (Tong et al., 2001). En effet, Bik induit la libération du Ca^{2+} réticulaire et recrute la protéine DRP1 (« dynamin related protein 1 »). Cette protéine, impliquée dans le phénomène de fission mitochondriale, transloque du cytoplasme à la mitochondrie où elle va modifier la membrane mitochondriale interne (Germain et al., 2005).

Enfin, Bik est retrouvée impliquée dans la mort induite par des toxines, des cytokines, lors d'infections virales mais également dans la sélection normale des cellules B chez l'Homme.

2. ROLE DANS L'AUTOPHAGIE

Il a été rapporté que Bik peut induire la mort cellulaire par une autre voie que la voie apoptotique. Cette mort cellulaire est indépendante de l'activation des caspases 6, 7 et 9 ainsi que de la libération du cytochrome c (Naumann et al., 2003) (Oppermann et al., 2005). Dans ces études, la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-xL n'affecte que partiellement la mort induite par Bik suggérant que, dans ces modèles cellulaires (gliome et mélanome), Bik agit indépendamment de Bcl-2 et de Bcl-xL. Une étude de 2008 a permis de mettre en évidence, dans ces conditions, la présence de certains signes autophagiques tels que la présence de vacuoles cytoplasmiques, la distribution ponctuelle de LC3 ainsi que l'expression de Beclin-1 (Rashmi et al., 2008). Cependant, le mécanisme par lequel Bik induit l'autophagie n'est pas encore connu.

C. synthèse et dégradation

1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

L'étude du promoteur du gène de Bik, par Verma et ses collaborateurs, a mis en évidence les sites de liaison de plusieurs facteurs de transcription tels que GATA-1, Oct-1, Sp-1 ou NF κ B (Verma et al., 2000).

Trois autres facteurs de transcription du gène de Bik ont également été identifiés. En effet, Stat1, activé par l' $\text{INF}\gamma$, augmente l'expression de Bik dans les cellules épithéliales. Bien que le promoteur de Bik contienne plusieurs sites de liaison de Stat1, il semblerait qu'une coopération avec d'autres facteurs de transcription soit cependant nécessaire (Mebratu et al., 2008). Le $\text{TGF}\beta$ induit également l'expression de Bik *via* le recrutement du facteur de transcription Smad dont le site de liaison est présent sur le promoteur du gène de Bik (Spender et al., 2009). De plus, lors d'un stress génotoxique ou d'une infection virale, l'expression de Bik est augmentée par le facteur de transcription E2F. L'analyse du promoteur montre que Bik est une cible transcriptionnelle directe de E2F (Subramanian et al., 2007). Enfin, plusieurs études ont montré que Bik est une cible transcriptionnelle de p53 (Mathai et al., 2005). De façon surprenante, une autre étude montre que p53 pourrait induire l'expression de Bik indépendamment de sa liaison au promoteur du gène (Hur et al., 2006).

2. REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE

De part sa fonction dans l'apoptose, Bik est une protéine hautement régulée. En effet, elle est soumise à plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations ou encore des clivages qui modifient sa fonction pro-apoptotique.

a. Phosphorylation

Bik possède deux sites de phosphorylation : la thréonine 33 et la sérine 35. Une étude de 2003 met en avant que la mutation de Bik sur ces deux sites de phosphorylation par un acide aspartique (mimant ainsi la phosphorylation de Bik) induit une augmentation d'affinité de Bik avec ses partenaires anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) et potentialise son activité pro-apoptotique dans plusieurs type de cellules cancéreuses (Li et al., 2003).

De plus, la mutation de ces sites par une alanine réduit l'activité pro-apoptotique de Bik sans pour autant affecter de façon significative son hétérodimérisation avec Bcl-2, suggérant que la phosphorylation de Bik est nécessaire à son activité pro-apoptotique (Verma et al., 2001). Dans cette étude, Verma et ses collaborateurs ont identifié CKII (« casein kinase II ») comme étant la kinase responsable de ces phosphorylations.

b. Clivage

Plusieurs études ont montré que Bik peut être clivée par différentes protéases. C'est le cas de la sérine protéase RHBDD1 et des caspases.

RHBDD1 est une sérine protéase capable de réguler l'expression de Bik. En effet, RHBDD1 clive Bik au niveau d'un motif GG présent dans sa partie c-terminale. Ce clivage libère un fragment exempt de domaine TM. Ce fragment cytoplasmique contenant le domaine fonctionnel pro-apoptotiques BH3 de Bik est ensuite rapidement dégradé par le protéasome, suggérant que ce clivage soit l'événement précoce induisant la dégradation de Bik par le protéasome (Wang et al., 2008).

Enfin, une étude a mis en évidence une séquence similaire au site de reconnaissance et de clivage par les caspases 3, 7 et 9 dans le domaine c-terminal (122-130) de Bik (Elangovan et Chinnadurai, 1997). Bien que cette séquence soit conservée chez l'Homme et la souris, son rôle dans la fonction de Bik n'est pas encore connu.

4. DEGRADATION PAR LE PROTEASOME

La dégradation de Bik par le protéasome a été montrée de façon indirecte *via* l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome. De tels inhibiteurs induisent la surexpression de Bik en bloquant sa dégradation. Plusieurs études ont en effet démontré que le Bortezomib ou le MG132 induisent une surexpression de Bik permettant de sensibiliser les cellules à la mort induite par TRAIL (Zhu et al., 2005a) (Nikrad et al., 2005) ou par le cisplatine (Li et al., 2008). Il est à noter que la surexpression de Bik (bortezomib ou lactacystin) suffit à elle seule à induire la mort des cellules de cancer du colon, du poumon, de l'ovaire ainsi que certaines lignées de cellules lymphocytaires (Marshansky et al., 2001) (Zhu et al., 2005b).

D. Localisation tissulaire

L'analyse par northern blot du profil d'expression de l'ARNm de Bik dans les tissus montre que Bik est exprimée de façon ubiquitaire avec cependant une prépondérance dans les cellules épithéliales, cardiaques, rénales, pancréatiques et les cellules du muscle squelettique (Verma et al., 2000) (Daniel et al., 1999). De plus, il a été décrit que, lors de la différenciation des cellules B, l'expression de Bik augmente au cours de la transition entre les cellules B naïves et les cellules B mémoires, (Klein et al., 2003b).

4. Les autres protéines à domaine « BH3 seul »

A. Bim

Le gène de Bim code pour 3 isoformes, Bim_{EL} (23kDa), Bim_L (19kDa) et Bim_S (15kDa), qui possèdent tous un domaine BH3 et un domaine TM mais qui diffèrent par leur partie N-terminale (O'Connor et al., 1998). Bim_S a un pouvoir pro-apoptotique plus puissant que Bim_L, elle-même plus puissante que Bim_{EL} et cela est probablement lié au fait que ces deux dernières sont séquestrées par DLC1 (« dynein light chain ») au niveau des microtubules. En effet, lors d'un stress apoptotique, Bim_L transloque directement à la mitochondrie tandis que Bim_{EL} et Bim_L devront d'abord être libérées de DLC1 par JNK (Lei et Davis, 2003).

Bim joue son rôle pro-apoptotique en se liant et inhibant toutes les protéines anti-apoptotiques. Elle est également à même d'activer directement les protéines pro-apoptotiques à multidomaines ce qui la définit comme une protéine à domaine « BH3 seul » activatrice.

Son expression est régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Ainsi, une privation en facteur de croissance induit l'expression de Bim par la voie JNK ou PKB/Akt (Putchu et al., 2001) (Dijkers et al., 2000). Au niveau post-traductionnel, son expression est régulée du fait de sa localisation *via* DLC1 mais également par sa phosphorylation. En effet, la phosphorylation de Bim sur la sérine 69 par ERK1/2 induit sa dégradation par le protéasome (Ley et al., 2003).

Cette protéine est exprimée dans les cellules hématopoïétiques, épithéliales, neuronales et dans les cellules des centres germinatifs. Bim est impliquée dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. En effet, cette protéine est fortement exprimée dans les cellules qui se renouvellent rapidement, comme les lymphocytes T corticaux (CD4+8+), les lymphocytes B du centre germinatif et les cellules plasmocytaires (Yokoyama et al., 2002) (O'Reilly et al., 2000).

En plus de son rôle dans l'apoptose, Bim joue un rôle important au niveau de la différenciation des lymphocytes. Ainsi, il a été montré que Bim joue un rôle *sine qua non* dans la sélection négative des lymphocytes B et T auto-réactifs (Bouillet et al., 2002) (Enders et al., 2003).

B. Bid

Bid, quant à elle, est une protéine de 22kDa qui interagit avec Bcl-2 et Bax (Wang et al., 1996). Cette protéine cytoplasmique a une structure tridimensionnelle proche de celle de Bcl-xL (Chou et al., 1999). Bid joue un rôle dans l'apoptose en permettant un lien entre la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. En effet, la caspase 8 activée par la voie extrinsèque clive Bid au niveau de l'acide aspartique 59. La partie c-terminale tronquée, nommée tBid, transloque à la membrane mitochondriale où elle active Bax et inhibe Bcl-2 pour permettre la formation de pores et la libération du cytochrome c (Gross et al., 1999b). De plus, il a été décrit que tBid peut former des canaux ioniques *in vitro* suggérant que la perméabilisation mitochondriale puisse être induite par la seule présence de tBid (Schendel et al., 1999).

C. Noxa

Noxa est la plus petite des protéines membres de la famille de Bcl-2 connues à ce jour. Cette protéine de 10kDa est constituée d'un domaine BH3 unique qui lui confère son activité pro-apoptotique.

Noxa ne peut se lier aux protéines pro-apoptotiques Bax ou Bak ; c'est pourquoi, elle exerce son activité pro-apoptotique uniquement en interagissant et inhibant les membres anti-apoptotiques Mcl-1 et A1. Une étude de Chen et de ses collaborateurs a montré que Noxa interagissait avec une forte affinité à Mcl-1 et une faible affinité à A1, ce qui rend cette protéine plus spécifique de Mcl-1 (Chen et al., 2005). Il est à noter que la liaison de Noxa à Mcl-1 induit la dégradation de cette dernière par le protéasome (Ploner et al., 2008).

Son expression peut être induite par différents signaux mitotiques ou apoptotiques dépendants ou non de p53. En effet, l'étoposide, l'actinomycine D et des rayonnements UV induisent l'expression de Noxa par l'activation de p53. De plus, il a été montré que l'expression de Noxa peut être induite par HIF1 α lors d'un stress hypoxique (Kim et al., 2004). Enfin, il est également été décrit que le Bortézomib, un inhibiteur du protéasome, induit l'augmentation de Noxa tant au niveau transcriptionnel que traductionnel dans différents types cellulaires (Gomez-Bougie et al., 2007).

D. Puma

Puma (« p53 upregulated modulator of apoptosis ») est une protéine à domaine « BH3 seul » possédant un domaine TM en C-terminal lui conférant une localisation mitochondriale. La régulation de l'expression de Puma est transcriptionnelle et se fait de façon dépendante ou non de p53. En effet, un stress génotoxique induit l'expression de Puma *via* p53 tandis que la privation en facteur de croissance/cytokine ou un stress réticulaire induisent l'expression de Puma indépendamment de p53 (Ming et al., 2008) (Nickson et al., 2007). Puma ne peut interagir avec Bax ou Bak ; cependant, son interaction avec l'ensemble des membres anti-apoptotiques en fait un puissant régulateur de l'apoptose. La liaison de Puma à un membre anti-apoptotique peut (i) induire la libération d'un membre pro-apoptotique induisant la mort cellulaire (dépression) ou (ii) bloquer la poche hydrophobe de la protéine anti-apoptotique, n'induisant pas l'apoptose mais sensibilisant la cellule aux signaux de mort ultérieurs (sensibilisation) (Chipuk et Green, 2009).

E. MODELES D'INTERACTIONS ENTRE LES MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2

Les protéines membres de la famille de Bcl-2 sont les régulateurs majeurs de la perméabilisation mitochondriale. Elles représentent ainsi un point de contrôle essentiel dans le déclenchement de l'apoptose (Borner, 2003). Les protéines de la famille de Bcl-2 intègrent divers signaux de survie et de mort qui sont générés de façon intrinsèque ou extrinsèque (Strasser et al., 2000) (Adams et Cory, 2001). Ce sont les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques formées en fonction des signaux reçus qui déterminent la vie ou la mort de la cellule.

Les premières expériences d'interaction ont suggéré que le ratio entre les protéines pro-apoptotiques à multidomaines et les protéines anti-apoptotiques contrôle l'induction de l'apoptose. Ainsi, une inhibition de l'expression ou de l'activité des membres anti-apoptotiques conduit à un déséquilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques. Ces membres (Bax et Bak) ainsi activés, vont induire la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale permettant la libération des protéines apoptogéniques dans le cytoplasme et donc la mort de la cellule. A ce ratio s'ajoute les protéines à domaine « BH3 seul ». En effet ces dernières sont les

protéines qui induisent ou non ce déséquilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques. De fait, les protéines à domaine « BH3 seul » sont à même d'activer les protéines pro-apoptotiques ou d'inhiber les protéines anti-apoptotiques selon le modèle d'activation directe ou indirecte.

1. Mécanisme d'activation directe

Dans ce modèle d'activation, les protéines pro-apoptotiques à domaine « BH3 seul » sont divisées en deux groupes : les activateurs et les sensibilisateurs. Ces groupes se différencient sur la base de leurs profils d'interaction avec les protéines anti-apoptotiques et leur capacité à lier directement ou non les protéines pro-apoptotiques à multidomaines (Bax et Bak) (Certo et al., 2006) (Chen et al., 2005) (Kuwana et al., 2005).

Les protéines activatrices (Bim, Bid et Puma) ont, en effet, la capacité de lier et d'activer directement Bax et Bak. Les sensibilisatrices (telles que Bad, Noxa ou Bik), quant à elles, activent indirectement Bax et Bak *via* l'inhibition des complexes formés entre les membres anti-apoptotiques et les protéines activatrices (Figure 27) (Kuwana et al., 2005) (Letai et al., 2002).

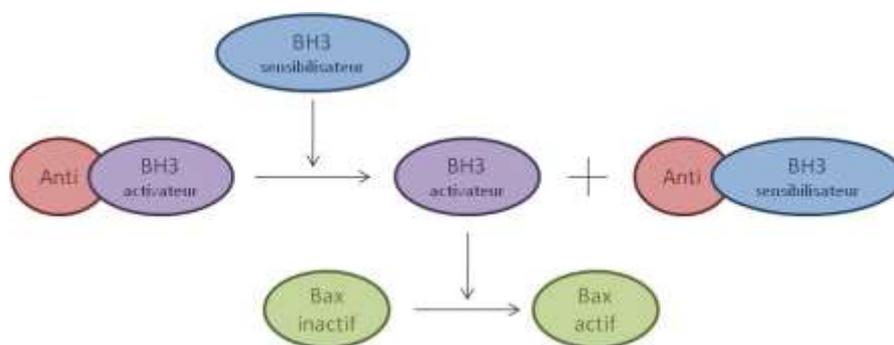


Figure 27 : Modèle d'activation directe des protéines pro-apoptotiques à multidomaines.

2. Mécanisme d'activation indirecte

Dans ce modèle, les protéines à domaine « BH3 seul » n'activent pas les protéines Bax ou Bak. En effet, les protéines à domaine « BH3 seul » neutralisent les protéines anti-apoptotiques libérant ainsi Bax et Bak (Figure 28) (Willis et al., 2007). Dans ce modèle, comme dans le précédent, les protéines à domaine « BH3 seul » sont séparées en deux groupes : les ubiquitaires et les sélectives. Les protéines « ubiquitaires » sont ainsi nommées par leur capacité à se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques, c'est le cas par exemple de Bim, Bid

et Puma. Les « sélectives » ont, quant à elle, un profil d'interaction avec les protéines anti-apoptotiques plus restreint comme Bad et Noxa (Chen et al., 2005) (Willis et Adams, 2005).

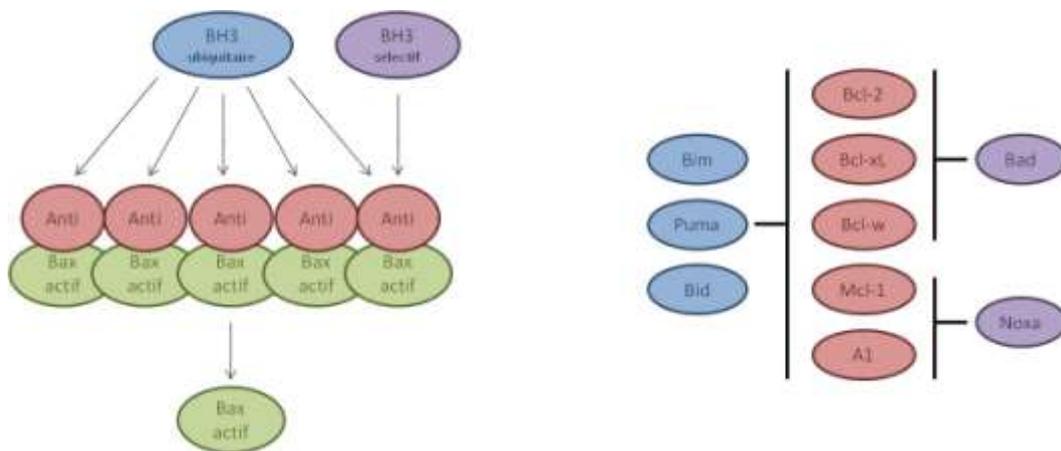


Figure 28 : Modèle d'activation indirecte des protéines pro-apoptotiques à multidomaines

3. Mécanisme d'activation « combiné »

Ces deux modèles s'appliquent à des situations distinctes et il est très probable que ces deux modèles cohabitent pour réguler l'activation de Bax et/ou Bak et le déclenchement de l'apoptose. En effet, l'équipe qui a décrit le modèle indirect a dernièrement proposé que le déclenchement de l'apoptose nécessite les deux mécanismes (Mérino et al., 2009).

Ainsi, un nouveau modèle d'activation, tenant compte des deux mécanismes indépendants précédemment décrits a été pensé. Les protéines à domaine « BH3 seul » sont divisées en activateurs ou sensibilisateurs sans pour autant oublier les différentes affinités qu'elles peuvent avoir avec les membres anti-apoptotiques (Figure 29) (Leber et al., 2010).

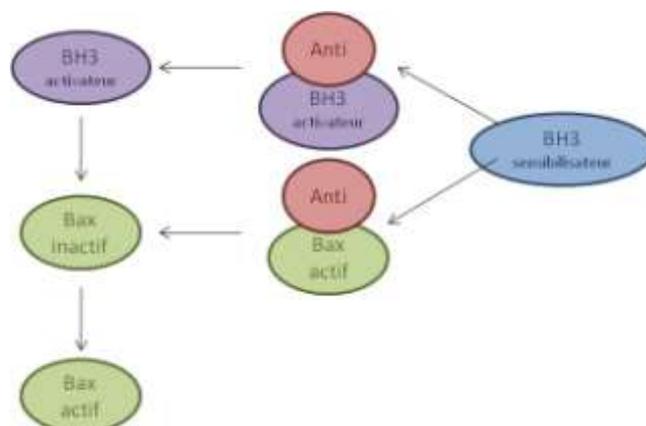


Figure 29 : Modèle d'activation « combiné » de Bax et Bak

THERAPIES CIBLEES PAR LES INHIBITEURS DE BCL-2 :

L'ABT-737

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un défaut d'apoptose induit principalement pour la surexpression de membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2. Cette « immortalité » contribue à la progression de la maladie et confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par la radiothérapie ou par les agents chimio-thérapeutiques (Reed et al., 1996). Ainsi, l'inhibition de la fonction des membres anti-apoptotiques représente une stratégie prometteuse pour l'élaboration d'une nouvelle classe d'agents anticancéreux.

A. LES INHIBITEURS DE BCL-2

Plusieurs approches permettant de cibler et d'inhiber Bcl-2 ont été testées. Ainsi, les premières permettaient de diminuer le niveau d'expression de Bcl-2 par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens et d'inhiber son activité par le développement d'anticorps bloquant de Bcl-2. C'est le succès de petits peptides, mimétiques du domaine BH3 de Bax, à induire l'apoptose des cellules *in vitro* et à réduire la croissance tumorales de cellules myéloïdes humaines dans un modèle de souris immunodéprimés (Wang et al., 2000) qui a poussé les recherches vers le développement des SMI (« small-molecule inhibitors »).

Ces petites molécules (non peptidiques) interagissent avec la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques et peuvent ainsi bloquer l'hétéro-dimérisation de Bcl-2 avec les membres pro-apoptotiques. Les SMI sont donc des molécules mimétiques des domaines BH3 des membres pro-apoptotiques. Leur petite taille (<750Da) ainsi que leur capacité à traverser les membranes plasmiques rend leur utilisation *in vivo* plus pratique et plus rentable comparée aux oligonucléotides et autres peptides.

B. L'ABT-737 : UN INHIBITEUR SPECIFIQUE

Parmi l'ensemble des SMI développées pour inhiber Bcl-2, seule l'ABT-737 est spécifique de cette activité. En effet, une étude portant sur la spécificité d'action de six SMI a montré que

seule l'apoptose induite par l'ABT-737 est complètement inhibée dans les cellules déficientes en Bax et Bak ou en caspase 9 (Vogler et al., 2009). D'autres études ont montré, quant à elles, que le Gossypol (BL-193) induit également des dommages à l'ADN (Zaidi et Hadi, 1992) et que l'obatoclast (GX015-070) augmente l'expression de Bim (Trudel et al., 2007).

1. Construction

L'ABT-737 a été produite au travers d'une collaboration entre les laboratoires IDUN et les laboratoires Abbott (Oltersdorf et al., 2005). L'ABT-737 a été développée par une stratégie nommée « SAR by RMN » qui utilise des techniques de conception basées sur la structure protéique, la synthèse chimique et la sélection par la RMN (« nuclear magnetic resonance »). Afin de cibler spécifiquement la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques, deux molécules de faible affinité ont été produites et optimisées puis ont été reliées l'une à l'autre pour former une molécule de haute affinité (Figure 30) (Shuker et al., 1996).

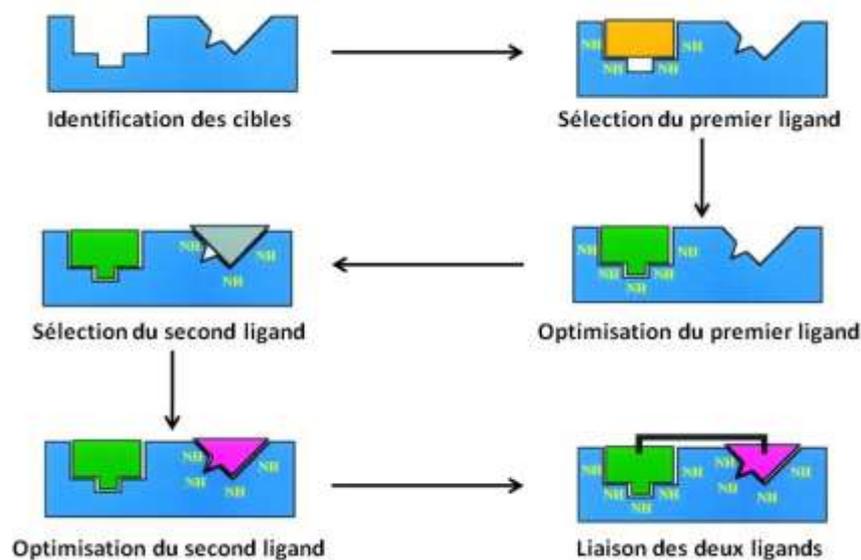


Figure 30 : Les grandes lignes de la stratégie « SAR by RMN »

(d'après Shuker et al. 1996)

anti-apoptotiques surexprimés, à des doses thérapeutiques, favorisant l'aboutissement des signaux de mort. L'activation constitutive de ces signaux de mort dans les cellules cancéreuses rend celles-ci plus sensibles à l'apoptose que les cellules saines, définissant ainsi la spécificité de l'ABT-737 vis-à-vis des cellules cancéreuses.

1. En agent simple

L'effet de l'ABT-737, en agent simple, sur certaines cellules cancéreuses est maintenant prouvé. Dès sa découverte, son effet cytotoxique sur des lignées cellulaires de lymphome folliculaire a été montré, mais aussi sur des cellules primaires issues de prélèvements de patients atteints de LLC ou de lymphome folliculaire (Oltersdorf et al., 2005).

Son action sur des tumeurs solides a également été étudiée dans ce premier article. En effet, la plupart des lignées de carcinome du poumon à petites cellules testées sont sensibles à l'ABT-737 avec des doses inférieures à 1 μ M. De plus, l'ABT-737 montre une bonne activité en agent simple dans deux modèles de xénogreffe de cancer du poumon à petites cellules (Oltersdorf et al., 2005).

Depuis, son effet en agent simple a également été montré dans de nombreuses autres pathologies telles que les maladies auto-immunes (Bardwell et al., 2009), la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (High et al., 2010) ou encore sur les mastocytes (Karlberg et al., 2010).

2. En co-traitement

Il a également été décrit que l'ABT-737 augmente nettement la réponse *in vitro* des cellules cancéreuses aux radiations et à de nombreux agents chimiothérapeutiques tels que la rapamycine, la dexaméthasone, la doxorubicine, le cisplatine ou le paclitaxel.

D'autres agents agissent en synergie avec l'ABT-737 *via* une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Noxa, Puma ou encore Bim. C'est le cas, par exemple, de l'étoposide dans le carcinome rénal (Zall et al., 2010), de la vincristine dans la LAL (High et al., 2010), de l'imiquimod, du fotémustine ou de la decarbazine dans le mélanome (Weber et al., 2009) ou encore des inhibiteurs des HDAC (histone déacétylases) dans des cellules de myélome et de lymphome (Chen et al., 2009).

Conscients de la faible affinité de l'ABT-737 à Mcl-1, plusieurs articles ont mis en évidence qu'un fort niveau d'expression basal de Mcl-1 est associé avec une résistance à l'ABT-

737 (Konopleva et al., 2006) (van Delft et al., 2006) (Del Gaizo Moore et al., 2007) (Lin et al., 2007). Par exemple, la combinaison de l'ABT-737 avec du flavopiridol, du trioxyde d'arsenic, du sorafenib, de l'actinomycine D ou du fenretinide ont montré une synergie dans différents modèles cancéreux *via* l'inactivation ou la diminution de l'expression de Mcl-1 par le second agent (Kang et al., 2008) (Oltersdorf et al., 2005) (Olberding et al., 2010) (Hikita et al., 2010).

3. l'ABT-263 en clinique

L'ABT-263 (Navitoclax) est une forme orale de l'ABT-737 qui possède les mêmes propriétés biologiques. L'ABT-263 est actif en agent simple dans le cas de xénogreffes dans le cancer du poumon à petites cellules et il induit l'activité d'autres agents chimiothérapeutiques dans les études précliniques de lymphomes à cellules B et de myélome multiple (Tse et al., 2008). Bien qu'une thrombopénie transitoire dose dépendante ait été observée, l'ABT-263 n'est pas myélosuppressive (Roberts et al., 2008). Il est à noter que l'ABT-263 a été rapportée comme se liant à l'albumine sanguine, ce qui diminuerait son action vis-à-vis des LLC nécessitant l'augmentation des doses administrées pour avoir l'effet escompté (Vogler et al., 2010)

Cette molécule a montré une activité en agent simple contre les maladies lymphoïdes avec peu de toxicité systémique (Wilson et al., 2008). L'ABT-263 est en essai clinique principalement chez les patients atteints de LLC et cancer du poumon à petites cellules ou encore chez les patients atteints de tumeurs solides en co-traitement avec de la Gemcitabine.

LE MYELOME MULTIPLE

A. GENERALITES

Le myélome multiple (MM) est une lymphopathie B maligne caractérisée par une prolifération plasmocytaire monoclonale envahissant la moelle osseuse. Ces plasmocytes tumoraux sécrètent des Immunoglobulines (Ig) monoclonales le plus souvent de type IgG (68%) ou IgA (21,5%). Le MM se caractérise par des lésions ostéolytiques avec parfois une hypercalcémie, une insuffisance médullaire (anémie) et rénale ainsi qu'une susceptibilité aux infections bactériennes, fongiques et virales.

L'âge moyen au diagnostic est de 66 ans, il s'observe rarement avant 40 ans (2%). En France, son incidence est de 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. Cette pathologie représente 1-2% de l'ensemble des cancers et 10-12% des hémopathies malignes (Rajkumar et Kyle, 2005). Le MM atteint deux fois plus la population noire que la population caucasienne (Sirohi et Powles, 2004). L'incidence augmente avec l'âge et les hommes sont plus touchés que les femmes avec un rapport de 3/2 (Bataille et Harousseau, 1997).

Il est maintenant reconnu que tous les MM sont précédés d'une phase pré-tumorale connue sous le nom de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS). Le MGUS est fréquent dans la population de plus de 50 ans, sa prévalence augmente avec l'âge et dépasse 5% chez les sujets de plus de 70 ans. La présence d'un MGUS augmente le risque de développer un MM (65% des cas), une macroglobulinémie de Waldenström ou autres maladies lymphoprolifératives ou hématologiques. Le risque d'évolution d'un MGUS en MM est de 1% par an (Kyle et al., 2010).

Le MM est décrit comme étant peu proliférant. En effet, son index de prolifération est de 1,8% dans le stade MGUS et dans le MM précoce, il atteint 2,5% au diagnostic et est maintenu durant l'évolution de la maladie (Scudla et al., 2005).

B. LA BIOLOGIE DU MM

Le MM est caractérisé par une prolifération plasmocytaire monoclonale. Les cellules plasmocytaires saines sont issues de cellules progénitrices. Pour arriver à la formation de plasmocytes, ces cellules vont subir deux grandes étapes de différenciation et de maturation dépendantes ou non des antigènes (Ag). Il est nécessaire de comprendre les événements de la différenciation plasmocytaire afin de comprendre l'origine de la cellule myélomateuse, les étapes de l'oncogenèse ainsi que les différentes anomalies chromosomiques courantes.

1. Différenciation et maturation plasmocytaire

A. Différenciation indépendante des antigènes

Cette première différenciation est constituée d'une succession d'événements qui ont lieu dans la moelle osseuse (MO) et aboutissent à la formation de cellules B matures naïves à partir des cellules pro-B.

Un réarrangement fonctionnel dans les gènes du locus de la chaîne lourde des Ig (recombinaison VDJ) permet la synthèse d'une chaîne lourde d'isotype μ pour former le récepteur pré-B qui est exprimé à la surface de la membrane cytoplasmique. Si ce récepteur reconnaît le « soi », la cellule prolifère en générant de nombreuses cellules pré-B identiques et cesse d'exprimer ce récepteur. C'est alors qu'un réarrangement sur les gènes du locus de la chaîne légère (le locus κ , puis λ) a lieu. Ce second réarrangement se doit d'être fonctionnel pour qu'une molécule d'IgM complète formant un BCR (récepteur des cellules B) soit exprimée à la surface des cellules B immatures. La reconnaissance d'un Ag est désormais possible. Les cellules réactives au soi sont éliminées, les autres quittent la MO et entrent dans la circulation périphérique pour poursuivre leur différenciation.

Les cellules B matures naïves circulent dans les différents organes lymphoïdes secondaires à la rencontre des Ag spécifiques afin de passer à la deuxième étape de différenciation (Figure 32).

B. Différenciation dépendante des antigènes

La seconde étape de différenciation aboutit à la formation de cellules effectrices (lymphocyte B (LB) mémoires et plasmocytes). Elle a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires périphériques et nécessite la présence d'un Ag et d'un lymphocyte T.

Les cellules B naïves vont exprimer à leur surface le CD40 consécutivement à la reconnaissance d'un Ag par leur BCR. Le lymphocyte T qui reconnaît le même Ag va interagir avec le LB naïf *via* son CD40L membranaire. C'est ce double signal (Ag et lymphocyte T) qui permet la différenciation en LB effecteur.

La cellule B entre en division, une partie des cellules B produites devient rapidement des plasmocytes de faible affinité tandis que la majorité des cellules B va constituer le centre germinatif des follicules lymphoïdes. Au sein des centres germinatifs, les LB vont subir une commutation isotypique de la chaîne lourde de l'Ig ainsi que des hypermutations somatiques dans le but d'améliorer l'affinité à l'Ag. Les cellules dont le BCR présente une maturation d'affinité de liaison pour l'Ag sont sélectionnées et poursuivent leur différenciation soit en plasmocytes de forte affinité, soit en cellules B mémoires (Figure 32).

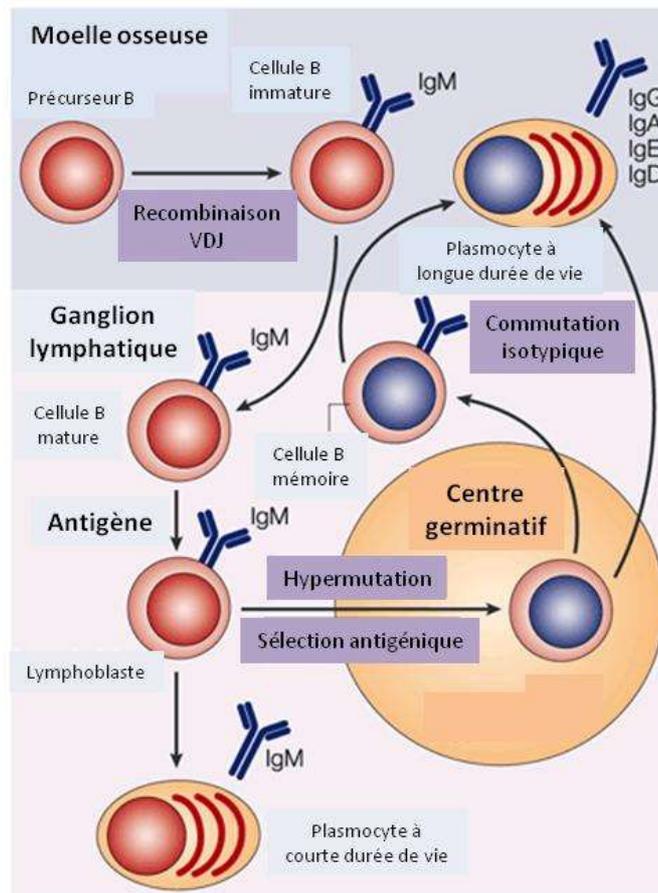


Figure 32 : Développement et différenciation des lymphocytes B

(D'après Kuehl & Bergsagel 2002)

2. L'origine de la cellule myélomateuse

La nature exacte de la cellule myélomateuse n'a pas encore été clairement établie. Cependant, l'analyse des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères a montré que le clone malin est caractérisé par un réarrangement VDJ identique sans évolution au cours de la maladie. Ces cellules ont donc subi les phénomènes d'hypermutation somatique dans les régions variables des Ig, de sélection antigénique et de commutation isotypique (Bakkus et al., 1992). On peut ainsi définir la cellule myélomateuse comme un plasmablaste post-germinatif.

De plus, la tumeur semble être composée de deux populations distinctes. La première serait constituée de cellules moins différenciées qui conserveraient leur propriété proliférative à la base du renouvellement cellulaire de la tumeur. La seconde serait constituée de plasmocytes malins différenciés dont l'accumulation serait à l'origine de la masse tumorale.

Cette dérégulation de l'homéostasie cellulaire est liée à une dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Witzig et al., 1999).

3. L'oncogénèse du MM un processus en deux étapes

Les cellules B possèdent une instabilité génétique inhérente. En effet, de nombreuses cassures de l'ADN sont nécessaires lors de la différenciation et maturation plasmocytaires. De par leur instabilité génique, les cellules B peuvent aisément acquérir des mutations et ainsi évoluer vers un MGUS puis en MM.

A. Évolution en MGUS

La première étape de l'oncogénèse du MM est l'établissement d'un MGUS qui est caractérisé par la présence d'un pic monoclonal isolé sans autre anomalie clinique et biologique (Kyle et Kumar, 2009). Il reflète la présence d'anomalies géniques qui précèdent tous les cas de MM. De plus, les MGUS surexpriment le récepteur alpha de l'IL-6 (CD126) ce qui leur confère un avantage prolifératif vis-à-vis des cellules saines (Rajkumar, 2009).

Environ 50% des MGUS présentent une hyperdiploïdie, d'autres ont des translocations impliquant les gènes codants pour la chaîne lourde des Ig sur le chromosome 14q32. Les gènes et *loci* les plus couramment dérégulés sont présentés en figure 33.

Translocations chromosomiques	Gènes dérégulés
t(11 ;14)	Cycline D1
t(4 ;14)	FGFR-3 et MMSET
t(6 ;14)	Cycline D3
t(14 ;16)	C-maf
t(14 ;20)	mafB

Figure 33 : Translocations primaires retrouvées dans les cellules MGUS et MM

B. Transformation d'un MGUS en MM

Le premier stade d'évolution d'un MGUS en MM est un MM dit « asymptotique », et peut rester stable plusieurs années sans traitement. Le MM évolue ensuite vers un MM

symptomatique intramédullaire (dans la MO), puis extramédullaire (hors de la MO) envahissant le sang mais également la cavité péritonéale (ascites) ou la plèvre (épanchements pleuraux) (Kuehl et Bergsagel, 2002).

Le stade asymptomatique est caractérisé par une concentration sérique d'Ig monoclonale supérieure à 30g/L, une plasmocytose médullaire (prolifération anormale de plasmocyte dans la MO) supérieure à 10% sans complications symptomatiques. Le taux de progression en MM symptomatique est de 10% par an durant les 5 premières années (Kyle et al., 2010).

Le stade symptomatique est également caractérisé par un pic monoclonal sérique supérieur à 30g/L et une plasmocytose médullaire supérieur à 10%. Lors de ce stade, les patients souffrent de symptômes inhérents à l'envahissement de la MO par les plasmocytes malins. En effet, cet envahissement provoque une anémie ainsi qu'une diminution de la production d'Ig normales responsable d'un syndrome d'immunodéficience. Cette accumulation induit couramment des lésions ostéolytiques très douloureuses pouvant aboutir à des fractures spontanées accompagnées d'une hypercalcémie. L'augmentation du pic monoclonal sérique est, quant à elle, responsable d'atteintes rénales.

Plusieurs anomalies comme les mutations de Ras, la méthylation de p16, des anomalies impliquant les oncogènes de la famille de myc, des translocations secondaires ou encore des mutations de p53 ont été identifiées en association avec la progression vers le stade symptomatique (Figure 34).

Le microenvironnement de la MO est lui aussi modifié avec la progression de la maladie. En effet, cette progression s'accompagne d'une induction de l'angiogénèse, de la suppression de l'immunité à médiation cellulaire, de boucles paracrines impliquant des cytokines telles que l'IL-6 et le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) ainsi que d'une destruction de l'os (Rajkumar, 2009).

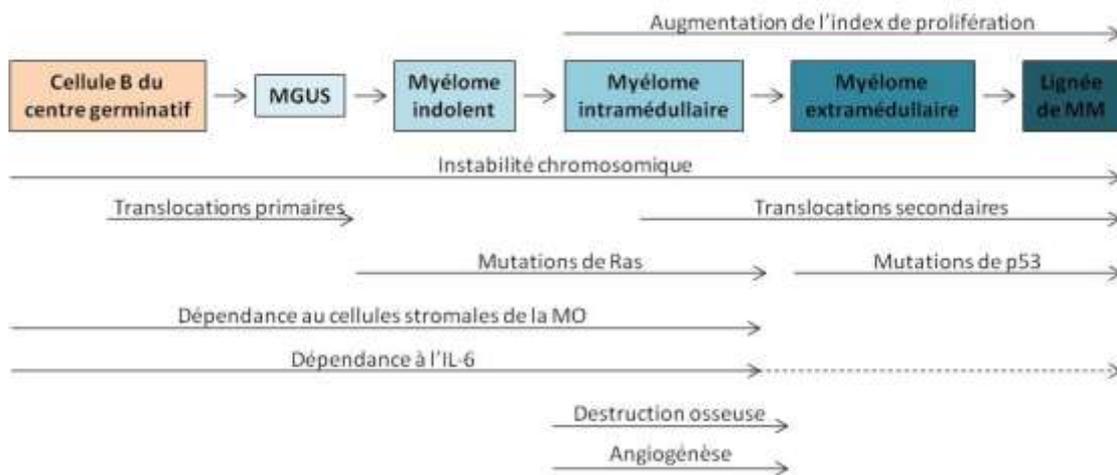


Figure 34 : Oncogénèse du MM et dépendance aux cellules stromales

(D'après Kuehl & Bergsagel 2002)

4. Classification moléculaire

Le MM rassemble plusieurs groupes qui sont différents aussi bien au niveau des événements initiateurs ou précoces que sur l'expression génique globale, la dépendance à la MO, les signes cliniques, le pronostic et la réponse à la thérapie. On peut établir le classement suivant des différents groupes de MM en fonction de leurs translocations ou hyperdiploïdie.

A. Hyperdiploïdies

Tous les MGUS ou MM présentent des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure. Près de la moitié des MM sont hyperdiploïdes (48-75 chromosomes) et possèdent de nombreuses trisomies impliquant principalement les chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, et 21 (Kuehl et Bergsagel, 2005). Les patients qui appartiennent à ce groupe ont un meilleur taux de survie aussi bien avec la chimiothérapie conventionnelle qu'avec une transplantation de cellules souches autologues précédée d'une forte dose de chimiothérapie (Smadja et al., 2001).

B. Les translocations récurrentes

Les principales translocations observées dans le MM touchent le chromosome 14 en 14q32. Ce point de cassure correspond à la région J des chaînes lourdes des Ig et il est possible qu'il soit induit par les phénomènes d'hypermutation somatique ou de recombinaison observés dans cette région.

1. T(4 ;14) : FGFR3/MMSET

La translocation entre le chromosome 14q32 et le chromosome 4p16.3 est observée dans environ 15% des MM (Avet-Loiseau et al., 1998). Cette translocation induit la dérégulation de 2 gènes qui sont situés de part et d'autre du point de cassure du chromosome 4 : *FGFR3* (récepteur 3 du facteur de croissance des fibroblastes) et *MMSET*. *MMSET* code pour une histone méthyltransférase qui a les caractéristiques d'un co-répresseur de transcription (Marango et al., 2008). La surexpression de cette protéine induit une augmentation de la prolifération cellulaire *via* une augmentation de la viabilité cellulaire et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Brito et al., 2009). *FGFR3* est un récepteur à tyrosine kinase de forte affinité pour les ligands de la famille FGF. La signalisation induite par l'activation de ce récepteur peut remplacer l'Il-6 en terme de croissance et de survie ce qui confère aux cellules un avantage prolifératif.

Une surexpression de la Cycline D2 est souvent observée lors de cette translocation, bien que le mécanisme par lequel la translocation induit une telle dérégulation de la Cycline D2 n'est pas encore identifié.

2. T(11 ;14) : CYCLINE D1

Les analyses de cytogénétiques conventionnelles ont montré que la translocation t(11 ;14) (q13 ;q32) est présente dans 15 à 20% des MM et est associée à des MM peu proliférants (Avet-Loiseau et al., 1998) (Fonseca et al., 1998). Cette translocation induit, en effet, une surexpression de la Cycline D1 qui est impliquée dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire.

Ce groupe est divisé en deux sous-groupes, CD-1 et CD-2, qui se différencient par l'absence ou la présence de CD20. Cette protéine membranaire est présente à la surface de toutes cellules B matures et joue un rôle dans le développement et la différenciation des cellules B. Les CD-1 ont récemment été décrits comme étant de plus mauvais pronostiques que le sous-groupe CD-2 avec les traitements actuels (Nair et al., 2010).

3. T(6 ;14) : CYCLINE D3

C'est en 2001 que la translocation t(6 ;14) (p21 ;q32) a été découverte. Cette translocation est associée à une augmentation d'un facteur six du niveau d'expression de la Cycline D3. Cette translocation touche 3 à 6% des cas de MM (Shaughnessy et al., 2001).

4. T(14 ;16), T(14 ;20) : C-MAF ET MAFB

Les translocations t(14 ;16) (q32 ;q23) et t(14 ;20) (q32 ;q11) sont observées dans 5 à 10% des patients atteints de MM. Ces translocations induisent respectivement la dérégulation de c-maf et mafB qui sont des facteurs de transcription. La dérégulation de c-maf ou de mafB conduit à la dérégulation de la Cycline D2 qui joue un rôle dans le cycle cellulaire en conférant ainsi un avantage prolifératif aux cellules tumorales (Bergsagel et Kuehl, 2001).

C. Autres anomalies chromosomiques

Les translocations ou hyperdiploïdies précédemment décrites sont des événements précoces déjà présents dans les stades MGUS de la maladie. D'autres anomalies chromosomiques sont souvent rencontrées telles que des délétions des chromosomes 13 et 17, des mutations de Ras ou encore un gain de chromosome 1q21.

1. DELETION DU CHROMOSOME 13

La perte d'une copie du chromosome 13 ou moins souvent, la perte de séquences en 13q14 est une des premières anomalies chromosomiques à avoir été trouvée en association avec un mauvais pronostic. Cette délétion est observée dans environ 50% des MM et dans 90% des MGUS ou MM qui ont une t(4 ;14) ou t(14 ;16) suggérant qu'il peut être un événement précoce de la pathogénicité du MM (Kuehl et Bergsagel, 2005).

2. DELETION DU CHROMOSOME 17 ET MUTATIONS DE P53

La délétion du chromosome 17 (souvent mono-allélique) est observée dans 10% des MM et 40% des lignées de MM (LMM) (Chang et al., 2004). Elle est de très mauvais pronostic avec une médiane de survie d'un an et demi (Chng et al., 2007). Son importance dans le facteur pronostique des patients est lié au fait qu'elle touche le gène codant pour p53 (17p13.1). De plus, il est à noter que les mutations de p53 dans les MM au diagnostic sont rares (5%). Cependant, la fréquence de mutation augmente avec l'évolution de la maladie (65% dans les lignées de MM). Ces mutations, intervenant principalement dans le domaine de liaison à l'ADN, induisent fréquemment une accumulation de la protéine qui se retrouve la plupart du temps non fonctionnelle.

P53 est la principale protéine suppressive de tumeur. Elle s'accumule dans les cellules en réponse à un dommage à l'ADN, une activation d'oncogène et d'autres stress. Son expression est régulée principalement par MDM2, une ubiquitine ligase. L'ubiquitinylation de p53 par MDM2 conduit à sa dégradation par le protéasome. Il apparait, dans la littérature, que l'expression de ces deux protéines est étroitement liée, bien que ce mécanisme reste encore à être précisé. Récemment, il a été montré que l'expression de MDM2 pouvait être inhibée par p53 *via* l'intermédiaire de miRNA (Pichiorri et al., 2010).

P53 agit comme un facteur de transcription qui se lie spécifiquement à certaines séquences d'ADN et active la transcription de nombreux gènes qu'ils soient impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou autre. P53 induit, par exemple, la transcription de Bax, PUMA ou encore Noxa.

En plus de son activité nucléaire, p53 possède également une activité cytosolique et mitochondriale, indépendante de son rôle transcriptionnel. Sous l'action de nombreux stress, p53 est transloquée à la mitochondrie et induit la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer comment p53 induit cette perméabilisation. Il a alors été suggéré que p53 puisse agir comme un activateur direct de Bax et Bak, mais également comme un sensibilisateur permettant l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-xL (Green et Kroemer, 2009). En effet, l'interaction de p53 avec Bcl-2, Bcl-xL et Bak a déjà été observée par co-immunoprécipitation (Mihara et al., 2003). Dans un système acellulaire, il a été montré que p53 peut induire l'activation de Bax par un système de « hit and run » (Chipuk et al., 2004). D'autres études ont montré que l'interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL impliquait le domaine de liaison à l'ADN de p53 ainsi qu'une région riche en proline (Xu et al., 2006). Enfin, une dernière étude mettait en évidence une affinité plus forte de p53 avec Bcl-xL qu'avec Bak, suggérant que p53 agisse en premier lieu comme un sensibilisateur puis comme un activateur (Green et Kroemer, 2009).

3. MUTATIONS DE RAS

Les mutations de Ras ont lieu principalement entre le stade MGUS et le stade MM. En effet, de telles mutations sont retrouvées dans 7% des MGUS, 25% des MM au diagnostic et 45% des patients en rechute. Cette caractéristique représente un facteur pronostique car ces mutations sont associées à une agressivité accrue de la maladie ainsi qu'à un plus faible taux de survie. Ces mutations, aussi bien de N-Ras (17% des patients) que de K-Ras (6%), sont souvent

retrouvées dans les MM portant une t(11 ;14) alors quelles sont rarement associées avec les MM présentant une t(4 ;14) ou une del(17) (Chng et al., 2008)

4. GAIN DU CHROMOSOME 1Q21

Ce gain de séquence en 1q21 est observé dans 30 à 40% des MM et touche plus particulièrement les groupes t(4 ;14) et t(14 ;16). Cette caractéristique apporte un avantage hautement prolifératif aux cellules de MM (Chng et al., 2007). Il a été proposé que l'augmentation de la prolifération consécutive au gain du chromosome 1q21 soit liée à l'augmentation de CKS1B. De plus, l'expression de CKS1B corrèle fortement avec l'expression d'un grand nombre de gènes de la prolifération (Zhan et al., 2007). L'augmentation de CKS1B pourrait être à l'origine de cette prolifération, cependant, d'autres études doivent être menées pour confirmer cette hypothèse.

5. Classification fonctionnelle

L'étude de Zhan et de ses collaborateurs a également mis en évidence trois groupes qui sont caractérisés non pas par une atteinte chromosomique mais par une signature fonctionnelle (Zhan et al., 2006). Ainsi le groupe des « low bone disease » est caractérisé par une absence de lésions ostéolytiques sans signature génique permettant de différencier ce groupe des autres. Le groupe des MM « proliférants » se distingue, quant à lui, par une surexpression des gènes du cycle cellulaire ou reliés à la prolifération cellulaire. Ce groupe a un index de prolifération proche de celui d'une lignée cellulaire et identifie, de ce fait, les patients qui présentent un index de prolifération élevé, quelle que soit leur signature cytogénétique. Enfin, un troisième groupe a été identifié, celui des MM « myéloïdes » qui est caractérisé par l'expression de gènes des cellules progénitrices de la lignée myéloïde. Cette signature a une valeur pronostique favorable (Zhan et al., 2006).

6. Facteurs pronostiques

La survie des patients atteints de MM est très hétérogène, elle dépend du patient (âge, sexe,..) mais aussi des caractéristiques de la tumeur. Les facteurs pronostiques mettent en relation toutes ces caractéristiques afin de déterminer la survie des patients dans le but

d'adapter les traitements. Aujourd'hui, les facteurs pronostiques les plus pertinents sont liés à la masse tumorale et aux caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la tumeur.

Le taux sérique de la β 2 microglobuline a longtemps été le facteur pronostique le plus important. En effet, il existe une corrélation directe entre ce taux et la masse tumorale (Bataille et al., 1983). Les cellules de MM expriment à leur surface un fort taux de CD138 (syndecan-1). Un fort taux de CD138 sérique (Lovell et al., 2005), la présence de plasmocytes circulants au diagnostic (Billadeau et al., 1996) ou encore la détection d'une maladie résiduelle après traitement sont de mauvais pronostic (Paiva et al., 2008). Certaines caractéristiques phénotypiques sont également liées à la survie des patients. C'est le cas des CD19, CD20, CD27, CD28, CD45, CD56, CD117 ou encore le CD221 (Bataille et al., 2006).

Le CD45 est un récepteur transmembranaire à activité phosphatase nécessaire à l'activation et à la différenciation lymphocytaire. Ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes B proliférants et son expression diminue au cours de la différenciation plasmocytaire normale (Hermiston et al., 2003). La fraction proliférante exprime le CD45 tandis que la fraction majoritaire, peu proliférante, ne l'exprime pas. L'analyse de l'expression du CD45 permet de discriminer deux groupes de patients: les MM à CD45^{faible} des MM à CD45^{négatif}. Les MM présentant un CD45^{faible} sont les moins différenciés et sont dépendants de l'IL-6. Les MM à CD45^{négatif} sont, quant à eux, plus différenciés et peuvent utiliser une boucle IGF-1 pour leur survie ce qui les rend plus clonogéniques (Ishikawa et al., 2006). Ainsi, les MM à CD45^{faible} ont un meilleur pronostic que ceux à CD45^{négatif} (Pellat-Deceunynck et Bataille, 2004).

Les caractéristiques cytogénétiques des MM ont permis de déterminer des facteurs pronostiques importants. Les hyperdiploïdes et les t(11 ;14) sont depuis longtemps considérés comme étant les groupes de meilleurs pronostics basés sur la réponse aux traitements tandis que les MAF, MMSET ainsi que les délétions du chromosome 13 ou 17 sont associés avec un mauvais pronostic (Gertz et al., 2005) (Wuilleme et al., 2005). La découverte de nouvelles molécules ainsi que la mise en place de nouveaux protocoles thérapeutiques ont permis d'améliorer la survie des patients appartenant à certains groupes. De ce fait, Nair et ses collaborateurs ont montré sur une cohorte de 303 patients sous traitements actuels, que le classement des groupes de MM en fonction de la survie globale a évolué (Nair et al., 2010). Les MAF ainsi que le groupe « proliférant » apparaissent désormais comme ayant les plus mauvais pronostics ; suivis par les t(11 ;14) CD1, enfin, les autres groupes t(11 ;14) CD2, les MMSET, le

groupe « myéloïde » et les hyperdiploïdes ont un meilleur pronostic (Figure 35a). Le groupe des CCND1 (Cycline D1) est maintenant divisé en deux avec des réponses cliniques très différentes. En effet, le sous-groupe CD20- (CD1) est caractérisé par un meilleur niveau de rémission complète cependant, la durée de ces rémissions est aussi courte que celle du groupe proliférant (Figure 35b) *A contrario*, le groupe CCND1 CD20+ (CD2) a la plus longue durée de rémission complète de l'ensemble des groupes de MM (Figure 35c).

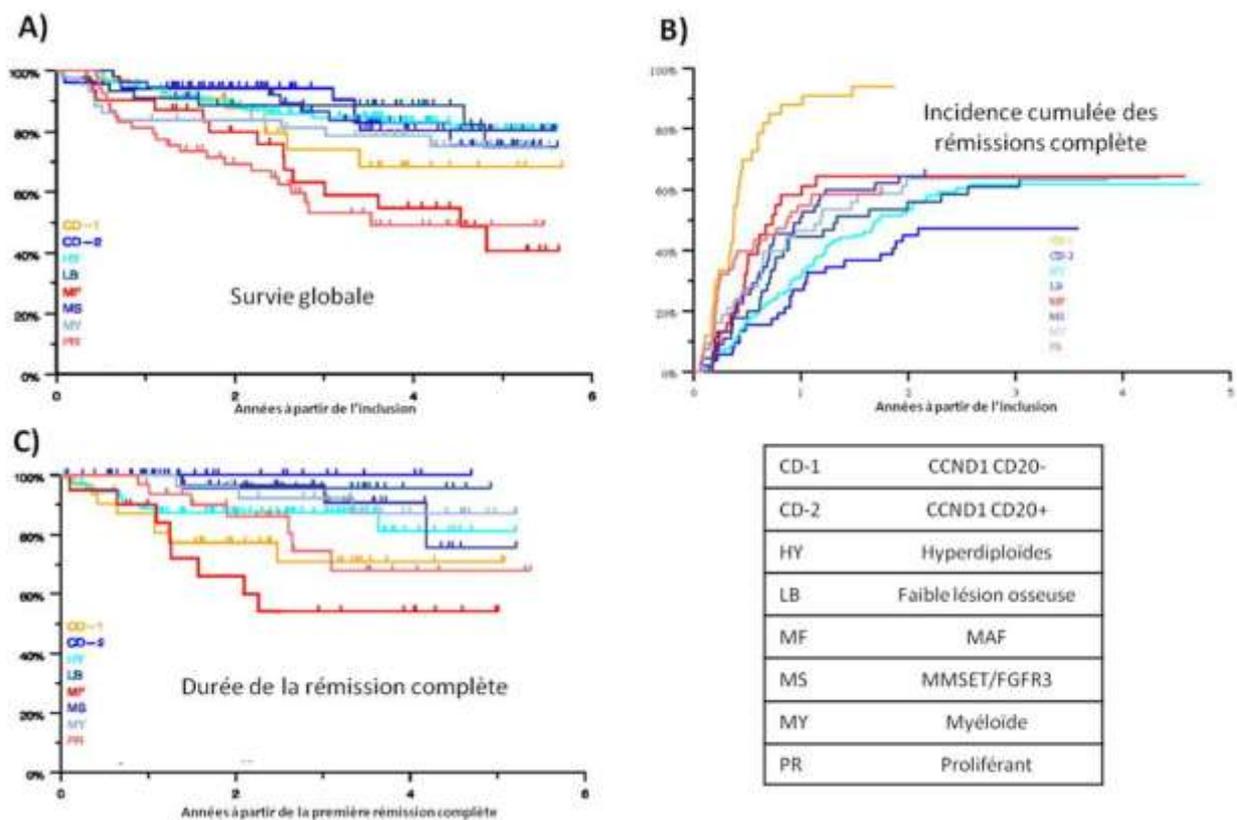


Figure 35 : Survie globale, incidence des rémissions complètes et durée des rémissions complètes pour les huit sous-groupes de MM.

(D'après Nair et al. 2010)

C. LE ROLE DE L'ENVIRONNEMENT MEDULLAIRE

L'environnement médullaire est constitué de trois compartiments. Le premier est composé de cellules souches hématopoïétiques, de progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux ainsi que de cellules de l'immunité (lymphocytes, monocytes, macrophages et cellules dendritiques). Le second est constitué de cellules non hématopoïétiques (cellules

stromales, ostéoclastes, ostéoblastes et cellules épithéliales). Enfin, le troisième comprend la matrice extracellulaire, la fibronectine et le collagène. Les interactions entre ces trois compartiments sont essentielles à la pathogenèse du MM car elles soutiennent la prolifération, la survie, le recrutement, la migration et la résistance aux drogues des cellules de MM (Podar et al., 2009).

De nombreuses cytokines et facteurs de croissance sont produits et sécrétés par les cellules de MM et du microenvironnement. De plus, des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion à la matrice extracellulaire et dans les contacts entre cellules ont un rôle essentiel dans la niche médullaire (Podar et al., 2009). Les boucles autocrines et paracrines ainsi que les contacts entre cellules vont induire des cascades de signalisation dans les cellules myélomateuses. Ainsi, de nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des voies Ras/MAPK, PI3K/Akt, Jak2/Stat3 et NF- κ B dans la biologie du MM (Figure 36).

Ainsi, l'IL-6 qui est un des facteurs de croissance et de survie les plus importants dans le MM, est produit par les cellules de l'environnement médullaire. Une autocrinie IL-6 est parfois détectée et est associée à un phénotype malin sévère (Bataille et al., 1989). La synthèse de ce facteur de croissance est stimulée par des contacts directs entre les cellules de l'environnement et les cellules myélomateuses ainsi que par des facteurs solubles (TNF α , l'IL1 β ou le VEGF). Les cellules de MM expriment le récepteur à l'IL6 et l'augmentation de son expression est corrélée avec l'évolution de la maladie (Barillé et al., 1999). Les principales voies de transduction activées par ce facteur sont les voies JAK2/STAT3 et Ras/MAPK. Ces voies sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de MM, notamment au travers la transcription de gènes tels que *Bcl-xL*, *Mcl-1* ou encore la *Cycline D1* (Catlett-Falcone et al., 1999) (Puthier et al., 1999a).

L'IGF-1 est également un facteur de croissance majeur dans la biologie du MM. Produit par le foie et par certaines cellules de l'environnement médullaire, il favorise la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration et la résistance aux drogues des cellules de MM au travers de l'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/AKT (Descamps et al., 2006). D'autres facteurs de croissance tels que l'IL21, le HGF, HB-EGF, le FGF ou le VEGF activent la voie PI3K/AKT. Cependant, ces facteurs agiraient principalement au travers de l'induction d'une boucle autocrine IGF-1 (Klein et al., 2003a).

Enfin, il a été mis en évidence que les contacts entre cellules, l'adhérence à la matrice extracellulaire ainsi que de nombreux facteurs solubles (notamment les membres de la superfamille du TNF) activent la voie NFκB dans les cellules de MM, induisant l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie des cellules de MM (Li et al., 2008).

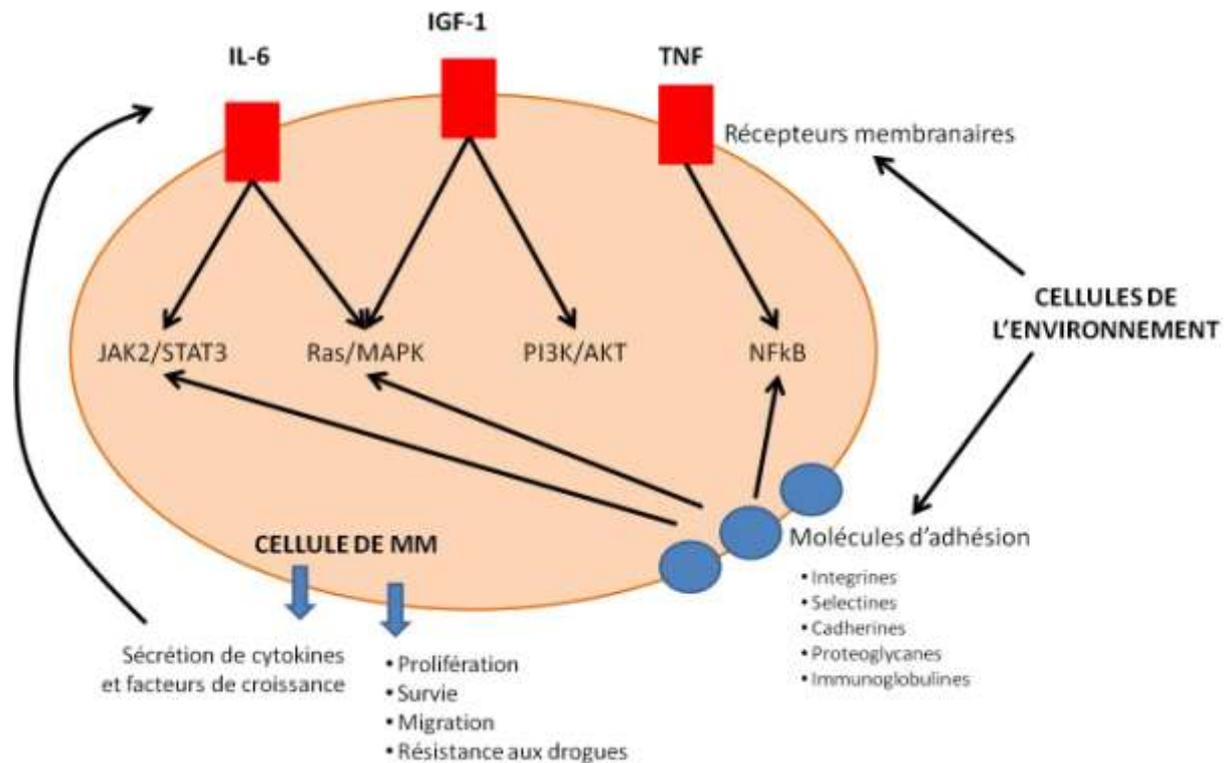


Figure 36 : Principales voies de signalisation impliquées dans la biologie du MM.

D'après (Raab et al., 2009).

D. PATHOGENICITE DU MM

Les plasmocytes normaux ayant achevé leur différenciation ne prolifèrent plus dans la moelle osseuse. Inversement, la pathogénicité du MM est inhérente à un avantage prolifératif, bien que faible, et à un faible taux apoptotique (Witzig et al., 1999) (Rajkumar, 2009).

1. Dérégulation de la prolifération

Il y a très peu de cellules proliférantes dans le MM. En effet, cette fraction représente 1% de la tumeur au diagnostic et augmente avec les rechutes, pouvant aller jusqu'à 83%. Cela montre que le taux de croissance de la tumeur est fonction de la taille de la fraction proliférante ainsi que du taux d'apoptose alors que le temps de génération des cellules proliférantes varie peu (Drewinko et al., 1981). Il existe une corrélation inverse entre l'index de prolifération et la survie des patients, ce qui en fait un puissant facteur pronostique.

Cette perturbation du cycle cellulaire peut s'expliquer par la dérégulation des cyclines D qui est observée dans 95% des cas (Bergsagel et al., 2005), par une perturbation des inhibiteurs des CDK (« cyclin-dépendant kinases ») (Sarasquete et al., 2006) mais également par les translocations ou anomalies, plus tardives. Toutes ces anomalies entraînent la dérégulation des gènes impliqués dans la prolifération tels que c-myc ou Ras (Avet-Loiseau et al., 2001) (Rasmussen et al., 2005).

2. Dérégulation de l'apoptose

La dérégulation de l'apoptose dans le MM se traduit principalement par une surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1 ou IAP) (Oancea et al., 2004) (Uchiyama et al., 1993). De plus, lorsque l'on compare les plasmocytes normaux de patients et les cellules primaires myélomateuses une diminution de Bax est observée, ce qui peut être corrélé au phénotype malin (Spets et al., 2002).

De nombreux travaux réalisés par notre équipe montrent le rôle essentiel de Mcl-1 dans la survie des cellules de MM (Derenne et al., 2002) (Wuillème-Toumi et al., 2005) (Gomez-Bougie et al., 2004). L'IL-6, qui est le facteur majeur de survie et de prolifération des cellules de MM, régule positivement l'expression de Mcl-1 ce qui confère aux cellules une résistance à l'apoptose (Jourdan et al., 2003). Mcl-1 bloque le processus apoptotique et son inactivation ou clivage est nécessaire pour rétablir l'apoptose induit par différents agents (Gomez-Bougie et al., 2005) (Gomez-Bougie et al., 2007). Enfin, l'expression de Mcl-1 corrèle avec la progression de la maladie ainsi qu'avec le pronostic des patients (Wuillème-Toumi et al., 2005).

La protéine Bcl-2 est exprimée dans les lignées de MM, dans les cellules primaires ainsi que dans les plasmocytes normaux (Pettersson et al., 1992). Notre équipe a mis en évidence que le niveau d'expression de Bcl-2 dans les plasmocytes est inversement corrélé à la

prolifération des plasmocytes normaux ou malins (Puthier et al., 1999b). Son inhibition par un oligonucléotide anti-sens (G3139) en combinaison avec du thalidomide et de la dexaméthasone a été testée en phase II sur des patients en rechute et montre que 55% des patients ont de bons résultats (Badros et al., 2005). D'autres études utilisent des inhibiteurs de Bcl-2 tels que le HA-14 ou encore l'ABT-737 (Pei et al., 2004) (Chauhan et al., 2007). Ainsi, Bcl-2 exercerait une fonction à la fois anti-apoptotique et inhibitrice de la prolifération cellulaire.

Les membres de la famille des IAPs jouent également un rôle prépondérant dans l'apoptose. En effet, une augmentation significative de l'expression des IAPs est observée chez les patients de mauvais pronostic suite à un traitement anticancéreux (Nakagawa et al., 2006). Une surexpression de ces membres corrèle avec une résistance aux traitements et la diminution de leur expression sensibilise les cellules à l'apoptose (Meng et al., 2007).

E. LES THERAPIES DU MM

Le traitement des patients atteints d'un MM ne débute qu'à partir du stade symptomatique de la maladie. En effet, au moins un signe d'atteinte organique liée au désordre plasmocytaire est requis. Ces atteintes symptomatiques sont réunies sous l'acronyme C.R.A.B : hyper**C**alcémie (>2.75 mmol/L), insuffisance **R**énale liée à la pathologie, **A**némie (hémoglobine < 10g/dL) ou lésions osseuses (« **B**one lesions »).

Pour les patients âgés au plus de 65 ans, le traitement actuel repose sur un traitement d'induction suivi d'une intensification thérapeutique avec autogreffe de cellule souches périphériques. En France, le traitement d'induction recommandé à ce jour est composé de quatre cycles de Velcade®(Bortezomib, inhibiteur du protéasome) et de Dexaméthasone (corticoïde) (Harousseau et al., 2009). L'intensification thérapeutique consiste en une forte dose de Melphalan (200mg/m²) suivi de la réinjection de cellules souches autologues. Enfin, plusieurs études randomisées ont récemment démontré l'intérêt d'un traitement de consolidation et d'entretien après l'intensification thérapeutique, notamment par lenalidomide (Attal et al., 2010). L'allogreffe à conditionnement atténué reste indiquée pour les patients jeunes présentant une cytogénétique à risque et ayant déjà fait une rechute. L'existence d'un effet immunologique du greffon contre les cellules myélomateuses a été démontré (Lokhorst et

al., 2010). Cependant, la toxicité de la procédure reste importante et l'indication de cette thérapeutique est étudiée au cas par cas.

Les patients de plus de 65 ans, ou qui ne sont pas éligibles au Melphalan à haute dose, sont traités par chimiothérapie conventionnelle associant du Melphalan, de la Prednisone (corticoïde) et une nouvelle molécule telle que le Velcade®, le Revlimid® (Lénalidomide, anti-angiogénique) ou le Thalidomide (anti-angiogénique) (Facon et al., 2007).

La médiane de survie du MM est inférieure à 3 ans et les chances d'atteindre 10 ans avec la chimiothérapie conventionnelle sont faibles. En effet, les patients rechutent inévitablement avec l'apparition de résistances. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc indispensables. Les plus récentes mises en place visent, désormais, non seulement les cibles classiques de la chimiothérapie cytotoxique mais également les molécules d'adhésion ainsi que les voies moléculaires qui interfèrent dans la prolifération et la survie des cellules de MM (Terpos et al., 2005).

Résultats

Comme je l'ai décrit dans la partie précédente, le MM est une lymphopathie maligne incurable. Malgré les avancées thérapeutiques, les patients développent des résistances aux traitements qui sont souvent caractérisées par une augmentation de la résistance à l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2000). C'est pourquoi, une meilleure connaissance des mécanismes d'échappement à l'apoptose, dans le MM, est nécessaire pour la mise en place de nouveaux traitements.

La découverte de ces nouveaux agents passe par une compréhension plus approfondie de l'implication des protéines membres de la famille de Bcl-2 dans l'apoptose de ces cellules cancéreuses. En effet, une dérégulation des membres de cette famille a souvent été rapportée comme étant impliquée dans les phénomènes de résistance (Fulda, 2009).

C'est notamment le cas de la protéine Bik/Nbk (« Bcl-2-interacting killer/Natural born killer »), protéine à domaine « BH3 seul » qui est impliquée dans de nombreux cancers. En effet, le gène de Bik est délété dans les gliomes (Bredel et al., 2005), le cancer colorectal (Castells et al., 1999) et le carcinome de la tête et du cou (Reis et al., 2002). Ce gène n'est pas transcrit dans le carcinome rénal (Sturm et al., 2006), le cancer du sein surexprimant le récepteur aux œstrogènes (Hur et al., 2006) et dans une lignée de MM (Kas6/1) (Pompeia et al., 2004). Le gène codant pour Bik est également souvent muté dans les lymphomes B (Arena et al., 2003). Toutes ces études montrent que Bik est impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose.

Jusqu'à ce jour, seuls quatre articles donnaient des informations concernant cette protéine pro-apoptotique dans le MM. L'étude de Pompeia et de ses collaborateurs a permis de mettre en évidence que le gène de Bik est mis sous silence par hyperméthylation de l'ADN dans une lignée de MM (Kas-6/1) (Pompeia et al., 2004). D'autres études ont montré, d'une part, que cette protéine est dégradée par le protéasome et que le Bortezomib (inhibiteur du protéasome) induit une accumulation de Bik dans le MM (Fennell et al., 2008) (Zhu et al.,

2005b) et, d'autre part, qu'une augmentation de Bik est également décrite en réponse à la doxorubicine dans la lignée U266 (Panaretakis et al., 2002).

Ainsi, beaucoup d'informations manquaient, à ce jour, pour comprendre l'importance de l'implication et de la régulation de Bik dans l'apoptose des cellules myélomateuses. C'est pourquoi, la première partie de ma thèse a consisté en l'étude de cette protéine, afin de mieux caractériser son expression, sa régulation et son rôle dans l'apoptose des cellules de MM.

ARTICLE 1 : La protéine Bik est impliquée dans l'induction de l'apoptose et la sensibilité au stress oxydatif dans le Myélome Multiple.

Le profil d'expression protéique des membres de la famille de Bcl-2 a été réalisée sur 24 lignées de MM (LMM) et 14 prélèvements de patients purifiés CD138⁺, par western blot. Cette analyse nous a permis, d'une part, de mettre en avant l'hétérogénéité d'expression de Bik dans le MM et d'autre part, de mettre en évidence une corrélation de l'expression de Bik avec celle de Bcl-2. De plus, nous avons démontré, par immuno-précipitation, que Bik forme de nombreux complexes endogènes avec Bcl-2 dans les LMM, suggérant que ces deux protéines régulent mutuellement leur expression protéique. En effet, une modification de l'expression de Bcl-2 a un effet direct sur celle de Bik, montrant que la protéine Bik semble être stabilisée par le complexe qu'elle forme avec Bcl-2. Il est à noter qu'aucun complexes Mcl-1/Bik n'a été observé sur les LMM testées.

Nous avons ensuite étudié l'implication des facteurs de transcription TEF et p53 dans la transcription du gène de Bik. Nos résultats mettent en évidence que TEF semble être un facteur de transcription indispensable à la transcription du gène de Bik dans le MM. En effet, lorsque l'expression de ce facteur de transcription est diminuée par siRNA, nous observons une diminution de l'ARNm de Bik. A l'inverse, il n'y a pas de corrélation entre le statut de p53 et l'ARNm de Bik dans nos LMM, suggérant que p53 ne soit pas un facteur de transcription essentiel à la transcription du gène de Bik dans le MM.

Enfin, nous avons poursuivi par l'étude du rôle de Bik dans la mort cellulaire. La surexpression de cette protéine induit l'apoptose par la voie mitochondriale. En effet, la transfection d'un plasmide codant pour cette protéine induit la rupture des complexes Bcl-2/Bim et Bcl-xL/Bim endogènes et l'activation des caspases 3 et 9 et, par conséquent, la mort cellulaire. De plus, la diminution de l'expression de Bax et/ou de Bak par siRNA diminue la mort induite par la surexpression de Bik, soulignant l'importance de ces protéines dans l'apoptose induite par Bik. Enfin, nous avons mis en évidence que la protéine Bik est impliquée dans la sensibilité des cellules au stress oxydatif. En effet, la surexpression de Bik induit une

sensibilisation des cellules à l'H₂O₂, tandis que la diminution de l'expression de Bik induit une résistance des cellules à ce stress.

Cette étude a permis de mettre à jour, d'une part, la complexité de la régulation de l'expression de Bik dans les cellules myélomateuses et, d'autre part, l'importance de cette protéine dans l'apoptose des cellules de MM. Ainsi, au travers de cette étude, nous soulignons l'intérêt de cibler Bik ou les complexes que cette protéine forme avec Bcl-2 dans l'établissement de nouveaux protocoles thérapeutiques.

BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma

L Bodet¹, E Ménoret¹, G Descamps¹, C Pellat-Deceunynck¹, R Bataille¹, S Le Guillou^{1,2}, P Moreau², M Amiot¹ and P Gomez-Bougie^{*,1,2}

¹Inserm, UMR892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, Equipe 10 labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2008, 8 quai Moncoussu, Nantes BP70721 F-44007, France; ²CHU de Nantes, Service d'Hématologie Clinique, Nantes F-44000, France

BACKGROUND: Although gene expression profile of multiple myeloma (MM) patients shows a wide range of Bik/Nbk expression, varying from absent to high, its regulation and function in myeloma cells is poorly understood. Thus, we addressed these questions in MM.

METHODS: Human myeloma cell lines (HMCLs) and primary purified myeloma cells were studied for Bcl-2 family protein expression by western blot and further correlation analysis was performed. Correlative study between Bik and thymocyte embryonic factor (TEF) transcription factor expression was analysed by PCR. Stress oxidative response was analysed by flow cytometry.

RESULTS: A strong expression of Bik protein was found only in one out of three of HMCL and correlated to Bcl-2 expression ($P = 0.0006$). We demonstrated that Bik could be regulated at the protein level by Bcl-2 and at the transcriptional level by TEF. Bik overexpression sensitises myeloma cells to oxidative stress whereas Bik silencing increases resistance to H₂O₂ oxidative stress. Furthermore, Bik ectopic expression disrupts Bim/Bcl-2 and Bim/Bcl-xL endogenous complexes triggering Bim release that could induce Bax and Bak activation.

CONCLUSIONS: Our results suggest that Bik has a role in both, apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in myeloma cells. Small BH3 mimetic molecules should be considered for further apoptosis-based therapy in myeloma cells expressing endogenous Bik/Bcl-2 complexes.

British Journal of Cancer (2010) **103**, 1808–1814. doi:10.1038/sj.bjc.6605981 www.bjcancer.com

Published online 9 November 2010

© 2010 Cancer Research UK

Keywords: multiple myeloma; Bik; Bcl-2; TEF; apoptosis; oxidative stress

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy presently incurable. It has a high degree of heterogeneity at presentation and a great variability with regard to the clinical outcome of patients in response to chemotherapy. Analyses of the global expression profile of patients have led to the molecular classification of MM patients in different disease subtypes (Zhan *et al*, 2006). Recently, new therapy, such as proteasome inhibitors or immunomodulatory drugs have been introduced into MM treatment showing efficiency even in patients resistant to conventional chemotherapy (Ocio *et al*, 2008). However, despite these advances in MM treatment, all patients develop resistance to treatment that is often characterized by a reduced apoptosis rate. Thus, a better understanding of how a cell evades apoptosis is needed. Members of the Bcl-2 family are critical regulators of apoptosis and their ratio between pro-survival and pro-apoptotic members mainly determines the fate of a cell following an apoptotic stimulus. Pro-apoptotic BH3-only proteins are the most apical mediators of cell death and their pro-apoptotic activity is tightly regulated by diverse transcriptional and post-transcriptional mechanisms (Puthalakath and Strasser, 2002). BH3-only proteins can be subdivided in two groups, the sensitizers including Bmf, Bik/Nbk, Bad, Noxa and the activators Bim, Bid and Puma (Letai *et al*, 2002). Whereas activator BH3-only proteins can directly activate Bax or Bak, the role of sensitizers is to bind and occupy the

antiapoptotic Bcl-2 proteins. As the gene expression profile of MM patients has demonstrated a wide range of Bik/Nbk expression, from absent to very high (Zhan *et al*, 2003), we addressed the regulation and the role of Bik in MM. Bik has been identified as a binding partner and antagonist of pro-survival Bcl-x_L and Bcl-2 and of two viral survival proteins, EBV-BHFR1 and adenovirus E1B-19 kDa (Boyd *et al*, 1995). Its BH3 domain is responsible of the cell death-promoting activity and of physical interactions with antiapoptotic molecules (Gillissen *et al*, 2003). Depending of the cellular context, Bik can be either strongly apoptotic when transfected in various cell lines (Han *et al*, 1996) or can sensitise tumour cells to apoptosis mediated by chemotherapeutic agents or by Fas (Daniel *et al*, 1999). Tight control of *Bik* gene expression at multiple steps is probably essential, given the fact that Bik harbours an already exposed BH3 domain (McDonnell *et al*, 1999). It has been proposed that induction of Bik by genotoxic stress is regulated at transcriptional level in a p53-dependent manner (Mathai *et al*, 2002). DNA methylation was also implicated in Bik transcriptional regulation (Sturm *et al*, 2006). More recently, it was shown that PAR bZIP proteins, a family of transcription factors, were able to regulate some BH3-only proteins (Ritchie *et al*, 2009). More specifically, one of these transcription factors, thymocyte embryonic factor (TEF) directly controls Bik transcription. Indeed, chromatin immunoprecipitation assays indicate that TEF protein directly activates Bik promoter (Ritchie *et al*, 2009). In addition, the implication of Bik in the development of human breast and colorectal cancer was suggested because of the identification of a region deletion on chromosome 22q13, where *Bik* gene is located (Castells *et al*, 2000). Finally, post-transcriptional modifications

*Correspondence: Dr P Gomez-Bougie;

E-mail: patricia.gomez@nantes.inserm.fr

Revised 17 August 2010; accepted 13 October 2010; published online 9 November 2010

were also implicated in Bik regulation. Thus, Bik activity can be regulated by phosphorylation which increases Bik pro-apoptotic capacity, probably by enhancing its binding affinity with antiapoptotic proteins Bcl-x_L and Bcl-2 (Li *et al*, 2003).

In this study, we first confirmed that Bik expression in human myeloma cells is very heterogeneous, varying from absent to very high and we next addressed the question of Bik regulation of expression and function in MM.

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions

KMS-11, KMM-1, KMS-12BM and KMS-12PE were kindly provided by Dr T Otsuki (Okayama, Japan), JJN-3 by Dr Van Riet (Belgium), JIM3 by Dr MacLennan (Birmingham, UK), Karpas 620 by Dr Karpas (Cambridge, UK) and MM.1S by Dr Rosen (Chicago, IL, USA). LP-1, L363, NCI-H929 and OPM-2 human myeloma cell line (HMCL) were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and U266 from the ATCC (Rockville, MA, USA). The XG-1, XG-2, XG-5, XG-6, XG-7, NAN-1, NAN-3, NAN-6, SBN and BCN HMCL have been previously established in our laboratory from peripheral blood samples or pleural effusion of patients with MM and are cultured in the presence of 3 ng ml⁻¹ of r-IL-6 (Novartis, Basel, Switzerland) (Bataille *et al*, 2006). Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum, 2 mM glutamine, antibiotics and 5 × 10⁻⁵ M 2-βME. Gradient density centrifugation using ficoll hypaque and purification by CD138-immunomagnetic beads were used to obtain purified malignant plasma cells from MM bone marrow specimens after written informed consent given at the University Hospital of Nantes. The purity of plasma cell population was always superior to 90% as assessed by morphology.

Transient transfections and RNA interference assays

Transfection of KMM-1 was performed using Lipofectamin 2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). NCI-H929 and U266 HMCL were transfected using Amaxa Nucleofector (T solution, X01 programme and R solution, T01 programme, respectively). pcDNA3 Bik-HA and pRcCMV Bcl-2 were kindly provided by Dr G Chinnadurai, USA and by Dr F Vallette, France, respectively. Cells were transfected with 100 pmol siRNA using Lipofectamine 2000. All siRNA oligos used, namely, Bik (L-004388-00-0005), Bcl-2 (L-003307-00-0005), TEF (L-008769-00-0005), Bax (L-003308-01-0005) and Bak (L-009905-00-0005) were ON-TARGET plus siRNA pools of four oligos targeting four different mRNA regions at once and purchased from Dharmacon (Chicago, IL, USA).

Antibodies (mAbs) and reagents

Anti-Bcl-2 (clone 124) mouse mAb was obtained from Dako (Roissy, CDG, France). Antibodies against caspase-3 (clone E-8) mouse mAb, Bik (N-19) goat polyclonal, caspase-9 (clone F-7) mouse mAb and Mcl-1 (S19) rabbit polyclonal were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Antibodies against PUMA rabbit polyclonal was from Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany). Anti-Actin (clone C4) and anti-Bim rabbit polyclonal antibodies were obtained from Chemicon (Temecula, CA USA). Anti-Noxa (clone 114C307.1) from Alexis (Coger, Paris, France).

Apoptotic cell death

Cell death was assessed by Apo 2.7 (Beckman Coulter, Marseille, France) staining. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Immunoblotting

Cells (5 × 10⁶) were resuspended in 150 μl lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% Triton-X 100) containing 2 mM PMSF and 2 μg ml⁻¹ aprotinin. After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 12 000 g for 30 min at 4 °C. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, electrotransferred onto PVDF membranes and analysed following standard procedures. The signal was detected by ECL detection (Pierce, Rockford, IL, USA).

Immunoprecipitation

Cells (25 × 10⁶) were lysed in 1% digitonin containing lysis buffer. Whole-cell lysates were obtained, pre-cleared with protein A-sepharose and then incubated overnight with 5 μg of the specific antibody. Immunocomplexes were captured with either protein A-sepharose or protein G-agarose. Beads were pelleted, washed three times and boiled in SDS sample buffer. The presence of immune complexes was determined by western blotting analysis.

RT-PCR and sequencing

Total RNA was prepared using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel Corporation, Düren, Germany). For complementary DNA synthesis, 2 μg of the total RNA was reverse transcribed using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Corp.) and oligo-(dT)12-18 (Invitrogen). Amplification of *TEF*, *Bik* and *Actin* was performed using the following primers: *TEF* forward (5'-TGGTCCTGAAGAAGCTGATGG-3') and reverse (5'-TCCAGGTCCATGTACTIONCCAG-3'), *Bik* forward (5'-GACCATG GAGTTCTTGGCA-3') and reverse (5'-AGGCTCACGTCCATCTC GTC-3') and *Actin* forward (5'-ATCTGGCACCACCTTCTAC AATGAGCTGCG-3') and reverse (5'-CGTCATACTCCTGCTTGCT GATCCACATCTGC-3'). P53 mutations were identified by direct sequencing of RT-PCR products. For p53, two overlapping amplifications, a 750 pb (codons 1–250) and a 819 pb (codons 187–370) products, were performed using the following primer pairs: ATGGAGGAGCCGAGTCA and GGCCTCCGGTTCATGC CG (1–250), GGCCCCTCCTCAGCATCTT and TCCCCATCCTCCT CCCC (187–370).

Detection of ROS generation For ROS generation analysis, cells were exposed to 200 μM H₂O₂ during 2 h and then incubated with 5 μM dihydroethidine (DHE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at 37 °C for 15 min. After incubation, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline. Oxidation of DHE to oxyethidium was then determined by flow cytometry.

RESULTS

Bik expression appears to be correlated to Bcl-2 expression and lack of Bik expression is not related to lack of other BH3-only protein

We used a fairly large number of HMCL (*n* = 24) to analyse Bik expression. We found that only 9 HMCL (37.5%) displayed a moderate to strong expression of Bik protein. In contrast, weak expression or complete absence of Bik protein was observed in the other HMCL (Figure 1A). We also analysed Bik expression in CD138 + primary myeloma cells. Among 14 purified samples, Bik protein levels were moderate to high in eight, and low to absent in six primary myeloma samples. We, and others, have demonstrated that pairs like Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bim may mutually regulate their expression (Jorgensen *et al*, 2007; Toumi-Wuillème *et al*, 2007). In view of these findings, we were interested to establish whether the absence or weak Bik expression detected in 62.5% of HMCL was related to the expression of Bcl-2 or Bcl-x_L. Western

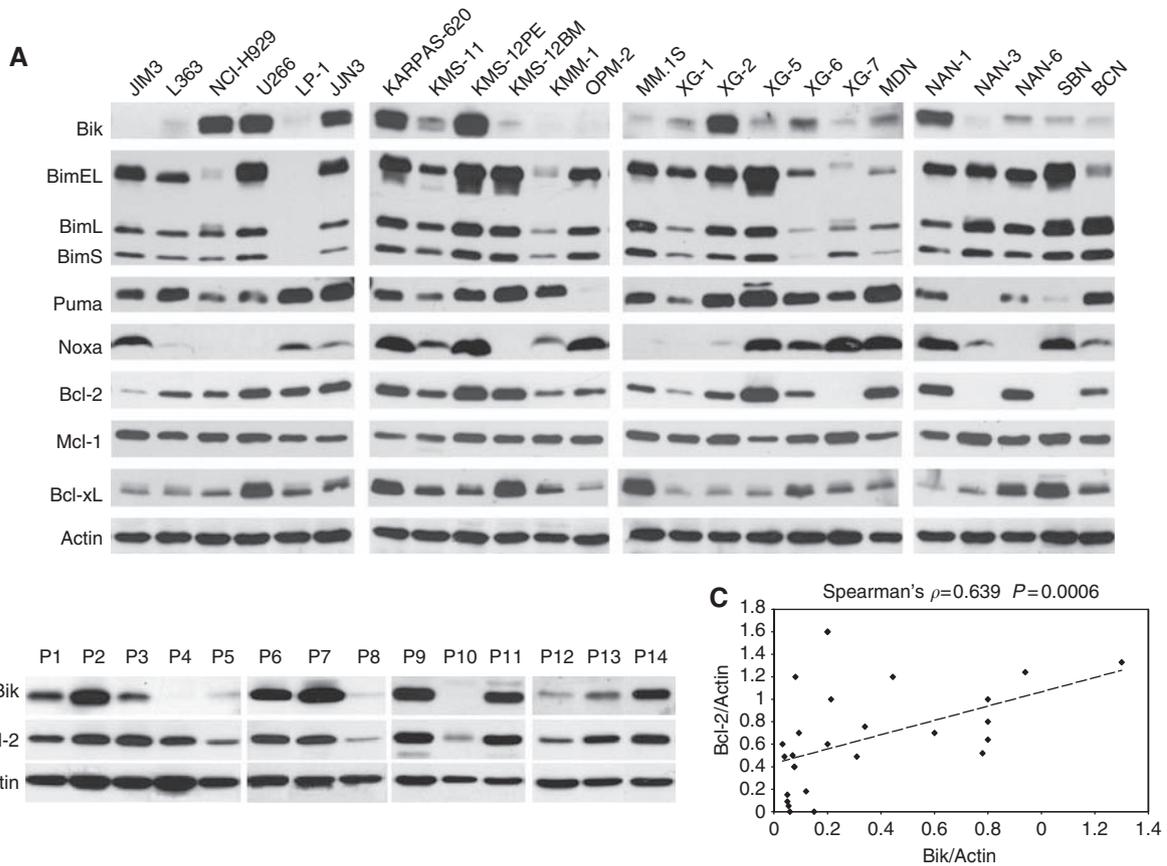


Figure 1 Bik expression is correlated with Bcl-2 expression. **(A)** Expression of BH3-only pro-apoptotic (Bik, Bim, Puma and Noxa) and antiapoptotic (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L) proteins on HMCL. Equivalent amounts of cell lysates (70 μ g of protein) were subjected to immunodetection with the indicated antibodies. Protein loading was controlled by probing with an anti-actin antibody. **(B)** Expression of Bik and Bcl-2 proteins on purified primary myeloma cells. **(C)** Bik and Bcl-2 from HMCL were quantified using Image-J software, both proteins were normalised by actin.

blotting and further quantification analysis showed that Bik expression was directly correlated to Bcl-2 protein expression in both HMCL (Spearman's $\rho=0.639$ $P=0.0006$) (Figure 1C) and primary myeloma cells (Spearman's $\rho=0.815$ $P=0.0005$). However, no significant correlation was found between Bik and Bcl-xL expression (Spearman's $\rho=0.079$ $P=0.711$). Apart from Bik, we analysed the expression of other BH3-only proteins, as loss of Bik was previously shown to coincide with lack of Bim, Noxa and Bad in renal cell carcinoma (Sturm *et al*, 2006). Most HMCL expressed readily detectable levels of all three Bim isoforms EL, L and S (76%). Bad was constitutive and homogeneously expressed by all HMCL analysed (not shown). Despite of low or negative Noxa expression detected in around half of HMCL, no direct correlation with Bik expression was observed (Figure 1A). Altogether, these results suggest that in myeloma cells, Bik expression is directly correlated to Bcl-2 levels whereas there is no relationship between Bik expression and the expression of any other BH3-only protein studied.

Bcl-2/Bik complexes are involved in Bik protein stability

As BH3-only molecules are kept in check by the antiapoptotic Bcl-2 proteins, we assessed the presence of constitutive Bik complexes in XG-2 and KMS-12PE cells. Figure 2A shows that myeloma cells displayed constitutive complexes of Bik essentially with Bcl-2 rather than with Mcl-1. Taking into account the above results, either the direct correlation between Bik/Bcl-2 expression or the detection of endogenous Bik/Bcl-2 complexes, we assessed the possible regulation effect of Bcl-2 expression on Bik levels. Thus, overexpression of Bcl-2 in myeloma cells induced an accumulation of Bik (Figure 2B). On the contrary, Bik overexpression

did not induce Bcl-2 accumulation (not shown). To confirm the stabilisation of Bik by Bcl-2 in MM, we showed that down-regulation of Bcl-2 by siRNA in U266 cells induced a decrease of Bik expression (Figure 2C).

mRNA Bik expression correlates with the expression of TEF mRNA independent of p53 status

Several transcription factors have been involved in the transcription of *Bik*. More particularly, the tumour suppressor p53 was implicated in the induction of Bik (Mathai *et al*, 2002). Therefore, we compared the status of p53 of HMCL (Supplemental data) with Bik expression showing no direct correlation between basal expression of Bik protein and the status of p53 (Figure 3A). More recently, it was demonstrated that TEF transcription factor directly binds the promoter of *Bik* and controls its transcription. Thus, we investigated the expression of *TEF* and *Bik* in our HMCL collection by RT-PCR. Of interest, as shown in Figure 3A, the analysis of this large collection of cell lines showed that *Bik* is expressed only in the presence of *TEF* mRNA, except for XG2 cell line, indicating that *Bik* gene could be transcriptionally activated by TEF in myeloma cells. To validate this hypothesis, the effect of *TEF* silencing on *Bik* expression was assessed (Figure 3B). In myeloma cells, the downregulation of *TEF* mRNA triggers an important *Bik* decrease, confirming the role of TEF in *Bik* transcription.

Bik is implicated in oxidative stress response

As it was demonstrated that TEF participates in oxidative stress responses via Bik expression (Ritchie *et al*, 2009), we assessed the

role of Bik in ROS generation. We transfected KMM-1 myeloma cells with 0.5 μ g Bik complementary DNA leading to moderate Bik ectopic expression that sensitises KMM-1 cells to oxidative stress,

as shown by the increase of oxyethidium formation (Figure 4A). In agreement with this result, the silencing of Bik rendered U266 cells resistant to oxidative stress, as indicated by the decrease of highly DHE-positive cells from 53 to 28% (Figure 4B). Altogether, these results show the implication of Bik in H₂O₂ oxidative stress responses in myeloma cells.

Transient ectopic expression of Bik induced cell death

To address the effect of ectopic expression of Bik, myeloma cells were transiently transfected either with Bik or with an empty vector. Ectopic Bik expression induced cell death detected by Apo 2.7 staining and activation of both caspase-9 and caspase-3 (Figure 5A and B). To explore whether Bax or Bak was involved in the pro-apoptotic function of Bik, silencing of Bak and Bax were performed and resulted in a complete decrease of Bax and Bak expression (Figure 5C). Knockdown of either Bak or Bax correlated with a strong decrease of Bik induced apoptosis, 72 and 75% respectively. These results indicate that overexpression of Bik promotes cell apoptosis through a Bak /Bax-dependent mitochondrial pathway. To unravel the mechanism of Bik-induced cell death, we analysed its binding partners under overexpression in KMM1 cells by co-immunoprecipitation experiments. Although ectopic Bik expression led to the formation of both Bcl-x_L/Bik and Bcl-2/Bik complexes, we observed a dissociation of Bcl-2/Bim and Bcl-x_L/Bim complexes as shown in Figure 5D. Thus, these findings suggested that Bim is released from Bcl-x_L and Bcl-2 and became available to exert its pro-apoptotic function.

DISCUSSION

The importance of BH3-only pro-apoptotic proteins in cancer therapy has become increasingly evident, and a wide variety of transcriptional and post-translational mechanisms that regulate their expression and activity has been reported (Puthalakath and Strasser, 2002). In this report, we found that Bik levels are very heterogeneous from absent to very high in both, cell lines and primary myeloma cells. We first looked for a relationship between Bik and other Bcl-2 family members. We provide evidence that there is no relationship between the absence of Bik and the presence of either Bim or Bad, as these two molecules are always

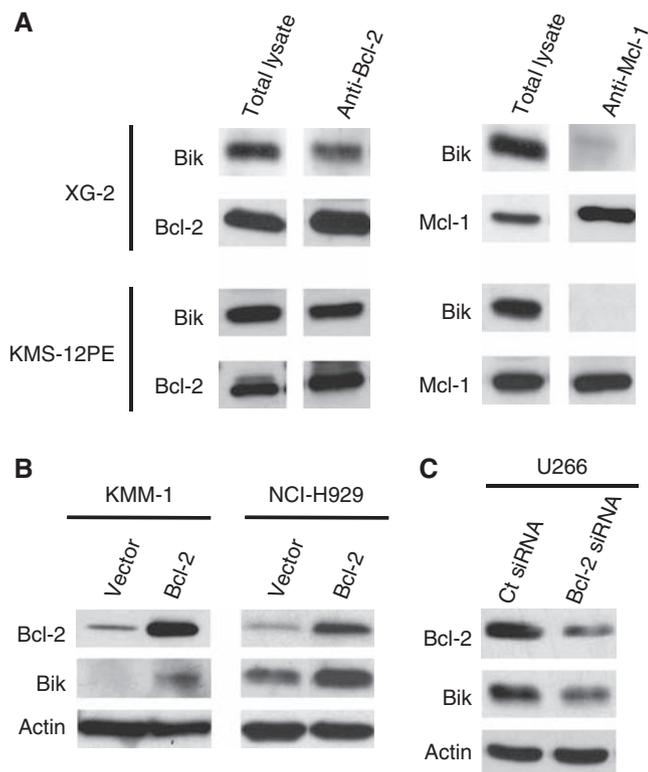


Figure 2 Bcl-2 expression stabilises Bik protein. **(A)** Bik and Bcl-2 form endogenous complexes in XG-2 and KMS-12PE HMCL. Lysates were subjected to immunoprecipitations with anti-Bcl-2 or anti-Mcl-1 antibodies and immunoblotting for the indicated proteins. **(B)** Ectopic expression of Bcl-2 stabilises Bik protein. Cells were transfected with pRcCMV-Bcl-2 or an empty vector. At 48 h after transfection, cells were harvested. Extracts were then immunoblotted for the indicated proteins. **(C)** Bcl-2 silencing downregulates Bik expression. U266 cells were transfected with control or Bcl-2 siRNA, protein expression was determined 24 h after transfection.

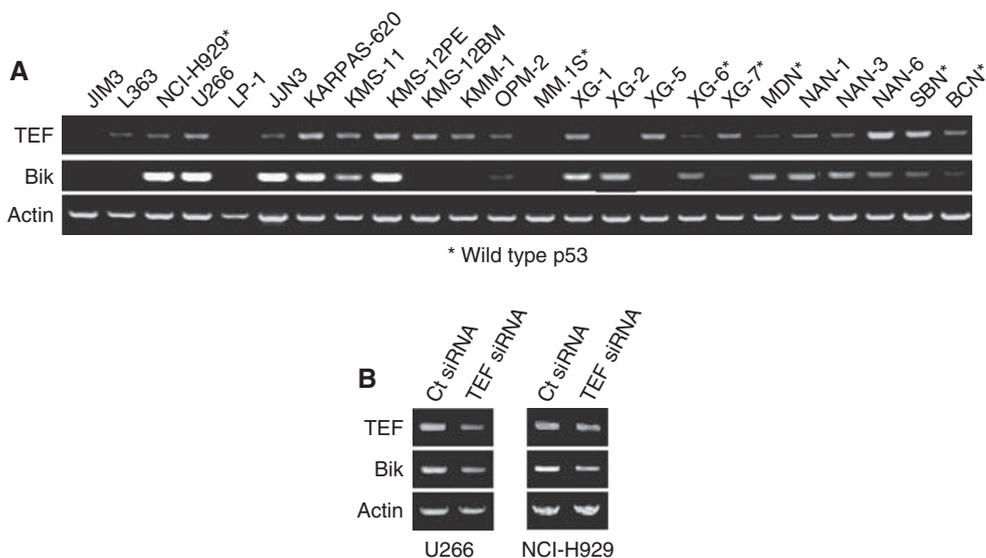


Figure 3 TEF transcription factor expression is correlated to Bik levels. **(A)** The mRNA levels of *TEF* and *Bik* of 24 HMCL were analysed by RT-PCR. *Actin* mRNA was used as an amplification control. Wild-type p53 HMCL are marked by *. **(B)** U266 and NCI-H929 cell lines were transfected with non-target control or TEF-specific siRNA. The mRNA levels were analysed by RT-PCR 72 h after transfection.

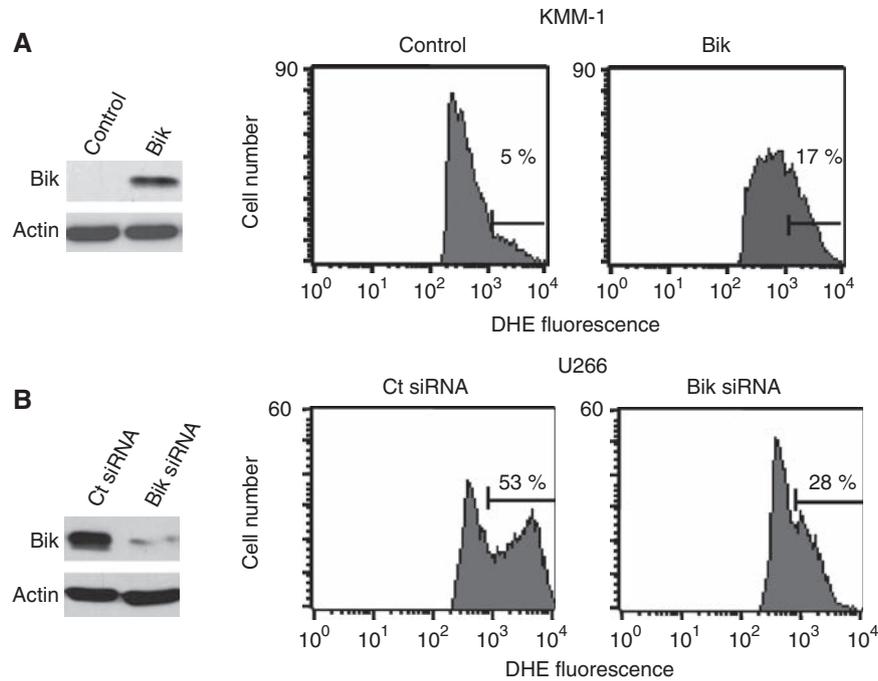


Figure 4 Bik contributes to the oxidative stress response. **(A)** Transient expression of Bik sensitises KMM-1 to oxidative stress. Cell line KMM-1 was transiently transfected with Bik complementary DNA or an empty vector (control), after 48 h, expression levels of Bik protein were determined by western blot. Transfected cells were treated with $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 and then ROS generation was measured by dihydroethidine (DHE) staining followed by fluorescence-activated cell sorting analysis. **(B)** Bik silencing promotes protection to oxidative stress. U266 were transfected with non-target control or Bik-specific siRNA, 24 h after transfection, lysates were obtained and analysed for Bik expression levels. Transfected cells were treated with $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 and stained as above. Results are representative of three independent experiments.

expressed in MM cells with the exception of Bim in one cell line. Furthermore, while Noxa is absent in about 50% of HMCL, there is no direct correlation between the lack of expression of Noxa and Bik. The relationship of BH3-only proteins expression in myeloma cells appears very different to the observation reported in renal cell carcinoma, where loss of Bik coincides with lack of Bim, Noxa and Bad (Sturm *et al*, 2006). Interestingly, we found that Bik expression is directly correlated to Bcl-2 protein expression in both HMCL ($P=0.0006$) and primary myeloma cells ($P=0.0005$). In contrast, there is no significant correlation between Bik and Bcl- x_1 . We also demonstrated that viable MM Bik-positive cells exhibit endogenous abundant Bik/Bcl-2 complexes whereas no Mcl-1-Bik interaction was detected. We noticed that some cell lines expressing very high levels of Bik and Bcl-2 harbour t(11;14) as U266, KMS-12PE and Karpas 620. Interestingly, MM patients harbouring this translocation do not belong to the worst prognosis group (Avet-Loiseau *et al*, 2002). We, and others, have demonstrated that some Bcl-2 family protein pairs may mutually regulate their expression. Pairs like Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bim support this proposal (Jorgensen *et al*, 2007; Toumi-Wuillème *et al*, 2007). In view of these findings, we overexpressed Bcl-2, which induced an important accumulation of Bik. Moreover, silencing of Bcl-2 triggers Bik downregulation, suggesting a direct effect of Bcl-2 on Bik protein expression. According to this, Mathai *et al* demonstrated in oral epithelial carcinoma cells that Bik expression was directly influenced by the expression of Bcl-2 in an inducible system. They suggested, using this model, that failure to observe Bik induction in the absence of Bcl-2 may result from Bik degradation (Mathai *et al*, 2002). Altogether, these results suggested that a very high expression of the tumour to high Bcl-2 levels. Besides the stabilisation of Bik by Bcl-2 at the protein level, it was previously proposed that p53 indirectly influence Bik expression

(Mathai *et al*, 2002). We demonstrated that there is no direct correlation between basal expression of Bik and the status of p53, however we cannot rule out that Bik expression may be induced once a genotoxic signal activates p53 in wild-type cell lines. More recently, Ritchie *et al* demonstrated a transcriptional regulation of *Bik* by TEF, a PARbZIP transcription factor, showing by both promoter-reporter and chromatin immunoprecipitation assays that TEF protein activates directly *Bik* promoter (Ritchie *et al*, 2009). In agreement with this finding, we showed that *Bik* is expressed only in the presence of *TEF* mRNA. Consistently, we demonstrated that TEF silencing triggers a strong decrease of *Bik* mRNA, confirming that *Bik* is transcriptionally activated by TEF in myeloma cells. Finally, chromatin immunoprecipitation assays in MM cells confirmed that TEF protein activates directly *Bik* promoter (result not shown). Despite TEF expression, some cell lines do not express Bik, probably due to a potential deletion of *Bik* at 22q13.2, as frequently described in other cancers (Sturm *et al*, 2006). This hypothesis can be further sustained by the frequent chromosomal abnormalities observed in MM (Magrangeas *et al*, 2005). In addition, it was demonstrated that the PARbZIP pathway mediates oxidative stress-induced apoptosis via Bik regulation. We consequently addressed the role of Bik in H_2O_2 oxidative stress response. Indeed, transient Bik expression sensitises myeloma cells to oxidative stress whereas Bik silencing increases resistance to this agent. Another study also demonstrates the implication of Bik in oxidative stress induced by Bz-423 in B cells, however other BH3-only proteins as Bad, Bim and Puma are also implicated in this response (Blatt *et al*, 2009). In addition, we found that ectopic expression of Bik in myeloma cells induces apoptosis. This result is in agreement with previous data, showing that ectopic expression of Bik results in apoptosis of a large number of tumour cells as colon, prostate or melanoma (Gillissen *et al*, 2003; Oppermann *et al*, 2005). Although ectopic expression of

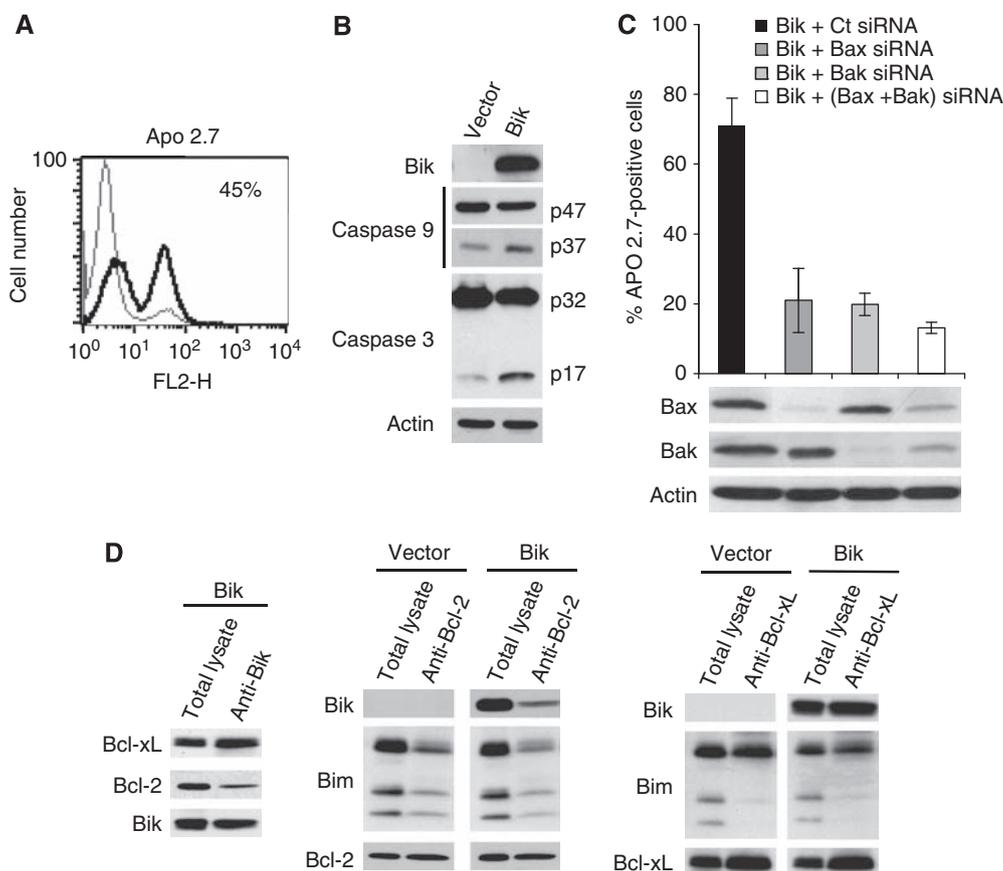


Figure 5 Bik overexpression induces cell death in myeloma cells. **(A)** KMM-1 cells were transfected either with empty vector (thin line) or Bik (thick line) complementary DNA, after 48 h cell death was measured by Apo2.7 staining. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Cell lysates were analysed by western blotting analysis to assess caspase-9 and caspase-3 activation. **(C)** Cells were co-transfected with Bik cDNA in the presence of control, Bax, Bak or Bax and Bak siRNA. At 48 h after transfection, cells were analysed for Apo2.7 staining. Expression levels of Bax and Bak were determined by western blot. **(D)** KMM-1 cells were transfected either with empty vector or Bik cDNA, 24 h after transfection cells were harvested and cell lysates were obtained. Bik, Bcl-2 and Bcl-xL immunoprecipitates were analysed by western blot.

Bik seems very effective to induce cell death, its dependence on caspase activation is controversial (Gillissen *et al*, 2003, 2007; Oppermann *et al*, 2005). We found that Bik-induced cell death in myeloma cells is associated with caspase-9 and caspase-3 activation suggesting that Bik promotes cell apoptosis through a mitochondrial-associated caspase pathway in myeloma cells. Moreover, knockdown of Bax or Bak showed that Bik induces cell death via a Bax/Bak-dependent mechanism, indicating that Bax and Bak could have a redundant role in this process. Furthermore, we provide evidence that upon Bik overexpression, Bik is found associated with both Bcl-2 and Bcl-xL and consequently triggers the disruption of Bim/Bcl-2 and Bim/Bcl-xL endogenous complexes. These findings suggest that Bik ectopic expression leads to Bim release that becomes available to exert its pro-apoptotic function through Bax and Bak activation.

Finally, myeloma cells expressing high endogenous Bik/Bcl-2 complexes could exhibit a 'deadly phenotype', as previously described for Bim/Bcl-2 pairs (Deng *et al*, 2007). Therefore, small

BH3 mimetic molecules should be taken into consideration for further apoptosis-based therapy in myeloma cells that constitutively express endogenous Bik/Bcl-2 complexes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée 2008). Linda Bodet was supported by CYMATH. We thank Catherine Gratas for technical advices.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

REFERENCES

Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R (2002) Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* **99**: 2185–2191

Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, 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

- Blatt NB, Boitano AE, Lyssiotis CA, Opirari Jr AW, Glick GD (2009) Bz-423 superoxide signals B cell apoptosis via Mcl-1, Bak, and Bax. *Biochem Pharmacol* **78**: 966–973
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, Chinnadurai G (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
- Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK (2000) A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* **60**: 2836–2839
- Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R (1999) Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* **94**: 1100–1107
- 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
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Stärck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K, Daniel PT (2003) Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* **22**: 3580–3590
- Gillissen B, Essmann F, Hemmati PG, Richter A, Richter A, Oztop I, Chinnadurai G, Dörken B, Daniel PT (2007) Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* **179**: 701–715
- Han J, Sabbatini P, White E (1996) Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* **16**: 5857–5864
- Jorgensen TN, McKee A, Wang M, Kushnir E, White J, Refaeli Y, Kappler JW, Marrack P (2007) Bim and Bcl-2 mutually affect the expression of the other in T cells. *J Immunol* **179**: 3417–3424
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**: 183–192
- Li YM, Wen Y, Zhou BP, Kuo HP, Ding Q, Hung MC (2003) Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants. *Cancer Res* **63**: 7630–7633
- Magrangeas F, Lodé L, Wuilleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H (2005) Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* **19**: 191–194
- Mathai JP, Germain M, Marcelluz RC, Shore GC (2002) Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* **21**: 2534–2544
- McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D (1999) Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists. *Cell* **96**: 625–634
- Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF (2008) New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol* **9**: 1157–1165
- Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J (2005) Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* **24**: 7369–7380
- Puthalakath H, Strasser A (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* **9**: 505–512
- Ritchie A, Gutierrez O, Fernandez-Luna JL (2009) PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death Differ* **16**: 838–846
- Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B, Daniel PT (2006) Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* **14**: 619–627
- Toumi-Wuillème S, Trichet V, Gomez-Bougie P, Gratas C, Bataille R, Amiot M (2007) Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 865–869
- Zhan F, Tian E, Bumm K, Smith R, Barlogie B, Shaughnessy Jr J (2003) Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood* **101**: 1128–1140
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, 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 Jr JD (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* **108**: 2020–2028

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Nous avons réalisé certains travaux complémentaires sur la compréhension des mécanismes de régulation génique et protéique de Bik dans le MM. J'ai réuni ici les principaux résultats issus de ces travaux car, même si ces derniers sont souvent incomplets, ils apportent néanmoins de précieuses informations.

Régulation transcriptionnelle du gène de Bik

Un stress génotoxique induit l'augmentation de l'expression de Bik

Dans le premier article, nous avons montré qu'il n'y a pas de corrélation entre le statut de p53 et le niveau d'expression de Bik. Cependant, il a été décrit dans d'autres modèles cellulaires qu'un stress dépendant de p53 peut induire une augmentation de l'expression de Bik. Afin de vérifier cela dans le MM, nous avons traité une LMM (XG-6 : p53^{WT}) avec du melphalan. Le melphalan est un agent alkylant bifonctionnel utilisé dans le traitement du MM. Cet agent empêche la séparation et la réplication de l'ADN induisant, de ce fait, la mort par accumulation de p53. Le résultat obtenu met en avant une augmentation de l'expression de Bik, 15 heures après traitement, démontrant que l'expression de cette protéine peut être induite lors d'un stress apoptotique dépendant de p53 dans le MM (Figure R1).

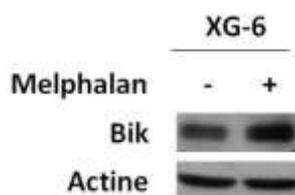


Figure R1 : Profil d'expression de Bik avant et après traitement au Melphalan (5 μ M) sur XG-6

L'hyperméthylation de l'ADN est impliquée dans la mise sous silence du gène de Bik

Nous nous sommes également interrogés sur l'importance de la méthylation de l'ADN dans le LMM, notamment concernant le gène de Bik. En effet, la méthylation est un processus physiologique qui permet la mise sous silence de certains gènes. Il existe deux types de méthylation de l'ADN : la méthylation de maintenance et la méthylation *de novo*. La méthylation de maintenance permet la conservation du profil de méthylation entre la cellule mère et la cellule fille. La méthylation *de novo* permet, quant à elle, de mettre sous silence des gènes qui ne l'étaient pas dans la génération cellulaire précédente. Ainsi, les gènes de l'embryogénèse subissent ce dernier type de méthylation afin de ne plus être exprimés une fois le stade embryonnaire passé. Ces deux types de méthylation ont un rôle physiologique bien déterminé.

Ces deux mécanismes de régulation de la méthylation de l'ADN sont souvent perturbés dans les cellules cancéreuses. En effet, une hypométhylation globale de l'ADN est fréquemment retrouvée dans ces cellules, favorisant ainsi l'instabilité chromosomique (Lapeyre et Becker, 1979). Il a également été mis en évidence des phénomènes d'hyperméthylation locale responsables de la répression de gènes impliqués notamment dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Teodoridis et al., 2004). Ainsi, l'hyperméthylation de nombreux gènes est retrouvée dans différents cancers ; c'est notamment le cas de la caspase 8 (neuroblastome de l'enfant), d'APAF-1 (mélanome) et de TMS1 (cancer du sein). De plus, l'hyperméthylation de ces gènes est corrélée à une augmentation de la résistance aux agents anticancéreux.

Afin de déterminer si le gène de Bik pouvait être « mis sous silence » par hyperméthylation de l'ADN, nous avons traité des LMM exprimant peu ou pas de Bik avec du 5-aza-2'-déoxycytidine (5'Aza). Cet agent bloque la méthylation de maintenance et, par conséquent, induit alors la déméthylation de l'ADN (Jüttermann et al., 1994). Nos résultats indiquent qu'une augmentation de l'expression protéique de Bik est constatée dans six des sept LMM testées (Figure R2A). De plus, l'analyse par QPCR réalisée sur quatre de ces LMM montre que l'ARNm de Bik a subi une augmentation de 2,5 à 4 fois après traitement vis-à-vis de la condition non-traitée (Figure R2B).

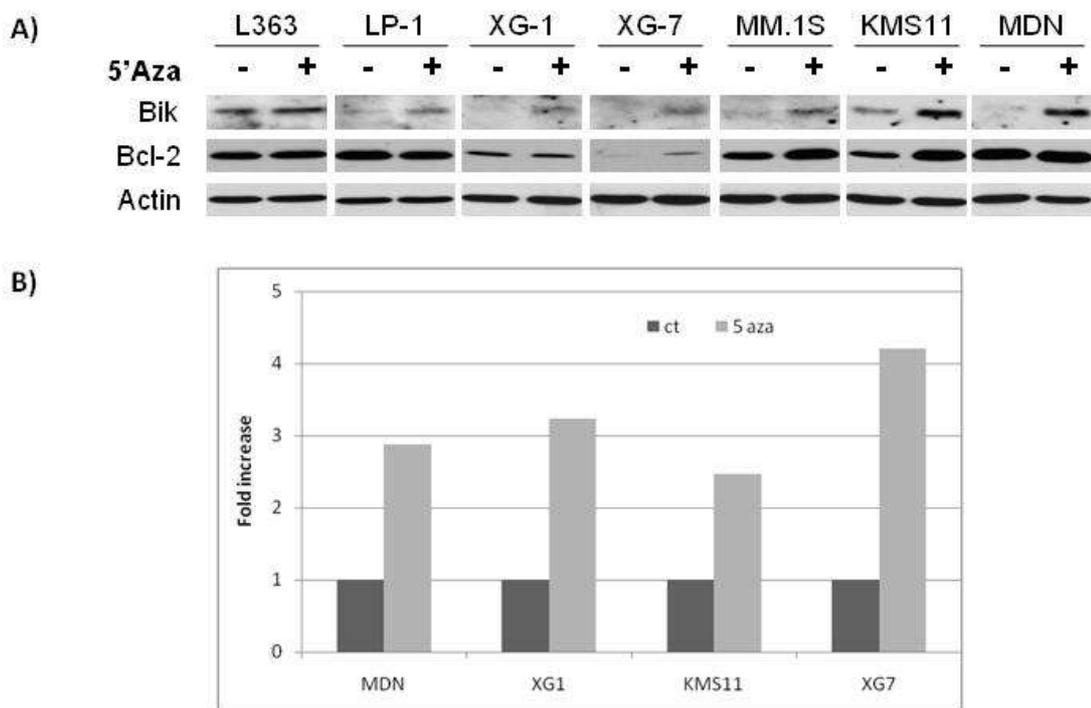


Figure R2 : Analyse de l'expression de Bik sous traitement au 5'Aza

Ces résultats soulignent, alors, le fait que pour six des sept LMM testées, l'absence de l'expression de Bik est liée à un phénomène d'hyperméthylation de l'ADN, que ce soit de son gène ou d'un de ses facteurs de transcription.

Régulation protéique de Bik

L'augmentation de l'expression de Bik n'induit pas celle de Mcl-1

Un article de Gillissen et de ses collaborateurs a montré que l'augmentation de l'expression de Bik induisait une augmentation de l'expression de Mcl-1 dans une lignée de cancer de la prostate (DU-145) au travers d'un mécanisme encore inconnu à ce jour. Nous avons donc regardé si ce phénomène se reproduisait dans notre modèle cellulaire. Pour cela, nous avons transfecté un plasmide codant pour Bik dans la lignée HEK-293 et dans deux LMM. Nous avons ensuite regardé le niveau d'expression protéique de Mcl-1 par western blot (Figure R3)

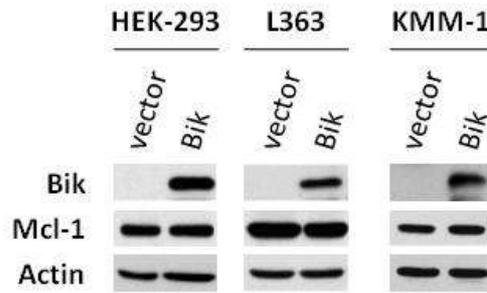


Figure R3 : Profil d'expression protéique de Bik et Mcl-1 après transfection de Bik.

Ce western blot montre que la transfection de Bik n'induit d'augmentation du niveau protéique de Mcl-1 ni dans les LMM ni dans la lignée HEK-293, mettant alors en évidence que le phénomène décrit par Gillissen et ses collaborateurs n'est pas observé dans notre modèle cellulaire.

Stabilisation de Bik par les membres anti-apoptotiques

Nous avons montré que l'augmentation de l'expression de Bcl-2 induit une accumulation de l'expression de Bik et que la diminution de l'expression de Bcl-2 diminue l'expression de Bik suggérant que les complexes Bcl-2/Bik stabilisent cette dernière la protégeant ainsi de la dégradation. Afin de confirmer cela, nous avons rompu les complexes Bcl-2/Bik avec de l'ABT-737 dans trois LMM sensibles (KMS-12-PE, KMS-12-BM, K620) et une LMM résistante à cet agent (XG6) (Figure R4).

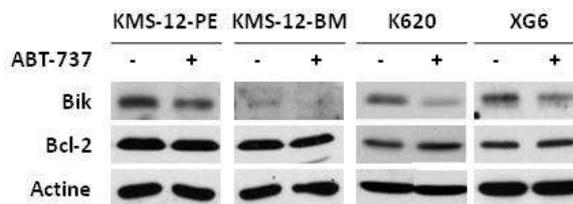


Figure R4 : Profil d'expression protéique de Bik et Bcl-2 sous traitement à l'ABT-737

Nous observons alors que la rupture de ces complexes induit une diminution du niveau d'expression de Bik, visible dès 4 heures après le début du traitement, aussi bien dans des LMM sensibles que résistantes à l'ABT-737.

Au vu des résultats précédents, il est possible que Bcl-xL, comme Bcl-2 stabilise la protéine Bik. La difficulté de transférer les LMM ainsi que l'absence de complexes Bcl-xL/Bik abondants dans les LMM nous a poussé à regarder ces complexes dans une lignée non myélomateuse (HEK-293). Ainsi, nous avons transfecté cette dernière avec un plasmide codant soit pour Bcl-2 soit pour Bcl-xL et regardé si cela induisait une accumulation de Bik (Figure R5).

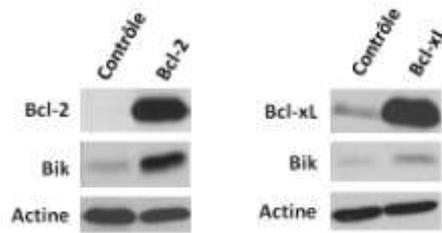


Figure R5 : Expression protéique de Bik après transfection de Bcl-2 ou Bcl-xL dans la lignée HEK 293

Ces résultats indiquent, d'une part, que la surexpression de Bcl-2 induit une augmentation de Bik, comme ce qui a été observé dans les LMM, et, d'autre part, que la surexpression de Bcl-xL induit également une accumulation de Bik, bien que moins importante. Ainsi, les complexes Bcl-xL/Bik comme les complexes Bcl-2/Bik protègent Bik de la dégradation.

La dégradation de la protéine Bik dans les LMM

Plusieurs articles ont montré, dans différents modèles, que la protéine Bik est dégradée par le protéasome. Notre équipe a déjà publié qu'aucune augmentation de Bik n'est observée dans nos LMM suite à un traitement au bortezomib (Gomez-Bougie et al., 2007). Nous avons donc regardé si le MG132, un autre inhibiteur du protéasome, pouvait bloquer la dégradation de Bik et ainsi induire une accumulation de cette protéine dans deux LMM (Figure R6).

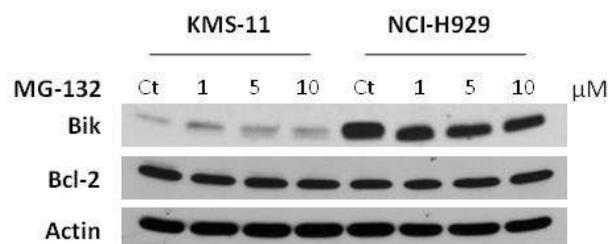


Figure R6 : Profil d'expression protéique de Bik et de Bcl-2 sous traitement au MG132

Les résultats obtenus confirment que, dans nos LMM, Bik n'est pas dégradée par le protéasome car sa dégradation n'est inhibée ni par le bortezomib ni par le MG132.

Ces résultats complémentaires donnent des renseignements intéressants quant à la régulation de l'expression de Bik. Ainsi, un stress génotoxique, ou une levée de l'hyperméthylation de l'ADN, permet d'augmenter l'expression de cette protéine. A *contrario*, les inhibiteurs du protéasome sont inefficaces à protéger Bik de sa dégradation. Enfin, nous avons montré que l'augmentation de l'expression de Bik n'interfère pas dans le niveau d'expression de Mcl-1 contrairement à ce qui a été observé dans une lignée de cancer de la prostate.

Toutes ces données soulignent la complexité de la régulation de l'expression de Bik ainsi que son importance dans l'apoptose des cellules de MM. De ce fait, des agents anticancéreux permettant d'augmenter l'expression de Bik, ou de rompre les complexes que cette protéine forme avec Bcl-2, peuvent avoir un intérêt dans la thérapie contre le MM.

Il est maintenant connu que la résistance des cellules de myélome envers les agents chimiothérapeutiques est liée notamment à la surexpression d'un membre anti-apoptotique, Mcl-1 (Derenne et al., 2002) (Zhang et al., 2002). En effet, des travaux de notre équipe ont montré que la surexpression de cette protéine corrèle avec l'évolution de la maladie (Wuillème-Toumi et al., 2005).

Cependant, Mcl-1 n'est pas le seul membre anti-apoptotique surexprimé et les résultats obtenus précédemment montrent la présence de nombreux complexes Bcl-2/Bik endogènes au sein des cellules de MM. Ces résultats suggèrent donc que de petites molécules mimétiques du domaine BH3 peuvent avoir un intérêt dans la thérapie du MM. En effet, la rupture des complexes Bcl-2/Bik par ces inhibiteurs permettraient la libération de Bik et l'induction de l'apoptose.

C'est pourquoi, dans un second temps, mes travaux ont porté sur l'intérêt de l'ABT-737, une molécule mimétique du domaine BH3 et inhibiteur spécifique de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, dans le traitement du MM.

ARTICLE 2 : L'ABT-737 dans la thérapie d'un groupe de patients atteints d'un Myélome Multiple

Au laboratoire, nous disposons d'un grand nombre de LMM qui sont représentatives de l'hétérogénéité du MM. Nous avons testé la sensibilité de vingt cinq d'entre-elles à l'ABT-737 et montrons que leur sensibilité à cet agent est très hétérogène. En effet, six d'entre-elles sont extrêmement sensibles ($7nM < LD50 < 150nM$) tandis que les autres sont résistantes ou de sensibilité intermédiaire. De plus, l'analyse du niveau d'expression d'ARNm de *Bcl-2* et de *Mcl-1* de ces LMM, par puce affymetrix, montre une corrélation avec leur sensibilité à l'ABT-737. Ainsi, les LMM sensibles sont caractérisées par une forte expression de *Bcl-2* et une faible expression de *Mcl-1*. Bien que l'expression de *Bcl-2* et celle de *Mcl-1* corrélient avec la sensibilité des LMM à l'ABT-737, seul le ratio *Bcl-2/Mcl-1* permet de discriminer les LMM extrêmement sensibles des résistantes, définissant une valeur seuil à 0.48.

De part son hétérogénéité, le MM est subdivisé en sept groupes : CCND1 (CD1 et CD2), MMSET, MAF, « low bone disease », hyperdiploïdes et le groupe proliférant. Nous avons regardé les niveaux d'expression génique de *Bcl-2* et *Mcl-1* pour chaque groupe et avons noté que le ratio *Bcl-2/Mcl-1* est significativement plus élevé dans le groupe des CCND1 que dans les autres ($p=0,07$). De plus, les six LMM sensibles à l'ABT-737 appartiennent à ce groupe et ont un ratio *Bcl-2/Mcl-1* élevé.

Nous avons ensuite interrogé une base de données publique de 414 patients au diagnostic afin de déterminer leur ratio *Bcl-2/Mcl-1*. Les ratios ainsi obtenus pour les patients des groupes CCND1 (CD1 et CD2), « low bone disease » et hyperdiploïdes sont significativement supérieurs à ceux des autres groupes ($p < 0,001$). Il est à noter que les patients qui ont un ratio *Bcl-2/Mcl-1* supérieur au seuil de 0.48, déterminé précédemment, sont retrouvés dans les groupes CD1 (36%), CD2 (13%) et hyperdiploïdes (9%). Cela suggère alors qu'un sous-groupe de patients peut être sensible à l'ABT-737 avec une dose thérapeutique raisonnable.

Pour tester cette hypothèse, nous avons traité sept prélèvements de cellules primaires purifiées de patients et montré que deux d'entre-eux sont extrêmement sensibles avec une

LD50 inférieure à 100nM. Nous montrons également que le ratio Bcl-2/Mcl-1 de ces cellules, déterminé par western blot, corrèle avec leur sensibilité à l'ABT-737 ($p < 0,001$). Tous ces résultats soulignent le fait que le ratio Bcl-2/Mcl-1 est un très bon indicateur de la sensibilité des cellules primaires de LMM à l'ABT-737.

L'analyse de la mort induite par l'ABT-737 sur les LMM sensibles montre un clivage des caspases 3 et 9 dès deux heures ainsi qu'une activation de Bax et de Bak, indiquant que la mort induite par cet agent passe par la voie mitochondriale. La rapidité d'exécution de cette mort cellulaire s'explique par le fait que les LMM sensibles sont dites « sensibilisées à la mort ». En effet, le profil d'expression protéique de ces LMM met en évidence une forte expression des protéines Bim et Puma ainsi qu'une expression homogène de Bax et Bak.

L'ABT-737 est connue pour interagir avec la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-xL et induire la libération des membres pro-apoptotiques qui y étaient complexés (Oltersdorf et al., 2005). Cependant, le mécanisme précis par lequel l'ABT-737 induit la mort des cellules de MM n'est pas connu. Afin de mieux caractériser ce phénomène, nous avons étudié la nature des complexes protéiques présents dans une LMM sensible. Les complexes protéiques endogènes, observés par immuno-précipitation, indiquent que Bcl-2 est complexée avec Bim, Bax, Bak, Puma et Bik tandis que Mcl-1 ou Bcl-xL ne sont complexés qu'avec une petite fraction de Bim et de Puma. Bcl-2 serait alors la protéine anti-apoptotique centrale dans cette LMM. Nous avons, par la suite, comparé les complexes endogènes formés avec Bcl-2 avec ceux présents lors d'un traitement à l'ABT-737. Cette analyse montre que les complexes Bcl-2/Bax et Bcl-2/Bik sont rompus dès une heure de traitement et que, six heures après le début de ce dernier, la plupart des complexes formés avec Bcl-2 sont dissociés. Ces résultats soulignent l'importance des complexes Bcl-2/Bax et Bcl-2/Bik dans la mort induite par l'ABT-737 dans le MM.

Nous avons identifié un groupe de LMM et de cellules primaires de MM extrêmement sensibles à l'ABT-737, démontrant ainsi que l'ABT-737 pourrait être utilisé en agent simple à des doses thérapeutiques raisonnables. De plus, ces cellules sont caractérisées par un ratio Bcl-2/Mcl-1 fort, définissant ce ratio comme un facteur prédictif de la réponse à l'ABT-737. Nous avons également montré que l'ABT-737 induit la mort par apoptose très rapidement *via*

la rupture des complexes Bcl-2/Bax et Bcl-2/Bik dans les cellules sensibles. Enfin, nous avons mis en évidence que les cellules qui présentent les plus forts ratios sont retrouvées parmi les groupes des CCND1 et des hyperdiploïdes, suggérant que ces patients seraient plus sensibles à l'ABT-737 que les patients des autres groupes. Ainsi, l'ABT-737 pourrait avoir un intérêt thérapeutique en agent simple pour les patients qui présentent un fort ratio Bcl-2/Mcl-1.

ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma.

Linda Bodet,^{1,2} Patricia Gomez-Bougie,^{1,2,3} Touzeau Cyrille,¹ Christelle Dousset,^{1,2,3} Hervé Avet-Loiseau,³ Régis Bataille,^{1,2} Philippe Moreau,³ Steven LeGouill,^{1,3} Catherine Pellat-Deceunynck,^{1,2} Martine Amiot^{1,2}

¹ Inserm, UMR_S892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, ² Equipe 10 labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2008, ³ Département d'Hématologie Clinique et Biologique CHU de Nantes, Nantes, France

Corresponding author: Martine Amiot INSERM, UMR_S892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, 8, quai Moncousu Nantes, BP70721 F-44007 France.

Running title: Molecular subsets of myeloma are killed by ABT-737

Key words: Bcl-2, Mcl-1, BH3 mimetic, Multiple myeloma, t(11;14)

Abstract

Multiple myeloma is a plasma cell malignancy that is heterogeneous with respect to its causative molecular abnormalities and the treatment response of patients. Bcl-2 protein family is critical for myeloma cell survival. ABT-737 is a cell-permeant compound that binds to Bcl-2, Bcl-x_L but not to Mcl-1. Using a myeloma cell line collection (n=25) representative of different molecular translocations, we showed that ABT-737 effectively kills a subset of cell lines (n=6) with a LD₅₀ ranging from 7±0.4 nM to 150±7.5 nM. Of interest, all sensitive cell lines harbored a t(11;14). We demonstrated that ABT-737-sensitive and ABT-737-resistant cell lines could be differentiated by the Bcl-2/Mcl-1 gene expression ratio. A screen of a public expression database of myeloma patients indicates that the Bcl-2/Mcl-1 ratio of t(11;14) and hyperdiploid patients was significantly higher than in all other groups (p<.001). ABT-737 first induced the disruption of Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes, followed by the disruption of Bcl-2 heterodimers with Bak, Puma and Bim. Altogether, the identification of a subset of cell lines and primary cells effectively killed by ABT-737 alone supported the evaluation of ABT-263, an orally active counterpart to ABT-737, for the treatment of t(11;14) and hyperdiploid groups of myeloma harboring a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile.

Introduction

Members of the Bcl-2 family are critical regulators of apoptosis, and interactions between prosurvival and proapoptotic members may determine cell fate. Structural and functional characteristics divide these members into three subgroups: multidomain antiapoptotic members (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W and A1), multidomain proapoptotic members (Bax and Bak) and BH3-only members (Bim, Bid, Bad, Bik, Puma and Noxa).¹ Antiapoptotic molecules antagonize cell death by sequestering either the BH3-only proteins or multidomain proapoptotic members. The presence of Bax or Bak is required to mediate mitochondrial damage.² Bax and Bak must be activated to oligomerize and form pores in the mitochondrial outer membrane, allowing the release of cytochrome c to the cytosol.

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy that is heterogeneous with respect to its causative molecular abnormalities and the treatment response of patients. Numerous studies have shown that chromosomal abnormalities including full or partial deletion of chromosomes 13 or 17, 1q21 amplification, recurrent 14q32 translocations or hyperdiploidy are associated with patient outcome.^{3,4} Analyses of the global gene expression profile of patients have led to the molecular classification of MM patients into different disease subtypes.⁵ MM remains an incurable disease that requires new therapeutic approaches. The elevated expression of antiapoptotic proteins was observed in MM cells and provides a block in apoptosis associated with resistance to therapy. In particular, Mcl-1 is overexpressed in MM, thus explaining its major role in myeloma survival and resistance to chemotherapy.⁶⁻⁸ In addition to Mcl-1 overexpression, gene and protein expression profiles indicate that Bcl-2 is overexpressed in a subset of MM in both cell lines and patients.⁹

Recently, we demonstrated that a large collection of human myeloma cell lines (HMCLs) harbors the heterogeneity found in patients which is mainly reflected by molecular translocations.¹⁰

ABT-737 is a cell-permeant compound that selectively binds with high affinity to Bcl-2 and Bcl-x_L but not to Mcl-1 and antagonizes their antiapoptotic functions.¹¹ It also exhibits single-agent activity against a variety of cell lines and primary clinical samples, particularly in chronic lymphocytic leukemia (CLL).¹¹⁻¹² Thus, the aim of this study was to investigate the efficiency of ABT-737 on HMCLs (n=25) with different genetic backgrounds (e.g., *MMSET/FGFR3* translocation, *c-MAF* or *MAFB* translocation and *CCND1* translocation) and its relationship with the expression of the antiapoptotic proteins. We found that ABT-737 was highly effective in *CCND1* subset of HMCLs and identified potential predictors of ABT-737 sensitivity in these HMCLs.

MATERIAL AND METHODS

Cells and culture conditions

The XG-1, XG-2, XG-5, XG-6, XG-7, NAN-1, NAN-3, NAN-7 and BCN HMCLs were derived in our laboratories from primary myeloma cells cultured in the presence of 5% fetal calf serum (FCS) and 3 ng/ml recombinant (r) IL-6 as previously described.¹³ The KMS-11, KMS-12-PE, KMS-12-BM and KMM-1 HMCLs were kindly provided by Dr. Otsuki (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan); JJN-3, by Dr. Van Riet (Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium); JIM-3, by Dr. MacLennan (Birmingham Medical School, Birmingham, UK); Karpas-620, by Dr. Karpas (Cambridge Clinical School, Cambridge UK); and MM.1S, by Dr. S. Rosen (Northwestern University, Chicago, USA). The AMO1, LP-1, L-363, NCI-H929, U-266, OPM-2 and SKMM-2 HMCLs were from DSMZ (Braunschweig, Germany), and the RPMI-8226 HMCL from the ATTC (USA). All HMCLs derived in our laboratory were cultured in the presence of r-IL-6.

Immunoblotting

Cells (5×10^6) were resuspended in 150 μ l lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% TritonX100) containing 2 mM PMSF and 2 μ g/ml aprotinin. After 40 min on ice, the lysates were cleared by centrifugation at 12,000 g for 30 min at 4°C. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and analyzed following standard procedures. Signals were detected using an ECL kit (Pierce, Rockford, IL, USA). The following antibodies were used: Bcl-2 (Dako), caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology), Bik (N-19, Santa Cruz Biotechnology), caspase-9 (clone F-7, Santa Cruz Biotechnology), Mcl-1 (S19, Santa Cruz Biotechnology), PUMA (Calbiochem, Merck), Bim (Chemicon), Bcl-x_L (BD Transduction Laboratories), Bax (Immunotech, Beckman Coulter), Bak (Calbiochem, Merck) and actin (Chemicon).

Immunoprecipitation

Cells (25×10^6) were lysed in 1% CHAPS containing lysis buffer. Whole cell lysates were obtained, pre-cleared with Protein A-sepharose and incubated overnight with 5 μg of the specific antibody. Immunocomplexes were captured with either protein A-sepharose or protein G-agarose. The beads were pelleted, washed three times and boiled in SDS sample buffer. The presence of immunocomplexes was determined by western blot analysis.

Assays for the detection of apoptotic cells and Bax/Bak activation

Cell death was assessed either by Annexin-V-FITC or Apo-2.7-PE staining (Beckman Coulter, France). The flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

For Bax and Bak immunofluorescence staining, 5×10^5 cells were fixed using the Intra Prep Permeabilisation Reagent Kit (Immunotech, Marseilles, France) following the manufacturer's recommendations. The cells were incubated with anti-Bax (clone 6A7) mAb, anti-Bak (BD Biosciences, Pharmigen) or IgG1 isotype control for 20 min. The cells were then incubated with anti-mouse- or anti-rabbit-FITC antibodies (Immunotech) for 20 min, washed once in PBS and resuspended in PBS-1% formaldehyde. The flow cytometry analysis was performed as above.

Primary myeloma cells

Blood or bone marrow samples from MM were obtained either from the Department of Hematology at University Hospital of Nantes or from untreated patients during standard procedures in Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) after informed consent. Plasma cells were obtained after gradient density centrifugation using Ficoll Hypaque and

purification with CD138-immunomagnetic beads. In all cases, purity of the plasma cells was higher than 90%, as assessed by morphology.

Gene expression profiling

The gene expression data were normalized with the MAS5 algorithm. The expression levels of the *Bcl-2* and *Mcl-1* genes in the HMCLs were obtained from the RAGE database (<http://rage.montp.inserm.fr/>).¹⁴ *Bcl-2*, *Mcl-1* and *Bcl-x_L* probes (203685_at, 200797_s_at and 212312_at, respectively) were selected based on the major variation in expression level. Affymetrix data from a cohort of 414 untreated patients from the Arkansas Cancer Research Center was also analyzed for *Bcl-2* and *Mcl-1* gene expression using the Amazonia database (<http://amazonia.transcriptome.eu/>).¹⁵

Statistical analysis

Statistical comparisons were done with the Fisher, the Wilcoxon rank sum or the Spearman tests.

Results

The CCND1 subset of HMCLs with a Bcl-2^{High}/Mcl-1^{Low} gene and protein expression profile is highly sensitive to ABT-737.

Expression of Bcl-2 antiapoptotic family members was assessed by immunoblotting in a collection of 25 HMCLs. Although Mcl-1 was always expressed, strong levels of Bcl-2 and Bcl-x_L were expressed in a subset of cell lines (Figure 1), prompting an evaluation of the in vitro cytotoxic effects of the Bcl-2 antagonist ABT-737, which targets these two proteins. The HMCLs were incubated with different concentrations of ABT-737, ranging from 5 nM to 20 μM, for 48 hours. Cell viability was assessed by Apo2.7 staining. The cytotoxic effects of ABT-737 were extremely heterogeneous within this collection of HMCLs, with an LD₅₀ ranging >3 logs (0.007 to 20 μM) (Figure 2A). ABT-737 was highly effective against six cell lines, with LD₅₀ values ranging from 7±0.4 nM to 150±15 nM. In contrast, the other HMCLs had either an intermediate (n=5) or resistant (n=14) response to ABT-737, with LD₅₀ values ranging from 2 μM to 4 μM or > 7.5 μM, respectively (Table 1). Notably, the LD₅₀ was not reached for five cell lines at a 20 μM dose.

Given the variation in ABT-737 sensitivity and the previously shown importance of the relative expression of Bcl-2 family antiapoptotic proteins in predicting ABT-737 sensitivity,¹⁶⁻¹⁸ we investigated whether *Bcl-2* and/or *Mcl-1* gene expression, as analyzed by Affymetrix gene expression profiling, could predict ABT-737 sensitivity. High expression of *Bcl-2* was inversely correlated with LD₅₀ (p=.026; Rho: -0.444, Spearman test), which is in agreement with the strong affinity of ABT-737 for Bcl-2 (Figure 1B). *Mcl-1* gene expression levels, however, were directly correlated with LD₅₀ (p<.001; Rho: 0.754, Spearman test), which is consistent with the thought that Mcl-1 is involved in ABT-737 resistance (Figure 1B).¹⁷ Thus, a strong correlation was also found between LD₅₀ and the *Bcl-2/Mcl-1* ratio (p<.001;Rho:-0.812, Spearman test). Of note, no correlation was found between *Bcl-x_L* gene

expression and LD₅₀ (p=.125; Rho:0.316, Spearman test) (Supplemental data). Although the expression levels of *Bcl-2* and *Mcl-1* and the *Bcl-2/Mcl-1* ratio could predict ABT-737 sensitivity, only the *Bcl-2/Mcl-1* ratio could discriminate highly ABT-737-sensitive from ABT-737-resistant HMCLs (Fisher test, p<.001); a cut-off value of 0.48 could discriminate the sensitive from resistant HMCLs with no overlapping value between any of the HMCLs (Figure 1B). An analysis of the *Bcl-2/Mcl-1* ratios with respect to the different genetic backgrounds of these HMCLs (*MMSET* translocation, *c-MAF* or *MAFB* translocation, *CCND1* translocation or others) revealed that the *Bcl-2/Mcl-1* ratio of the *CCND1* HMCLs was significantly higher than that of all other groups (Wilcoxon test, p=.007) (Figure 2C). A further analysis of the relationship between ABT-737 sensitivity and the different HMCL subsets revealed that six out of the eight t(11;14) HMCLs were sensitive, whereas none of the other subgroups contained sensitive cell lines (Fisher test, p<.001) (Figure 2D). Altogether, these results demonstrated that six *CCND1* HMCLs (SKMM-2, NAN-7, XG-5, Karpas-620, KMS-12-PE and KMS-12-BM) displayed a very high sensitivity to ABT-737 that was associated with a *Bcl-2/Mcl-1* value >0.48 (Table 1, Figure 2B). Similarly, protein expression analysis showed that these lines have a specific *Bcl-2*^{High}/*Mcl-1*^{Low} profile (Figure 1).

ABT-737 is also very efficient in a subset of primary myeloma cells

Currently, MM patients are usually classified into seven groups based on the molecular classification defined by Zhan *et al.*⁵ The publicly available Affymetrix gene expression levels of 414 newly diagnosed MM patients were used to determine the *Bcl-2/Mcl-1* ratio for each patient in each of the different molecular groups, which were CD-1, CD-2, hyperdiploid, low bone disease, proliferation, MAF and *MMSET* (Figure 3A). Notably, the CD-1 and CD-2 molecular subtypes include all MM patients with t(11;14) translocations. Thus, the *Bcl-2/Mcl-1* ratios of the CD-1 (median: 0.36; range: 0.06–0.71), CD-2 (median: 0.28; range: 0.05–

0.68), low bone disease (median: 0.22; range: 0.05–1.12) and hyperdiploid (median: 0.24; range: 0.04–0.79) patients were significantly higher than those of all other patients (Wilcoxon test $p < .001$). Those patients presenting values higher than the cut-off defined above belonged mainly to the CD-1 (36%), CD-2 (13%) and hyperdiploid (9%) groups, whereas none belonged to either the proliferation or MMSET groups (Figure 3A). Altogether, these results suggested that a subset of primary myeloma cells might be effectively responsive to ABT-737 treatment at a reasonable therapeutic dose. To test this hypothesis, seven primary purified CD138+ myeloma samples were analyzed both for ABT-737 sensitivity and for the Bcl-2 and Mcl-1 protein profile. The LD₅₀ values indicated that two of the seven primary myeloma cells were highly sensitive to low nanomolar concentrations of ABT-737 (Table 2). Notably, highly sensitive patients with an LD₅₀ ≤ 100nM (patient 2 and 3) presented the highest protein expression ratio of Bcl-2/Mcl-1 (Figure 3B). We found a strong correlation between ABT-737 sensitivity (% of cell death at 100nM) and Bcl-2/Mcl-1 ratio ($p < .001$; Rho:0.99, Spearman test) (Figure 3C). Thus, the Bcl-2/Mcl-1 protein expression profile was also a strong indicator of ABT-737 sensitivity in primary myeloma cells.

ABT-737 triggered a rapid induction of cell death due to the release of either multidomain or BH3-only proapoptotic proteins from Bcl-2.

To characterize cell death induced by ABT-737 in myeloma cells, a kinetic study of caspase activation was performed in a sensitive t(11;14) HMCL. The cleavage of caspase 9 and 3 was detected after a two-hour treatment, indicating that apoptosis induction involved the intrinsic pathway and was accompanied by both Bax and Bak activation (Figure 4). In parallel, cell death associated annexin V was detected after four hours. Letai and colleagues proposed that early apoptosis induced by ABT-737 is the consequence of cells primed for death, which involves the sequestration of pro-death members by Bcl-2.^{16,19-20} Therefore, the expression of

proapoptotic proteins in sensitive t(11;14) HMCLs was examined. In all sensitive cell lines, the expression of Bim and Puma, which are activator BH3-only proteins, was high, whereas the expression of Bik, a sensitizer BH3-only protein, was heterogeneous (Figure 5A). In addition, uniform expression of Bax and Bak was found in all sensitive HMCLs (Figure 5A). To evaluate the relative abundances of endogenous complexes, pro- and antiapoptotic immunoprecipitates were analyzed in KMS12-PE cells. Bcl-2 was complexed with Bim, Bax, Bak, Puma and Bik. A small fraction of the Bim and Puma cellular pools was also found complexed with either Mcl-1 or Bcl-x_L (Figure 5B). Altogether, these data suggested that multidomain or BH3-only proapoptotic proteins bound to Bcl-2 to prime myeloma cells for ABT-737 killing. To determine which proapoptotic protein was first displaced from Bcl-2 by ABT-737, KMS-12-PE cells were treated with ABT-737 for a short period of time (one hour), and the dynamic of the Bcl-2 complexes were analyzed by immunoprecipitation. An examination of Bcl-2 heterodimers after a one-hour ABT-737 treatment showed a decrease in both Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes (Figure 5C). Consistent with the decrease of these complexes, there was an increase of Bax and Bik in the supernatant. After a longer ABT-737 exposure (six hours), all the Bcl-2 heterodimers were disrupted, and only a small amount of Bim remained bound to Bcl-2 (Figure 5C). The early displacement of both Bax and Bik from Bcl-2 can be explained by their lower affinity for Bcl-2 in comparison with that of Puma and Bim, as previously determined in different studies.^{19,21} The displacement of Bax can lead to its oligomerization and activation (Figure 4B), whereas Bik can probably act through further displacement of Bim and Puma from Bcl-2, according to its role as a sensitizer BH3-only molecule.

Discussion

MM initially responds to chemotherapy, but relapse and chemoresistance always occurs. Therefore, improvement in long-term survival will depend on novel therapeutic approaches. BH3 mimetics represent a novel class of drugs able to promote apoptosis, and ABT-737 is the prototypic drug in this class. ABT-737 has monotherapeutic toxicity against leukemia and lymphoma malignancies. Indeed, primary cells from patients with chronic lymphocytic leukemia¹², acute myeloid leukemia²², acute lymphocytic leukemia²³ and B lymphoma²⁴ have been shown to be extremely sensitive to ABT-737. In addition to these pathologies, ABT-737 efficiency was investigated in myeloma cells and demonstrated substantial antimyeloma activity²⁵⁻²⁷, although its efficacy was proven only using higher concentrations. In the present study, we provided the first evidence that a subset of HMCLs is extremely sensitive to ABT-737 in a nanomolar concentration range. MM appears very heterogeneous with respect to ABT-737 sensitivity, with LD₅₀s ranging over >3 logs (0.007 to 20 μM). ABT-737 sensitivity was strongly correlated with either high *Bcl-2* gene expression or low *Mcl-1* expression, but no correlation was found with *Bcl-x_L*. Furthermore, the *Bcl-2/Mcl-1* ratio as determined by gene expression profiling allowed a perfect discrimination between sensitive and resistant HMCLs, with a cut-off value of 0.48. In a similar manner, an analysis of the relative expression of Bcl-2 and Mcl-1 by immunoblotting appears to be a very good indicator of ABT-737 sensitivity. These findings are in agreement with previous studies in different cell types, showing that indicators of sensitivity correlated with high levels of Bcl-2 and low levels of Mcl-1.^{16-18,22,28} Finally, HMCLs expressing a high Bcl-2/Mcl-1 ratio were all found in the t(11;14) group, and all sensitive HMCLs in our study belonged to this molecular group. The identification of this molecular subset of HMCLs that are highly sensitive to ABT-737 was only possible through the analysis of our large collection of HMCLs, which covers most

of the known myeloma heterogeneity. Although high Bcl-2 expression was found in the t(11;14) group, there has been no documented explanation supporting this finding. Of note, myeloma cells do not usually have a translocation that directly leads to increased Bcl-2 expression. Our analysis in a limited number of primary myeloma cells also highlighted the existence of a subset of MM that robustly responded to very low concentrations of ABT-737 (nanomolar range). These results confirmed and extended the study of Trudel *et al*²⁷ showing that four out of fifteen MM patients were sensitive to treatment with 0.25 μ M ABT-737. Finally, our immunoblotting analysis confirmed that the relative expression of Bcl-2 to Mcl-1 in the lysates of purified primary myeloma is a strong indicator of ABT-737 sensitivity in the seven samples analyzed ($p < 0.001$).

Using *Bcl-2/Mcl-1* ratio as an indicator of ABT-737 sensitivity, we evaluated a proportion of patients susceptible to ABT-737 in the different molecular groups of patient defined by Zhan *et al*⁵ and showed that patients harboring MMSET or MAF translocations will not be eligible for ABT-737 therapy, which is consistent with our study of HMCLs. Analysis of the hyperdiploid group of patients, which was not represented in the group of 25 HMCLs, indicated that a subset of these patients could be efficiently targeted by ABT-737. Notably, hyperdiploid patients represent half of myeloma patients. Finally, the highest proportion of patients able to respond to ABT-737 were found in the CD-1 (CD20⁻) and CD-2 (CD20⁺) molecular subtypes, both characterized by a t(11;14). While t(11;14) MM has been considered so far to be a favorable MM prognostic based on clinical response, a recent study indicated that CD-1 and CD-2 have very different clinical responses.²⁹ While the CD-1 group is characterized by the highest level of complete response, the duration of complete response is as short as that of the proliferation group. In contrast, CD-2 has the longest duration of complete response among all molecular entities. Because the CD-1 group of patients relapse very quickly, the development of new therapeutic approaches is important. Altogether, our

data suggest that a proportion of patients in the CD-1, CD-2 and hyperdiploid groups expressed a Bcl-2^{high}/ Mcl-1^{low} profile, which is compatible with the use of ABT-737 as a single agent.

To better understand the apoptotic events induced by ABT-737 in myeloma cells, we investigated both the expression of prodeath proteins and endogenous heterodimers between pro- and antiapoptotic proteins. While the Bim, Puma, Bax and Bak proteins appeared to be uniformly expressed among t(11;14) HMCLs, Bik was either highly expressed or absent. No correlation between ABT-737 sensitivity and Bik expression, however, can be made. We also investigated whether prodeath proteins were indeed bound by Bcl-2. Co-immunoprecipitation experiments in KMS-12-PE cells demonstrated that the different prodeath proteins, either BH3-only or multidomain proteins, were all sequestered by Bcl-2. To determine the molecular events initiated by ABT-737, any changes in the abundance of the Bcl-2 heterodimers after a short exposure to ABT-737 were analyzed. ABT-737 first displaced Bik and Bax from Bcl-2, and following a longer exposure, the majority of Bcl-2 heterodimers were also disrupted. After six hours of treatment, only the Bcl-2/Bim complexes were still detected, probably due to both the abundance and the high affinity of these complexes. The low affinity of both Bik and Bax for Bcl-2 in comparison with the affinity of Bim and Puma can probably explain why the Bcl-2/Bik and Bcl-2/Bax heterodimers were first disrupted by ABT-737. Because Bim displays a higher affinity for Bcl-2, Bcl-2/Bim should be the most difficult complex to be disrupted by a BH3-mimetic, which was confirmed by our observation that only Bcl-2/Bim complexes were still detectable after a six-hour ABT-737 exposure. The disruption of Bcl-2/Bax heterodimerization could directly promote the permeabilization of the outer mitochondrial membrane. In contrast, Bik, a sensitizer BH3-only protein, should be involved in the release of direct activators like Bim and possibly Puma from Bcl-2. The involvement of ABT-737 in the displacement of Bax was also reported in lymphoma cells in

which the level of Bcl-2/Bax complexes was also correlated with ABT-737 response, suggesting that Bcl-2 can be primed with Bax in these cells.¹⁶ Other strong evidence of Bax involvement in ABT-737-induced apoptosis was provided by Konopleva *et al*²² in acute myeloid leukemia cells, who demonstrated that ABT-737 induced the disruption of the Bcl-2/Bax complex and activated the intrinsic apoptotic pathway *via* a Bim-independent process. In agreement with that study, we showed that Bax displacement was the initiator event, but our data also suggested that a later-occurring Bim and Puma displacement was involved, likely amplifying the apoptotic process. Altogether, our mechanistic studies indicate that the expression ratio of Bcl-2/Mcl-1 governs, in large part, the sensitivity to ABT-737, a sensitivity that can be additionally modulated by the nature and the abundance of the prodeath proteins complexed with Bcl-2. Nevertheless, the multiplicity of endogenous complexes present in a cell makes the sensitivity of a particular cell difficult to define accurately and precisely.

Although the combination of several drugs usually appears to be the most efficient chemotherapeutic regimen, the identification of a subset of MM (Bcl-2^{high}/ Mcl-1^{low}) that can be effectively targeted by ABT-737 as a single agent supported the evaluation of ABT-263, an orally active counterpart to ABT-737, for the treatment of CD-1, CD-2 and hyperdiploid MM harboring a Bcl-2^{high}/ Mcl-1^{low} profile. With respect to the ABT-737 response in a xenograft MM model, two previous independent studies showed very different results: ABT-737 either efficiently suppressed My5 tumor growth²⁷ or inefficiently altered OPM-2 tumor growth (OPM-2 is a MMSET, resistant HMCL in our study).³⁰ These results highlighted the variability in the MM response to ABT-737. Clinical trials with ABT-263 as a single agent have shown substantial single agent therapeutic activity, particularly in CLL, and encourage clinical trials for other pathologies.^{31,32} Altogether, the major progress made in the

stratification of MM patients should be now used in concert with new therapeutic approaches to propose targeted and individualized therapies.

Acknowledgements

This work was supported by Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée 2008). Linda Bodet was supported by CYMATH and the French Society of Hematology. The authors wish to thank Dr E Rouffiac and Dr R Humerickhouse from Abbott Laboratories for providing us ABT-737.

Author contribution

LB, PG performed the experiments, contributed to the design of experiments and helped write the paper.

CT, CD helped analyze the data.

PM, HAL, SLG provided myeloma samples.

RB helped write the paper.

CPD, MA contributed to the design of experiments and helped analyze the data and write the paper.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1-Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutical potential. *Current Opin Immunol.* 2007;19:488-96.
- 2-Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001; 292:727-730.
- 3-Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 106:296-303.
- 4-Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 2009; 23(12):2210-21.
- 5-Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:2020-8.

- 6-Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*. 2002; 100:194-9.
- 7-Zhang B, Gojo I, Fenton RG. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*. 2002;99:1885-93.
- 8-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):1248-52.
- 9-Bodet L, Ménoret E, Descamps G, et al. BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2010; in press
- 10-Moreaux J, Klein B, Bataille R et al. Human myeloma cell lines (HMCLs) reflect the molecular diversity of primary myeloma cells. submitted
- 11-Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005; 435:677-81.
- 12-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.
- 13-Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*. 1994; 83:3654-3663.
- 14-Rème T, Hose D, De Vos J, et al. A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9:16-28.
- 15-Le Carrouer T, Assou S, Tondeur S, et al. Amazonia!: An Online Resource to Google and Visualize Public Human whole Genome Expression Data. *TOBIOIJ*. 2010; 4:5-10.
- 16-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; 2:171-85.
- 17-Van Delft MF, Wei AH, Mason KD, 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.
- 18-Tahir SK, Yang X, Anderson MG, et al. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res*. 2007; 67:1176-83.

- 19-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; 5:351-65.
- 20-Chonghaile TN, Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene*. 2009; 27:149-57.
- 21-Chen L, Willis SN, Wei A, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell*. 2005; 17:393-403.
- 22-Konopleva M, Contractor R, Tsao T, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006; 10:375-88.
- 23-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.
- 24-Vogler M, Dinsdale D, Sun XM et al. A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15:820-30.
- 25-Chauhan D, Velankar M, Brahmandam M, et al. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2007; 26:2374-80.
- 26-Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, 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.
- 27-Trudel S, Stewart AK, Li Z, et al. The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin Cancer Res*. 2007;13:621-9.
- 28-Olejniczak ET, Van Sant C, Anderson MG, et al. Integrative genomic analysis of small-cell lung carcinoma reveals correlates of sensitivity to bcl-2 antagonists and uncovers novel chromosomal gains. *Mol Cancer Res*. 2007; 5:331-9.
- 29-Nair B, Van Rhee F, Shaughnessy JD Jr, et al. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood*. 2010; 115:4168-73.
- 30-Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008; 68:3421-8.

- 31-Roberts AW, Brown J, Seymour JF, et al. An ongoing phase & study of ABT-263; pharmacokinetics, safety and anti-tumor activity in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112: abstract 3177.
- 32-Wilson WH, Czuczman MS, LaCasce AS, et al. A phase 1 study evaluating the safety, pharmacokinetics, and efficacy of ABT-263 in subjects with refractory or relapsed lymphoid malignancies. *J Clin Oncol*. 2008; 26: abstract 8511.

Table 1. ABT-737 sensitivity correlates with CCND1 translocation in HMCLs.

HMCL	LD₅₀ (nM)	Translocation	Target genes
SKMM2	7 ± 0.4	t(11;14)	<i>CCND1</i>
NAN-7	15 ± 3	t(11;14)	<i>CCND1</i>
XG-5	40 ± 12	t(11;14)	<i>CCND1</i>
Karpas-620	60 ± 13	t(11;14)	<i>CCND1</i>
KMS-12-PE	60 ± 17	t(11;14)	<i>CCND1</i>
KMS-12-BM	150 ± 7.5	t(11;14)	<i>CCND1</i>
JJN-3	2000 ± 315	t(14;16)	<i>c-MAF</i>
NAN-1	2000 ± 540	t(14;16)	<i>c-MAF</i>
KMS-11	2000 ± 660	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>
XG-2	3000 ± 700	t(12;14)	unknown
RPMI-8226	4000 ± 760	t(14;16)	<i>c-MAF</i>
XG-6	5800 ± 112	t(16;22)	<i>c-MAF</i>
OPM-2	6000 ± 910	t(4;14)	<i>MMSET</i>
NCI-H929	7200 ± 840	t(4 ;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>
L-363	7000 ± 620	t(20;22)	<i>MAFB</i>
BCN	8000 ± 566	t(14 ;16)	<i>c-MafMAF</i>
NAN-3	9200 ± 780	t(4;14)	<i>MMSET</i>
LP-1	10000 ± 1400	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>
AMO-1	13500 ± 1600	t(12;14)	unknown
KMM-1	20000 ± 740	t(6 ;14)	<i>CCND3</i>
XG-1	> 20000	t(11;14)	<i>CCND1</i>
U-266	> 20000	t(11;14)	<i>CCND1</i>
MM.1S	> 20000	t(14;16)	<i>c-MAF</i>
JIM-3	> 20000	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>
XG-7	> 20000	t(4;14)	<i>MMSET</i>

Table 2: Sensitivity of primary myeloma cells to ABT-737.

	Age	Disease status	LD ₅₀ (nM)	% of cell death ABT-737 (100nM)
Patient 1	64	Diagnosis	>5000	8%
Patient 2	80	Diagnosis	<100	62%
Patient 3	78	Diagnosis	<20	90%
Patient 4	69	Diagnosis	500	39%
Patient 5	61	Diagnosis	>5000	12%
Patient 6	47	Diagnosis	250	44%
Patient 7	71	Relapse	>5000	28%

CD138+ purified myeloma cells were treated with various doses of ABT-737 during a 24-hour period. Cell viability was assessed, and LD₅₀ was determined for each patient. In parallel, for each patient, we indicated the percentage of cell death upon ABT-737 treatment (100nM, 24 hours).

Legend to Figures

Figure 1. A HMCL subgroup highly expresses Bcl-2 and Bcl-xL. Immunoblot analysis of 25 HMCL lysates (70 μ g of protein) with the indicated antibodies. Actin was used as a loading control.

Figure 2. All ABT-737 sensitive HMCLs harbor a t(11;14) and could be identified by their Bcl-2/Mcl-1 ratio. (A) HMCLs (n=25) were cultured with increasing doses of ABT-737 for 48 hours then stained with Apo2.7 for flow cytometry analysis. The means of three independent experiments are shown. LD₅₀ (lethal dose) is determined for each cell line (ABT-737 concentrations where 50% of cells are stained with Apo2.7). (B) Analysis of Bcl-2 and Mcl-1 expression in function of ABT-737 sensitivity (LD₅₀) of HMCLs. Bcl-2 and Mcl-1 expression levels were defined by Affymetrix microarray and plotted against LD₅₀. The spearman's rank correlation coefficient is indicated (C and D) Comparisons of Bcl-2/Mcl-1 gene expression ratio (C) and ABT-737 LD₅₀ (D) in the different molecular groups of HMCLs.

Figure 3. ABT-737 is efficient against a subset of primary myeloma cells (A) Affymetrix gene expression profiles of purified myeloma cells from 414 newly diagnosed patients, publicly available from the Arkansas Cancer Research Center. The ratio of Bcl-2 to Mcl-1 is indicated for each patient in the different molecular groups classified according to Zhan *et al.*⁵ (B) Western blot analysis of Bcl-2 and Mcl-1 protein expression in CD138+ purified primary MM cells. A sensitive HMCL (KMS-12-PE), and a resistant one (KMM-1) as well as a CLL sample were included in the panel as controls. Actin was used as a loading control. (C) Analysis of primary myeloma cell sensitivity to ABT-737 (100nM) in function of Bcl-2/Mcl-1 protein ratio. The spearman's rank correlation coefficient is indicated.

Figure 4. ABT-737 induced apoptosis through the mitochondrial pathway. (A) KMS-12-PE cells treated with 40 nM ABT-737 for the indicated times. Cell death was analyzed by annexin-V staining. Cleavage of caspases 3 and 9 correlated with cell death. (B) Bax and Bak staining in KMS-12-PE cells either treated or not with ABT-737. One representative experiment out of three is shown.

Figure 5. BH3-only and multidomain proapoptotic proteins sequestered by Bcl-2 were displaced by ABT-737. (A) Immunoblot analysis of the indicated proteins (70 µg). Actin was used as a loading control. (B) Immunoprecipitation from KMS-12-PE cells using the indicated antibodies. The immunoprecipitates were analyzed for the presence of antiapoptotic, BH3-only proteins or multidomain proapoptotic proteins. * corresponds to the immunoglobulin light chain. (C) Bcl-2 immunoprecipitation from KMS-12-PE cells treated or not with 40 nM ABT-737 for 1 or 6 hours. The immunoprecipitates were analyzed for the presence for the indicated proteins by immunoblotting.

Figure 2

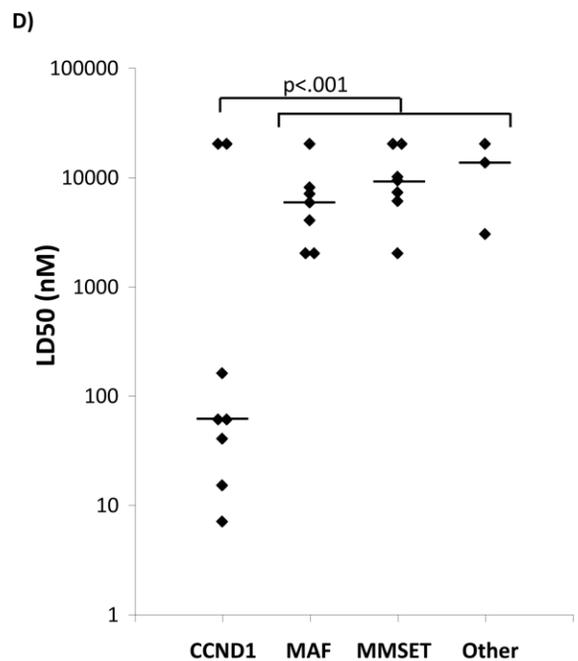
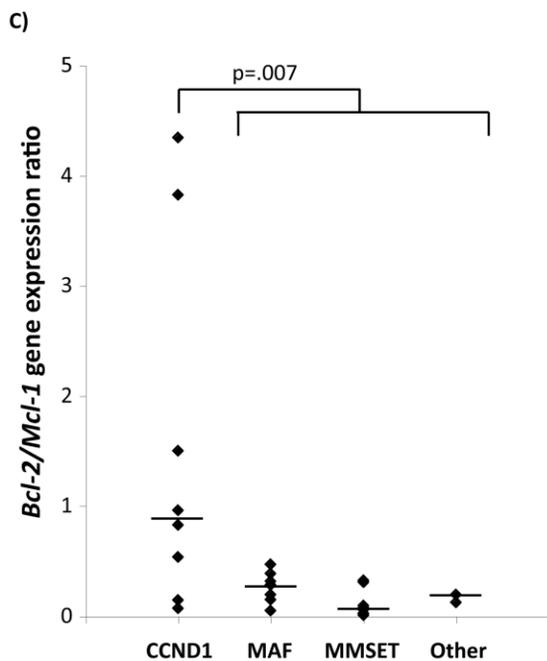
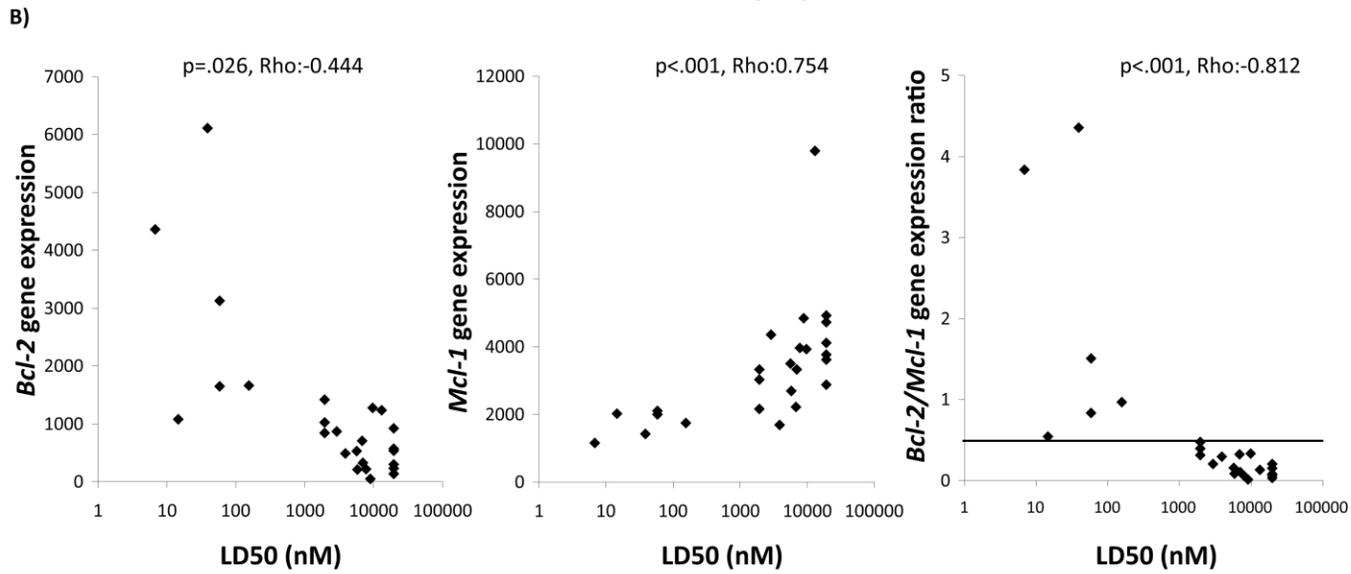
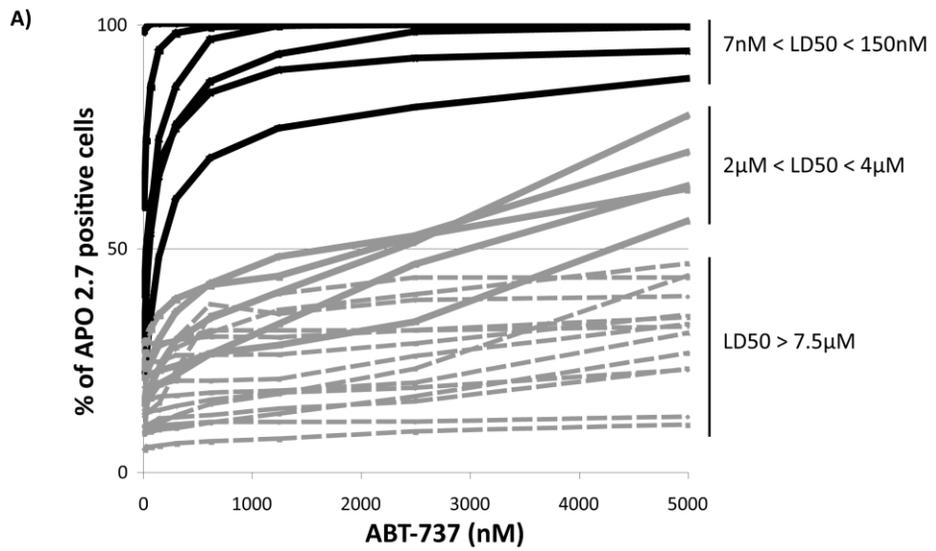
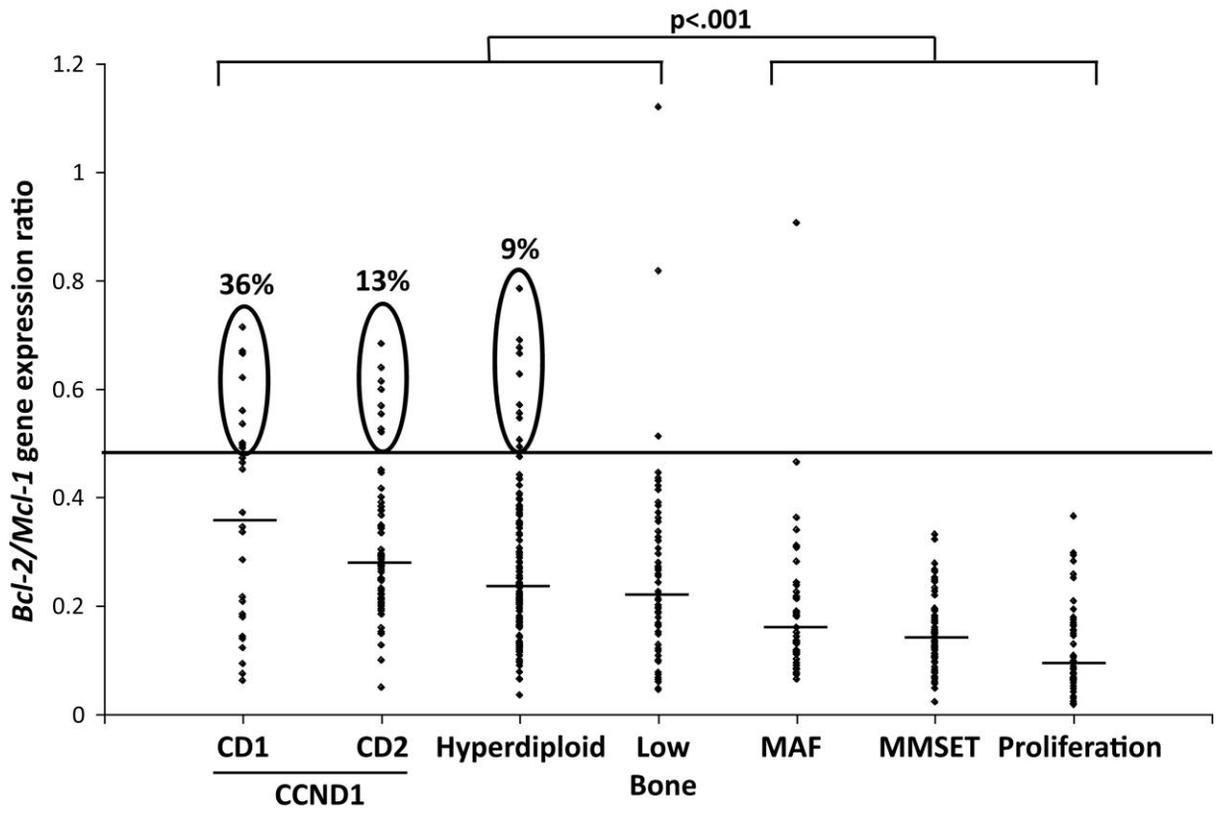
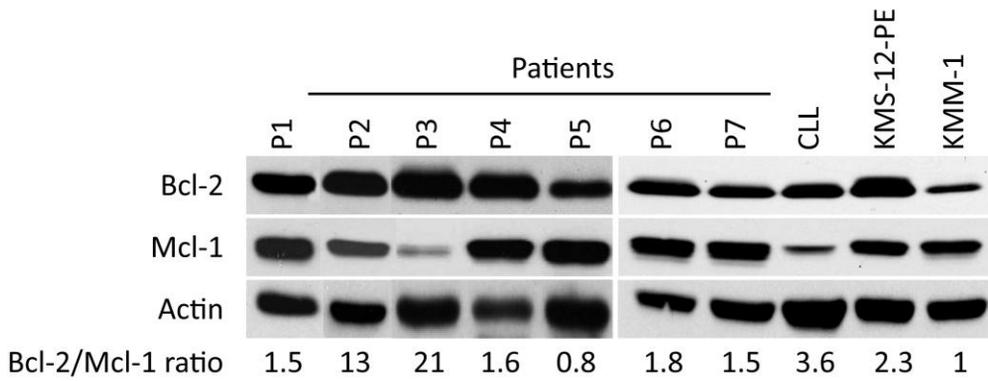


Figure 3

A)



B)



C)

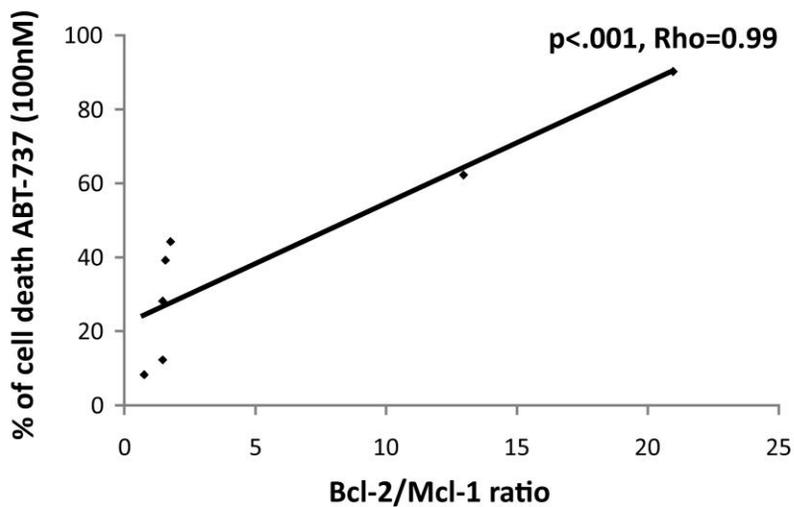
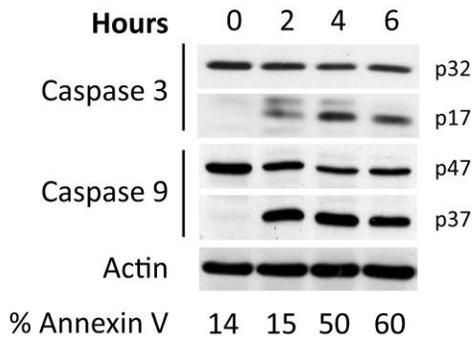


Figure 4

A)



B)

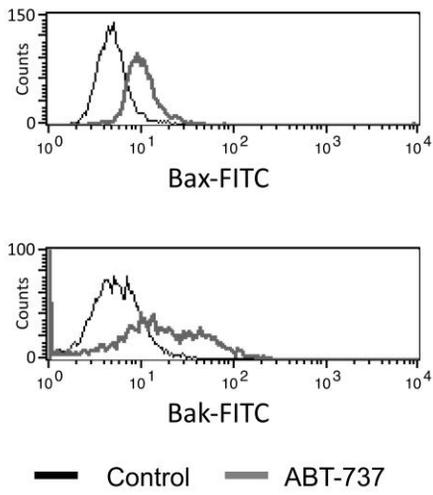


Figure 5

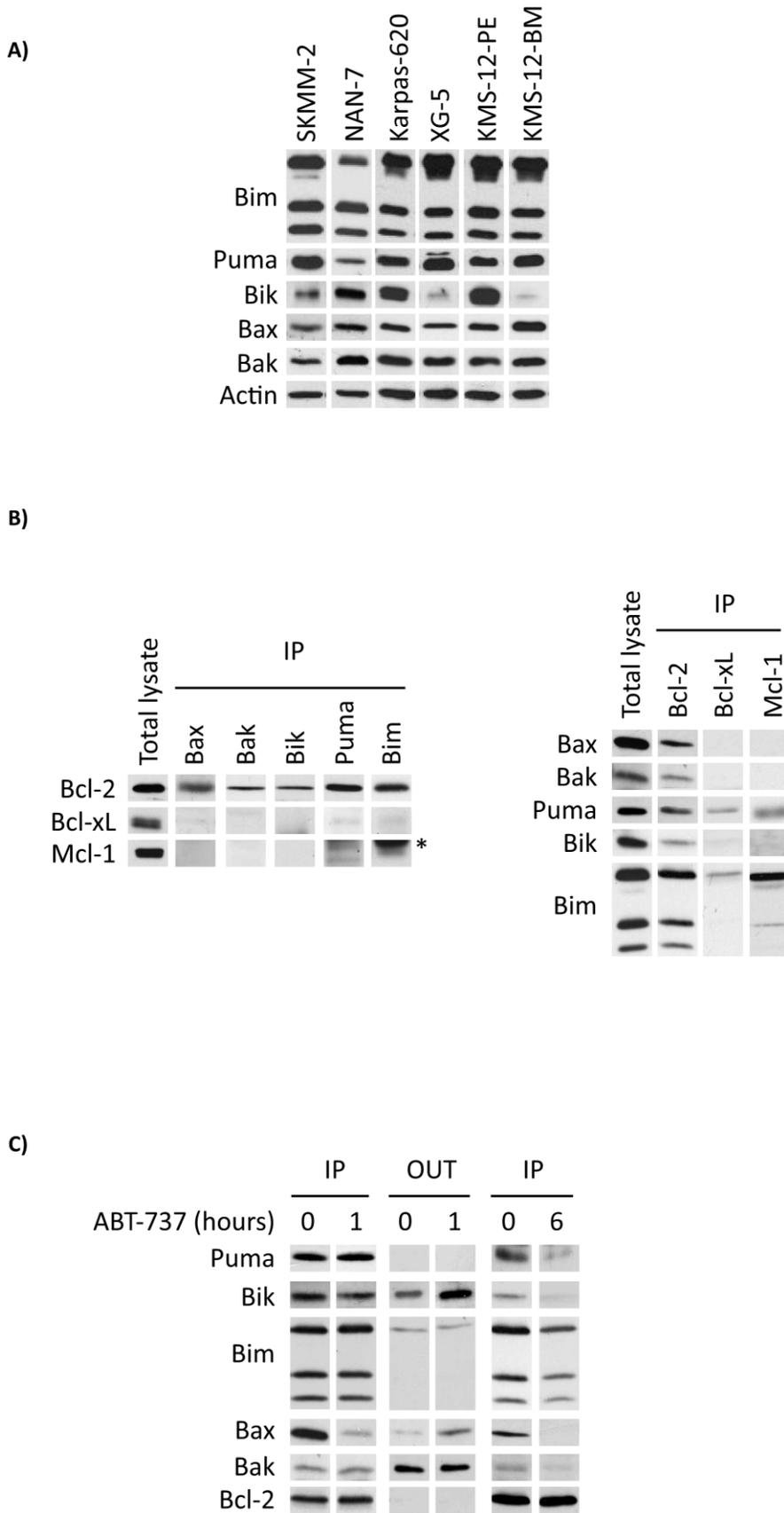


Figure S1

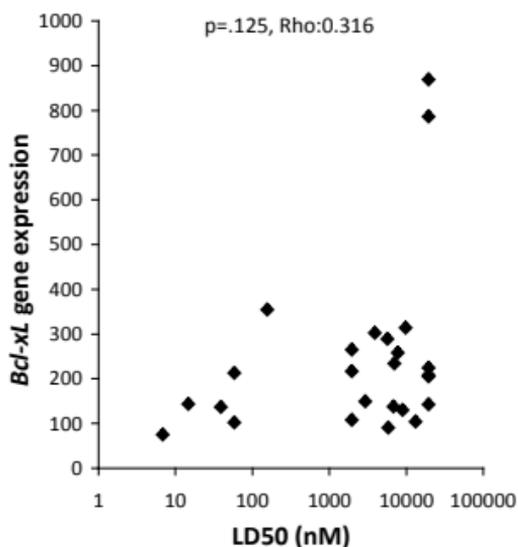


Fig S1: Bcl-xL is not correlated to ABT-737 sensitivity. Analysis of Bcl-xL expression in function of ABT-737 sensitivity (LD50) of HMCLs. Bcl-xL expression levels were defined by Affymetrix microarray and plotted against LD50. The spearman's rank correlation coefficient is indicated.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

La sensibilité des cellules à l'ABT-737 est définie par le ratio Bcl-2/Mcl-1. Nous nous sommes également intéressés à savoir si une corrélation inverse existait entre l'expression de ces deux protéines. Les résultats présentés dans l'article soulignent notamment la possibilité de traiter certains groupes de patients avec l'ABT-737 en agent simple. Afin de savoir si certaines combinaisons de traitement permettraient de sensibiliser les cellules à l'ABT-737, nous en avons testé quelques-unes sur des LMM résistantes. Bien que ces données ne soient pas encore publiées, ces résultats soulignent d'autant plus l'intérêt que pourrait avoir l'ABT-737 dans le traitement du MM.

Une corrélation inverse entre Bcl-2 et Mcl-1

Dans l'article précédent, nous mettons en évidence une corrélation entre l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et la sensibilité des cellules à l'ABT-737 ainsi qu'une corrélation inverse entre l'expression de l'ARNm de Mcl-1 et cette sensibilité. Ainsi, il est possible que les LMM soient caractérisées par une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Bcl-2 et celle de Mcl-1. Pour cela nous avons réalisé un test de Spearman ($p=0.01$; $Rho : -0.527$) dont la représentation graphique est présentée en figure R7.

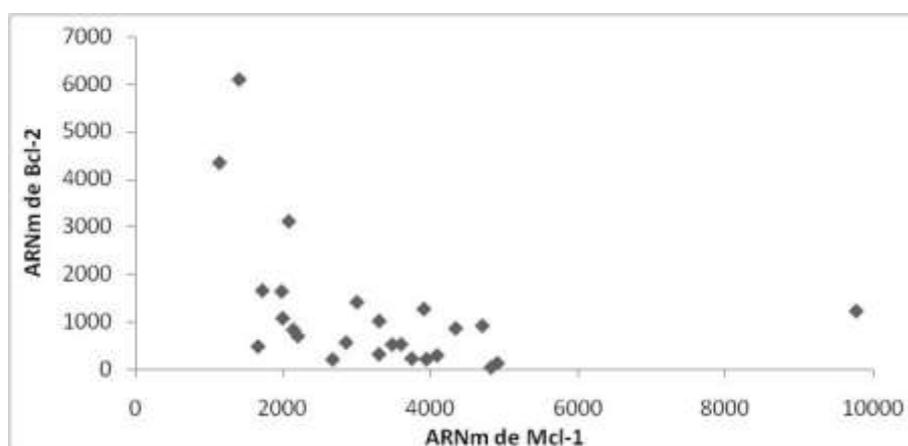


Figure R7 : Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et de Mcl-1 des LMM

La représentation graphique ainsi que le test de Spearman mettent en avant une corrélation inverse entre l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et celle de Mcl-1.

Sensibiliser à l'ABT-737 en augmentant la dégradation de Mcl-1

De nombreux articles ont montré que, pour être dégradée, la protéine Mcl-1 est ubiquitinylée afin d'être adressée au protéasome. Une protéine, USP9X, hydrolyse les chaînes de poly-ubiquitine présents sur Mcl-1 dans le but de prolonger son temps de demi-vie. L'inhibition d'USP9X pourrait alors permettre de diminuer le niveau d'expression de Mcl-1 et de sensibiliser les cellules résistantes à la mort induite par l'ABT-737. Pour cela nous avons transfecté une LMM résistante à l'ABT-737 avec un siRNA dirigé contre USP9X et avons quantifié la mort induite par l'ABT-737 (Figure R8).

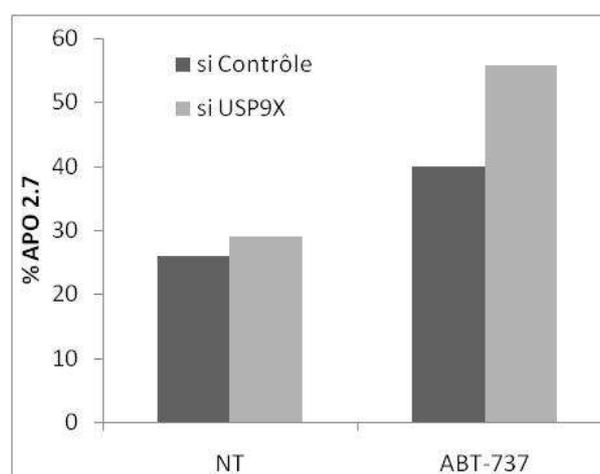


Figure R8 : La diminution de l'expression d'USP9X sensibilise la lignée KMM-1 à l'ABT-737 (24 heures, 5 μ M).

Ces résultats montrent que l'augmentation de la dégradation de Mcl-1 au travers de la diminution de l'expression d'USP9X permet de sensibiliser les cellules à l'ABT-737.

Une autre façon d'induire la dégradation de Mcl-1 est de provoquer son clivage par une augmentation de l'expression de Noxa. En effet, la formation des complexes Mcl-1/Noxa induisent le clivage de Mcl-1. Il a été décrit, dans la littérature que le bortezomib provoquait une augmentation de l'expression de Noxa dans les LMM sensibles. Ainsi, nous avons traité

deux LMM résistantes à l'ABT-737 et un prélèvement de patient avec une combinaison associant le bortezomib (PS341) avec l'ABT-737 (Figure R9).

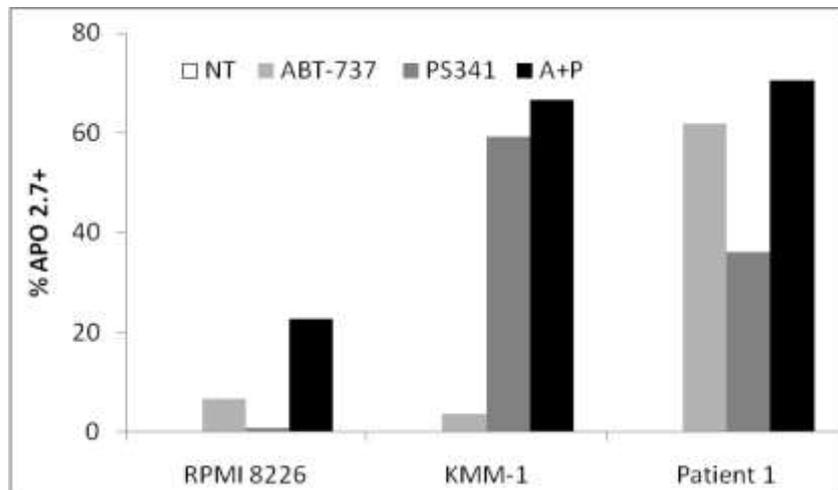


Figure R9 : Effet de l'association ABT-737 avec du PS341

(RPMI 8226 : 500nM ABT-737 et 5nM PS341 ; KMM-1 : 500nM ABT-737 et 10nM PS341 ; Patient 1 : 100nM ABT-737 et 5nM PS341).

Ces résultats montrent que le bortezomib induit une sensibilisation des cellules myélomateuses à l'ABT-737 avec une action synergique dans les deux LMM testées.

Discussion et perspectives

Partie 1 : La protéine Bik dans le MM

La thématique de notre équipe est centrée autour des thérapies ciblées du MM. Il ressort, des nombreux travaux du laboratoire, que Mcl-1 occupe une place importante dans la résistance des cellules à l'apoptose. De plus, deux autres protéines membres de cette famille, Bim et Noxa, ont également été décrites comme intervenant dans la sensibilité des LMM aux agents anticancéreux. Bik, quant à elle, est une autre protéine de cette famille dont l'expression est hétérogène, aussi bien dans les LMM que dans les cellules primaires de MM. Son rôle dans l'apoptose des cellules myélomateuses ainsi que sa régulation n'étaient, cependant, que peu décrits dans la littérature.

Nous avons mis en évidence que l'expression de cette protéine est finement régulée tant au niveau transcriptionnel que protéique. Qui plus est, nous avons montré qu'une augmentation de l'expression de Bik induit la mort cellulaire et sensibilise les cellules de MM à l'apoptose, notamment lors d'un stress oxydatif. De ce fait, les agents permettant l'augmentation de l'expression de Bik pourraient avoir un intérêt dans le traitement de cette pathologie.

Régulation de l'expression de Bik dans le MM

L'expression très hétérogène de Bik dans le MM, ainsi que son implication dans l'apoptose des cellules de MM, nous a mené à étudier la régulation de cette protéine afin de mieux comprendre cette particularité. Plusieurs facteurs de transcriptions ont été décrits comme pouvant réguler l'expression de Bik. Un de ces facteurs de transcription, bien que son implication reste controversée, est p53.

En effet, les deux premières études relatant l'éventuelle implication de p53 ont été menées sur des cellules surexprimant la protéine E1A qui est une protéine fortement apoptogène. E1A, en empêchant la dégradation de p53, permet l'accumulation de ce facteur de transcription et l'induction d'une mort cellulaire dépendante de p53 (Vousden, 2000). La première de ces deux études, utilise des cellules primaires rénales de rat transformées par E1A et *tsp53*. Dans ce modèle, les auteurs ont montré que l'expression de Bik était identique quel que soit le statut de p53, suggérant ainsi que la transcription de Bik est complètement

indépendante de ce facteur de transcription (Han et al., 1996). La seconde étude menée, quant à elle, dans une lignée de carcinome de poumon, va à l'encontre de la première du fait de l'observation d'une augmentation de l'ARNm de Bik lors d'un stress induit par E1A. Ces résultats indiquent que Bik semble être une cible transcriptionnelle de p53, bien qu'aucune stimulation directe du promoteur de Bik par p53 n'ait été détectée (Mathai et al., 2002).

Enfin, une autre étude, menée sur le cancer du sein, montre que l'expression de Bik est stimulée par p53 suite à un traitement au fulvestrant (antagoniste des récepteurs aux œstrogènes). Ce traitement ne permettant pas la liaison de p53 à l'ADN, les auteurs proposent que l'expression de Bik dans le cancer du sein soit régulée au niveau de l'ARNm par un mécanisme dépendant d'un rôle non transcriptionnel de p53 (Hur et al., 2006).

Nous avons montré que, dans notre modèle, il n'y a pas de corrélation entre l'expression de Bik et le statut de p53. Cependant, nous avons également observé une augmentation de l'expression protéique de Bik suite à un stress dépendant de p53 induit par le melphalan (Figure R1). Ces résultats suggèrent alors que p53 semble augmenter l'expression de Bik sans pour autant être nécessaire à sa transcription.

Trois questions se posent donc. L'induction de Bik est-elle vraiment dépendante de p53 sous melphalan ? Ceci pourrait être vérifié *via* une inhibition de p53, notamment par siRNA, concomitante avec ce traitement. Cette induction est-elle liée au rôle transcriptionnel de p53 ? Un test luciférase utilisant le promoteur du gène de Bik pourrait être utilisé pour répondre à cette question. Enfin, si p53 induit Bik par un autre mécanisme que transcriptionnel, quel peut être ce dernier ? Pour cela, des mutations ponctuelles de p53 permettraient de connaître précisément le domaine de p53 impliqué dans ce mécanisme, permettant ainsi de peut-être identifier des partenaires de p53, ce qui constituerait un point de départ pour comprendre ce phénomène.

Récemment, un nouveau facteur de transcription, impliqué dans la transcription du gène de Bik, a été mis en évidence. Il s'agit de TEF pour « Thyrotroph Embryonic Factor ». Cette protéine induit, d'après la littérature, la transcription de *Bik* par liaison directe avec le promoteur du gène, et ce, quelque soit le statut p53 des cellules (Ritchie et al., 2009).

L'étude de l'implication de TEF dans la transcription du gène de Bik dans nos LMM confirme la présence d'un lien direct entre ce facteur de transcription et le promoteur du gène

Bik. De plus, nous avons démontré que ce facteur de transcription est essentiel à l'expression de *Bik*. Malgré cette dépendance, la seule présence de ce facteur de transcription ne semble pas suffisante pour la transcription de ce gène. En effet, certaines LMM testées expriment l'ARNm de TEF mais pas l'ARNm de *Bik*. A cela, plusieurs hypothèses sont possibles. En effet, il est envisageable que la protéine TEF ne soit pas traduite dans ces cellules, ceci pouvant être vérifié par western blot. Si ce facteur de transcription est exprimé, il est possible qu'il soit inhibé par une protéine régulatrice.

L'absence de transcription de *Bik* observée dans certaines LMM et cellules primaires de MM peut être liée à un autre phénomène qu'à un défaut d'expression protéique de TEF. Il est alors possible que l'inhibition ait lieu au niveau transcriptionnel. En effet, la transcription d'un gène fait intervenir un grand nombre de partenaires essentiels au bon déroulement de ce phénomène. Ainsi, il est possible que les cellules n'exprimant pas de *Bik* aient une déficience en un ou plusieurs de ces partenaires primordiaux. Il faudrait, de ce fait, identifier ces protéines afin de voir si l'absence de l'expression de *Bik* est liée à la perte de l'une d'entre-elles.

Plusieurs facteurs de transcription ont été décrits dans la littérature comme pouvant réguler la transcription du gène de *Bik*. C'est notamment le cas de GATA-1, Sp1, NfκB ou Oct-1. En effet, des sites de liaison de ces facteurs ont été retrouvés dans la région promotrice du gène de *Bik* (Verma et al., 2000). Parmi ces facteurs de transcription décrits, l'implication de NfκB dans la transcription du gène de *Bik* semble contre-intuitive. De fait, ce facteur de transcription est connu pour avoir un rôle clé dans la stimulation des voies de survie et de prolifération des tumeurs à cellules B et notamment du MM (Demchenko et Kuehl, 2010). Son implication dans la transcription du gène de *Bik*, et donc dans l'induction de mort, apparaît contradictoire. Il serait intéressant de savoir si les facteurs de transcription proposés par Verma et ses collaborateurs, sont effectivement impliqués dans la transcription de *Bik* dans le MM et sous quelles conditions ils induisent *Bik*.

Enfin, il est possible que le gène de *Bik* soit délété ou que sa transcription soit inhibée par hyperméthylation de l'ADN.

En effet, la délétion du gène de *Bik* est retrouvée dans le carcinome rénal (Sturm et al., 2006), le cancer du sein et le cancer colorectal (Castells et al., 2000). Il est alors possible, au vu de l'instabilité chromosomique des cellules de MM, que certaines LMM aient acquis une telle délétion. Il est à noter que la lignée XG7 n'exprime ni l'ARNm de *Bik* ni celui de *Bid*. Le gène

codant pour cette dernière est présent sur le même bras de chromosome que *Bik* (22q11.1 pour *Bid* et 22q13.31 pour *Bik*). L'absence de ces deux protéines pourrait être la conséquence d'une délétion d'une partie de ce chromosome. Cependant, seule une recherche précise de la délétion du gène de *Bik* par FISH (« Fluorescent in situ hybridization») permettrait d'éclaircir ce point. En effet, si l'absence de l'expression de *Bik* est un facteur de résistance à certains agents anticancéreux, sa recherche permettrait d'améliorer les traitements proposés aux patients.

L'un des autres mécanismes pouvant bloquer la transcription d'un gène est l'hyperméthylation de son ADN. En effet, la méthylation de l'ADN induit l'obstruction du promoteur ce qui empêche la transcription du gène. On dit alors de ce gène qu'il est « mis sous silence » (Geiman et Robertson, 2002). C'est en 2004 que Pompeia et ses collaborateurs ont mis en évidence une hyperméthylation de *Bik*. En effet, la Zébularine (inhibiteur de la méthylation de l'ADN) induit une augmentation de la transcription de ce gène dans une LMM. D'autres hyperméthylations de *Bik* ont également été retrouvées dans d'autres types de cancers tels que le cancer du poumon, le cancer du rein et celui de la prostate *via* l'utilisation de 5-aza-2'-déoxycytidine (5'Aza), un autre inhibiteur de la méthylation (Dai et al., 2006) (Sturm et al., 2006). Dans notre modèle, le 5'Aza induit une augmentation de l'expression protéique et de l'ARNm de *Bik* (Figure R2), sans augmentation de l'ARNm de Bcl-2 ou de TEF (données non montrées), démontrant ainsi que l'expression de *Bik* peut être liée à une hyperméthylation de son gène ou de celui d'un de ses facteurs de transcription dans le MM, à l'exception de TEF. Pour cela, il faudrait réaliser un test COBRA (« Combined bisulfite and restriction assay ») afin de connaître précisément le statut de méthylation du gène de *Bik* dans ces LMM.

Nous avons donc montré que la protéine *Bik* est finement régulée au niveau transcriptionnel. Cependant, l'expression d'une protéine est régie non seulement par sa transcription mais également par sa dégradation. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence que *Bik* était dégradée par le protéasome dans différents modèles cellulaires *via* l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ce dernier (Zhu et al., 2005b). Dans cet article, les auteurs mettent en avant que le bortézomib induit l'accumulation de *Bik* dans des lignées de cancer colorectal. Cependant, cette accumulation est beaucoup moins évidente dans d'autres modèles cellulaires présentés dans ce même article, soulignant le fait que ce mécanisme ne semble pas être aussi ubiquitaire que décrit.

Dans notre équipe, nous avons montré que le bortézomib ne permet pas l'accumulation de Bik dans les LMM (Gomez-Bougie et al., 2007). D'autres résultats, non publiés, nous indiquent que le MG132 (inhibiteur du protéasome) ne permet pas non plus l'accumulation de cette protéine (Figure R6). De ce fait, nous pouvons nous demander quel autre mécanisme peut être impliqué dans la dégradation de Bik. Plusieurs articles ont montré la présence de sites de clivage par les caspases dans la séquence protéique de Bik. Ainsi, il serait intéressant, pour élucider ce point, d'observer l'expression de Bik en présence d'un pan-inhibiteur de caspases (par exemple le Z-VAD-fmk) afin de déterminer s'il y a une accumulation de Bik en condition basale où les caspases peuvent être constitutivement actives. De plus, l'utilisation de cet inhibiteur pourrait également permettre de voir si la diminution de l'expression protéique de Bik, observée suite à un traitement à l'ABT-737, est liée à une dégradation par les caspases (suite à un clivage par exemple) (Figure R4).

Bik dans la famille de Bcl-2 : quid de ses relations ?

La famille de Bcl-2 est constituée de membres pro- et anti-apoptotiques. Dans une cellule, l'apoptose est induite lorsque l'équilibre entre ces membres est rompu en faveur des membres pro-apoptotiques. Les membres à domaine « BH3 seul », tels que Bik interagissent avec les membres anti-apoptotiques afin de former des complexes. Pendant longtemps, ces interactions ont été considérées comme aléatoires. C'est à partir de 2005 que l'affinité des membres pro-apoptotiques pour les membres anti-apoptotiques a été étudiée.

En effet, Chen et ses collaborateurs ont quantifié l'affinité des peptides BH3 de huit protéines pro-apoptotiques pour cinq protéines anti-apoptotiques, mettant ainsi en évidence des affinités très hétérogènes (Chen et al., 2005). Il se dégage de cette étude une forte affinité de Bik pour Bcl-xL ($IC_{50}=43nM$), une affinité moindre pour Bcl-2 ($IC_{50}=850nM$) et enfin une faible affinité pour Mcl-1 ($IC_{50}=1700nM$). Une seconde étude, réalisée par Certo et ses collaborateurs, montre que Bik est principalement complexée avec Bcl-xL ($K_D=10nM$) puis avec Mcl-1 ($K_D=109nM$) et enfin avec Bcl-2 ($K_D=151nM$) (Certo et al., 2006).

Dans notre modèle d'étude, nous avons mis en évidence de nombreux complexes Bcl-2/Bik sans qu'aucun complexe Bik/Mcl-1 n'ait été observé. Les complexes que Bik forme avec Bcl-xL ont été observés dans une LMM, XG-2, et ces complexes étaient plus abondants que ceux formés avec Bcl-2 (données non montrées). Les complexes de Bik que nous avons trouvé dans

les LMM corroborent ceux décrits dans la littérature en termes de partenaires de Bik. Cependant, l'intensité des complexes observés dans les LMM corrèlent plus ou moins avec l'affinité décrite dans la littérature de Bik avec Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1 en fonction des LMM étudiées. Ainsi, les résultats d'immunoprécipitations obtenus dans la LMM XG-2 corrèlent avec les données publiées de Chen et de ses collaborateurs. *A contrario*, dans la LMM KMS-12-PE, Bik est retrouvée complexée uniquement à Bcl-2, ne corroborant avec aucune des deux études citées précédemment.

Il est à noter que ces études utilisent des peptides des domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques et des protéines anti-apoptotiques dont le domaine C-terminal a été clivé. Il paraît donc évident que ces peptides, ou protéines clivées, n'aient pas la même conformation tridimensionnelle que les protéines natives ; ceci pouvant interférer dans les interactions protéine-protéine. Une étude de 2005 montrait, par exemple, que la protéine Mcl-1 délétée de son domaine transmembranaire (présent en C-terminal) joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, soulignant le fait que chaque domaine est important et participe à la fonction de la protéine.

Il est également possible que le niveau d'expression de chaque protéine au sein de la cellule puisse modifier les complexes formés entre les membres pro- et anti-apoptotiques. Ainsi, considérons l'effet de la surexpression d'un membre pro-apoptotique tel que Bim sur l'équilibre des complexes endogènes. La surexpression de cette protéine va probablement perturber les complexes initialement formés avec Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Ainsi, une partie de Bim surexprimée pourrait se complexer à Bcl-2 empêchant les autres complexes de se former avec cette dernière. Les membres pro-apoptotiques qui étaient potentiellement liés à Bcl-2 tels que Bid, Bad, Puma, Bmf ou encore Bik iraient alors se complexer avec un autre membre anti-apoptotique ou bien se retrouver sous forme libre. De ce fait, il est probable que le contexte cellulaire ainsi que le niveau d'expression de chaque membre de la famille de Bcl-2 peuvent modifier la nature des complexes endogènes.

Plusieurs études ont montré un lien entre l'expression de Bik et celle d'autres membres de la famille de Bcl-2. Ainsi, Strum et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans des lignées de carcinome rénal, que la perte de l'expression de Bik coïncidait avec la perte de Bim, Noxa et Bad mais pas de Puma (Sturm et al., 2006). Dans notre modèle, aucune corrélation entre

l'expression de Bik et celle de Bim, Noxa ou encore de Bad n'est observée, contrairement à ce qui a été décrit dans d'autres modèles.

De plus, Gillissen et ses collaborateurs ont observé une augmentation de Mcl-1 consécutive à l'augmentation de l'expression de Bik dans la lignée de cancer de la prostate ; cependant, le mécanisme impliqué demeure encore inconnu (Gillissen et al., 2007). Dans nos LMM, aucune augmentation de Mcl-1 consécutive à une augmentation de Bik n'est observée (Figure R3). L'ensemble de ces résultats s'accordent à dire que l'expression, la régulation des protéines membres de la famille de Bcl-2 comme la nature des complexes endogènes semblent être variables en fonction du modèle cellulaire étudié.

Nous avons cependant trouvé une forte corrélation entre l'expression de Bik et celle de Bcl-2, aussi bien dans les LMM que dans les cellules primaires de patients, ce qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature.

De plus, nous avons montré que la surexpression de Bcl-2 induit une accumulation de Bik visible en western blot mais également que la diminution de Bcl-2 a pour conséquence la diminution de l'expression protéique de Bik, suggérant que Bcl-2 puisse réguler de façon protéique l'expression de Bik. En outre, nous avons observé une diminution de l'expression de Bik suite à la rupture des complexes Bcl-2/Bik, lors d'un traitement à l'ABT-737, soulignant alors que l'action de Bcl-2 sur l'expression protéique de Bik est liée à une interaction physique entre ces deux protéines (Figure R4).

Ces données sont appuyées par la littérature, dans laquelle, il a été montré que certaines protéines membres de la famille de Bcl-2 peuvent réguler leur expression par les interactions entre pro- et anti-apoptotiques. C'est le cas des couples Mcl-1/Bim et Bcl-2/Bim. En effet, notre équipe a montré que l'interaction entre Mcl-1 et Bim permet à ces protéines de se protéger mutuellement de la dégradation par le protéasome car lorsqu'une de ces deux protéines est éteinte par ARN interférence, la seconde est poly-ubiquitinylée pour être dégradée par le protéasome (Wuillème-Toumi et al., 2007). Un second article de Jorgensen traite d'un mécanisme similaire (Jorgensen et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence une corrélation entre l'expression de Bim et celle de Bcl-2. Ainsi, les cellules qui sont Bim-/- expriment moins de Bcl-2 que les cellules exprimant Bim. De plus, la surexpression de Bcl-2 induit une augmentation de l'expression de Bim au niveau protéique. Ceci souligne le

fait que nous avons mis en évidence, pour la première fois, que Bcl-2 stabilise la protéine Bik par interaction directe avec celle-ci.

L'étude de Jorgensen et de ses collaborateurs soulève un point pour le moins curieux. En effet, dans cette étude, ils montrent qu'une surexpression de Bcl-2 induit une augmentation de l'ARNm de Bim (Jorgensen et al., 2007). Comment Bcl-2 peut-il réguler de près ou de loin la transcription de ce gène ? Bcl-2 n'a pas de rôle de facteur de transcription connu, cependant, elle a déjà été décrite comme induisant la dégradation d'I κ B α , un inhibiteur de NF κ B, intervenant ainsi dans la régulation de la transcription de certains gènes (de Moissac et al., 1998). De plus, nous avons pu observer, par fractionnement cellulaire, une localisation nucléaire d'une faible proportion de Bcl-2 dans une LMM (données non montrées). Ainsi, il serait alors intéressant d'étudier le rôle de la fraction nucléaire de Bcl-2 dans le MM, et de voir également si cette protéine influence l'expression de l'ARNm de Bik, en plus de stabiliser cette protéine.

La protéine Bik est également connue pour interagir avec Bcl-xL, nous avons d'ailleurs observé de tels complexes dans la LMM XG-2 (données non montrées). Dans le premier article, nous avons montré que Bcl-2 stabilise Bik au niveau protéique par interaction avec celle-ci. Il serait alors intéressant de savoir si Bcl-xL possède également cette propriété. Comme nous le montrons sur la figure R5, la surexpression de Bcl-xL, dans la lignée HEK-293, induit une légère augmentation de Bik. Ces résultats laissent sous-entendre qu'il est possible que la formation de complexes avec les membres anti-apoptotiques quels qu'ils soient stabilisent Bik. La question se pose alors pour BHRF1 et E1B, qui sont des protéines anti-apoptotiques connues pour interagir avec Bik.

C. Intérêt de Bik dans la thérapie du MM

Nos travaux ont mis en évidence l'implication de Bik dans la mort des cellules de MM, notamment lors d'un stress oxydatif. En effet, la diminution spécifique de l'expression de Bik, par siRNA, induit une résistance au stress oxydatif, tandis que la surexpression de cette protéine, par la transfection d'un plasmide, sensibilise les cellules à ce stress. De plus, une étude de 2002 a montré que l'augmentation de l'expression de Bik par la doxorubicine induit la

mort des cellules de MM si celles-ci expriment de fort niveaux de Bcl-2, soulignant l'importance de cette protéine dans l'apoptose des cellules myélomateuses (Panaretakis et al., 2002).

Il serait maintenant intéressant de poursuivre l'étude de Bik sur des prélèvements de patients. En effet, si une corrélation existe entre l'expression de Bik des cellules primaires de MM et leur sensibilité à différents stress oxydatifs, à la doxorubicine, au melphalan et au 5'Aza cela pourrait permettre de proposer aux patients une thérapie individualisée basée sur la recherche de l'expression de cette protéine.

Ainsi, on peut envisager qu'une augmentation de l'expression de Bik par l'utilisation de la Zébularine, du 5'Aza, du melphalan ou de la doxorubicine permette d'induire la mort cellulaire ou, tout du moins, de sensibiliser les cellules à la mort induite par des agents anticancéreux. C'est pourquoi, il serait intéressant de tester ces agents en combinaison avec ceux utilisés actuellement dans la thérapie du MM.

Enfin, la présence de nombreux complexes Bik/Bcl-2 présents dans les LMM permet de s'interroger sur l'intérêt de molécules mimétiques du domaine BH3 des membres pro-apoptotiques tels que l'ABT-737 dans cette pathologie, que ce soit en agent simple ou en association avec un agent permettant l'augmentation de l'expression de Bik.

Partie 2 :L'ABT-737 dans le traitement du MM

Implication des membres de la famille de Bcl-2 dans la réponse à l'ABT-737

Dans la littérature, deux hypothèses se confrontent quant au mécanisme d'action de l'ABT-737. En effet, pour Konopleva et ses collaborateurs, c'est la rupture des complexes Bcl-2/Bax qui est responsable de la mort cellulaire par perméabilisation de la membrane mitochondriale du fait de la libération et de l'activation de Bax (Konopleva et al., 2006)(Konopleva et al., 2006). Dans le modèle de Del Gaizo Moore, l'ABT-737 rompt les complexes Bcl-2/Bim. Bim ainsi libérée va alors induire l'activation de Bax et permettre la formation de pores à la membrane mitochondriale (Del Gaizo Moore et al., 2007).

Dans notre modèle cellulaire, nous avons montré que l'ABT-737 rompt, dès une heure de traitement, les complexes endogènes Bcl-2/Bax et Bcl-2/Bik et que les complexes formés entre Bcl-2 et Bim sont les derniers à être dissociés. Ainsi, il semblerait que les cellules de MM fonctionnent sur un modèle Bcl-2/Bax qui serait amplifié par l'intervention des protéines à domaine « BH3 seul » *via* la rupture des complexes Bcl-2/Bik. En effet, la libération de Bax permettrait à cette protéine de cibler la mitochondrie et d'y induire l'apoptose par la formation de pores tandis que Bik, qui est une protéine sensibilisatrice, autoriserait la libération d'autres molécules pro-apoptotiques à multidomaines encore séquestrées par les protéines anti-apoptotiques. Il serait donc intéressant de savoir si la seule rupture des complexes Bcl-2/Bax peut conduire à l'apoptose ou bien si elle nécessite l'intervention des protéines à domaines « BH3 seul ».

L'ABT-737 est une molécule qui cible la poche hydrophobe de Bcl-2 et de Bcl-xL mais pas celle de Mcl-1. Nous avons montré que la sensibilité des cellules à l'ABT-737 varie en fonction de la quantité de Bcl-2 présent dans la cellule, au travers la mise en évidence d'une corrélation entre l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et la sensibilité des LMM à cet agent, tandis qu'aucune corrélation n'est observée pour Bcl-xL. De plus, nous avons observé une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Mcl-1 et la sensibilité des cellules à cet agent. L'ABT-737

n'interagissant pas avec cette protéine, il paraît alors surprenant que celle-ci ait un tel degré de significativité dans la réponse cellulaire à l'ABT-737 ($p < 0.001$).

Une des explications possible réside dans le fait que les deux protéines anti-apoptotiques, Bcl-2 et Mcl-1, ne semblent pas pouvoir être surexprimées en même temps. En effet, lorsque l'on regarde le profil d'expression protéique, les LMM comme les cellules issues de prélèvements de patients sensibles expriment plus de Bcl-2 et moins de Mcl-1 que les cellules résistantes. De plus, il existe une corrélation inverse entre l'expression de l'ARNm de ces deux protéines dans les LMM ($p = 0.01$) (Figure R7) et les cellules de patients ($p = 0.005$) (données non montrées). Bien qu'aucune donnée dans la littérature n'explique ce phénomène, il apparaît alors que le niveau d'expression de ces deux protéines est important dans la sensibilité des cellules de MM à l'ABT-737 démontrant l'importance du ratio Bcl-2/Mcl-1 dans la décision de vie ou de mort des cellules traitées à l'ABT-737.

Bien que l'importance de Mcl-1 dans la réponse des cellules à l'ABT-737 ait été montrée précédemment, il reste à comprendre en quoi cela modifie la réponse des cellules à cet agent. Est-ce uniquement parce qu'un fort niveau de Mcl-1 traduit, par défaut, un faible niveau de Bcl-2 ? Les tests statistiques que nous avons réalisés mettent en évidence que seul le ratio Bcl-2/Mcl-1 permet de discriminer complètement les LMM sensibles des résistantes.

Pour comprendre ce mécanisme, il nous faut donc raisonner en termes de quantité de protéines pro-et anti-apoptotiques présentes dans la cellule (Figure D1).

- A. Dans une cellule qui possède des niveaux équivalents de Bcl-2 et de Mcl-1, les protéines pro-apoptotiques vont se répartir de façon équitable entre ces deux membres de la famille de Bcl-2, en fonction de leurs affinités. Lors d'un traitement à l'ABT-737, les complexes formés avec Bcl-2 vont être rompus, ce qui va libérer les membres pro-apoptotiques, induisant un signal de mort.
- B. Dans une cellule qui surexprime Bcl-2 et qui a un faible niveau d'expression de Mcl-1, les protéines pro-apoptotiques vont être principalement complexées avec Bcl-2. De ce fait, lors d'un traitement à l'ABT-737, Bcl-2 va être inhibée ce qui va permettre la libération d'un grand nombre de molécules pro-apoptotiques et induire la mort cellulaire à des doses faibles d'ABT-737. En effet, dans ces conditions, peu d'ABT-737 sera nécessaire pour libérer

une quantité suffisante de pro-apoptotiques pour induire la mort. Ces cellules sont alors très sensibles à l'ABT-737.

- C. Les cellules qui expriment beaucoup de Mcl-1 et peu de Bcl-2 sont, quant à elles, résistantes à l'ABT-737. La majorité des membres pro-apoptotiques est alors séquestrée par Mcl-1. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la résistance de ces cellules : (i) il est possible que trop peu de membres pro-apoptotiques soient complexés à Bcl-2 et que la quantité de protéines pro-apoptotiques libérées par un traitement à l'ABT-737 soit trop faible pour induire l'apoptose ; (ii) il est également probable que parmi les protéines Mcl-1 présentes, certaines ne soient pas complexées. Ainsi, les membres pro-apoptotiques libérés de Bcl-2, suite à un traitement à l'ABT-737, peuvent être séquestrés par les molécules de Mcl-1 libres, inhibant l'apoptose. Il serait alors intéressant de regarder, dans les LMM résistantes, la nature des complexes protéiques avant et après traitement à l'ABT-737, dans le but de mettre en évidence une séquestration, par Mcl-1, des membres pro-apoptotiques libérés de Bcl-2 par l'ABT-737.

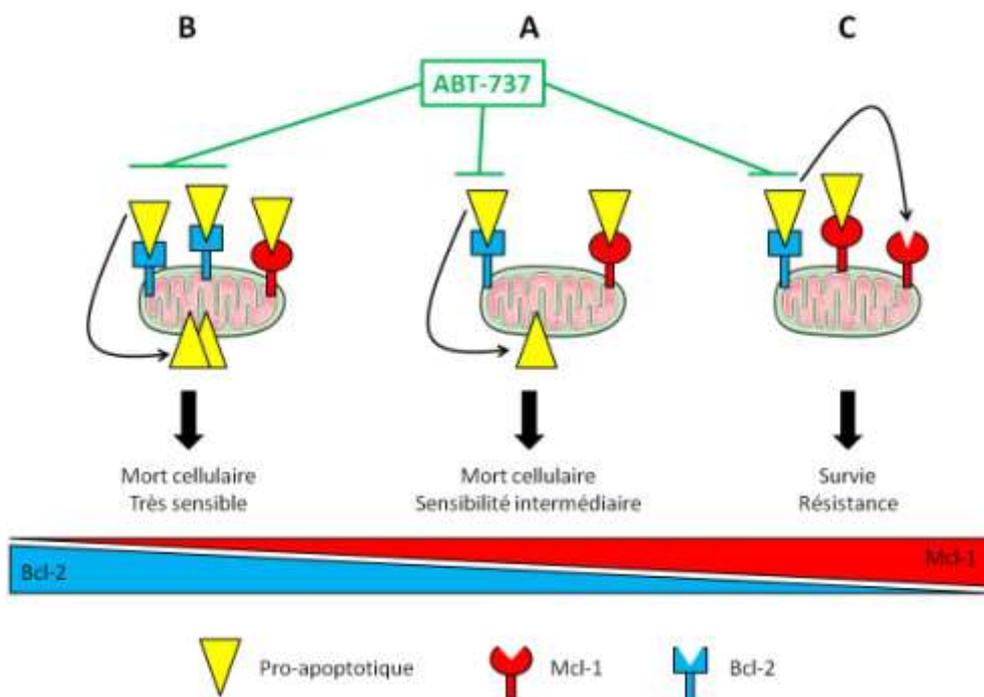


Figure D1 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'ABT-737 et de la réponse à ce traitement en fonction du ratio Bcl-2/Mcl-1 des cellules

Traitement des patients à l'ABT-737 : stratégies possibles

Nous avons montré une forte corrélation entre la sensibilité des cellules myélomateuses à l'ABT-737 et leur ratio Bcl-2/Mcl-1 tant sur des LMM que sur des cellules primaires. Ainsi, un traitement à l'ABT-737 en agent simple pourrait être proposé aux patients présentant un ratio Bcl-2/Mcl-1 fort, tandis que, pour les autres, cet inhibiteur de Bcl-2 ne serait intéressant qu'en association avec d'autres agents anticancéreux. Il apparaît alors qu'un traitement à l'ABT-737 en agent simple ou en combinaison dans le MM pourrait offrir une alternative supplémentaire pour les patients atteints de cette pathologie.

Les études précédemment menées sur l'intérêt de l'ABT-737 dans le MM ont montré une forte hétérogénéité de réponse avec des IC50 comprises entre 5 et 15 μ M. La nécessité d'utiliser de telles doses d'ABT-737 n'était pas en faveur d'une thérapie en agent simple. En effet, un article a montré que l'ABT-737 est toxique pour les lymphocytes normaux à partir de 10 μ M (Chauhan et al., 2007). Cependant, nous avons montré que certaines LMM et cellules issues de prélèvements de patients sont extrêmement sensibles à l'ABT-737 avec des doses létales 50 (LD₅₀, dose d'ABT-737 qui induit 50% de mort cellulaire) de l'ordre du nanomolaire. De telles sensibilités à l'ABT-737 ont déjà été observées dans d'autres pathologies telles que les LLC (Del Gaizo Moore et al., 2007). Il est d'ailleurs à noter que l'ABT-737 est actuellement en essai clinique dans cette pathologie. Cela souligne donc le fait que l'ABT-737 pourrait être utilisé en traitement d'un sous-groupe de MM en agent simple.

Les patients dont les cellules présentent les plus forts ratios Bcl-2/Mcl-1, sont retrouvés dans les sous-groupes des CCND1 et des hyperdiploïdes. L'étude de l'ABT-737 en agent simple dans le traitement de ces groupes de patients permettrait, si les résultats sont concluants, d'apporter alors une nouvelle thérapie ciblée pour ces derniers. Le groupe des CCND1, bien qu'arborant un taux de survie global parmi les meilleurs, a été rapporté par Nair et ses collaborateurs comme étant un des groupes présentant des résultats moyens avec les traitements actuels en terme de rémission complète (RC). En effet, les patients du groupe des CCND1 CD1 présentent le taux de RC le plus élevé, cependant leur durée est presque aussi courte que celle du groupe proliférant. Les patients du groupe CCND1 CD2, bien qu'arborant les plus longues durées de RC, présentent le plus faible taux de RC avec les traitements actuels.

Enfin, le groupe des hyperdiploïdes, quant à eux, ont une bonne survie globale caractérisée par un taux et une durée de RC moyenne (Nair et al., 2010).

Les patients des autres sous-groupes présentent des ratios Bcl-2/Mcl-1 plus faibles. L'ABT-737 ne présente un intérêt pour ces patients que si cet agent est utilisé en association avec d'autres agents anticancéreux permettant de sensibiliser les cellules à son action.

Un grand nombre d'association sont possibles. Cependant, certaines stratégies semblent être plus judicieuses que d'autres. L'une d'entre-elles est de faire en sorte d'augmenter l'expression de Bcl-2 afin de modifier le ratio Bcl-2/Mcl-1 pour qu'il soit favorable à une sensibilité à l'ABT-737. Comme nous l'avons vu précédemment, les LMM et cellules primaires présentent une corrélation inverse entre l'expression de Bcl-2 et celle de Mcl-1 de façon endogène. Cependant, il n'est pas dit qu'une augmentation de l'expression de Bcl-2, consécutive à un traitement de ces cellules, induise une diminution de l'expression de Mcl-1. Il faudrait alors une très forte induction de Bcl-2 pour faire varier le ratio Bcl-2/Mcl-1. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'augmentation de l'expression d'un membre anti-apoptotique est avant tout un facteur de résistance à l'apoptose. Ainsi, il est possible qu'en augmentant Bcl-2, il n'y ait pas de sensibilisation de la LMM à l'ABT-737 mais une augmentation de la résistance à cet agent. Pour tester cette hypothèse, il faudrait transférer une LMM résistante à l'ABT-737 avec un plasmide codant pour Bcl-2 et regarder si cela sensibilise les cellules à cet agent.

A contrario, diminuer l'expression de Mcl-1 paraît être une meilleure stratégie. En effet, cela permettrait alors de sensibiliser les cellules à l'ABT-737 en modifiant le ratio, d'une part, et, d'autre part, d'induire la mort. Plusieurs agents anticancéreux ont la propriété d'induire, de façon directe ou indirecte, la diminution de l'expression de Mcl-1. C'est notamment le cas des inhibiteurs de la transcription ou encore d'agents permettant d'augmenter sa dégradation par le protéasome.

Le flavopiridol est un dérivé flavonoïde semi-synthétique qui est connu pour inhiber la transcription *via* l'inhibition des kinases qui activent l'ARN polymérase II (Lam et al., 2001). L'inhibition de la transcription de Mcl-1 par cet agent a été démontrée dans les cellules de LLC et de MM (Chen et al., 2005) (Gojo et al., 2002). De plus, Gojo et ses collaborateurs ont montré

que le flavopiridol induisait l'apoptose des cellules de MM, notamment dans les LMM RPMI-8226 et OPM-2 qui sont résistantes à l'ABT-737. Nous avons montré, dans le lymphome du manteau, que le flavopiridol augmente la sensibilité des cellules à l'ABT-737 (article en annexe). Il serait maintenant intéressant de voir ce qu'il en est dans le MM. Cela permet également de poser la question de l'intérêt de la roscovitine, de l'actinomycine D, du sorafenib et du seliciclib (CYC202) en combinaison avec l'ABT-737 dans le traitement du MM. En effet, ces molécules sont, comme le flavopiridol, des inhibiteurs de la transcription et leur effet sur la diminution de l'expression de Mcl-1 a été montré dans différents modèles cellulaires (Chen et al., 2007). De plus, le sorafenib comme l'actinomycine D ont déjà montré une action en synergie avec l'ABT-737 respectivement sur des hépatocytes et sur des lignées cellulaires de carcinome (pancréas et poumon) (Hikita et al., 2010) (Olberding et al., 2010).

Pour diminuer l'expression protéique de Mcl-1, il est possible de diminuer sa transcription, mais il est également possible d'augmenter sa dégradation. Il a été décrit dans la littérature que la dégradation de la protéine Mcl-1 est induite par le protéasome. Pour cela, l'ubiquitinylation de Mcl-1 est nécessaire pour son adressage au protéasome. Cette dégradation de Mcl-1 peut être inhibée par la protéine USP9X qui enlève les chaînes de poly-ubiquitine présentes sur Mcl-1, permettant ainsi de prolonger la demi-vie de Mcl-1 (Schwickart et al., 2010). Ainsi, l'inhibition d'USP9X permettrait la dégradation de Mcl-1 et ainsi de sensibiliser les cellules à la mort par l'ABT-737. Au laboratoire, nous avons montré que la diminution de l'expression d'USP9X induit une sensibilisation des cellules myélomateuses à l'ABT-737 (Figure R8). Bien qu'il n'existe pas d'inhibiteurs d'USP9X commercialisés qui pourraient être utilisés en thérapie à l'heure actuelle, ces données préliminaires montrent cependant que la diminution de l'expression de Mcl-1 par l'augmentation de sa dégradation, est une stratégie intéressante pour sensibiliser les LMM résistantes à l'ABT-737.

Une autre façon d'inhiber Mcl-1 et donc de sensibiliser les cellules à l'ABT-737, serait de contrecarrer l'effet de cette protéine. L'obatoclax (GX15-070) est un inhibiteur à large spectre des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. En effet, il est décrit comme pouvant interagir avec Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1 (Zhai et al., 2006). Cet agent rompt notamment les complexes Mcl-1/Bax et peut ainsi sensibiliser les cellules à l'ABT-737 dans un modèle de carcinome oral (Nguyen et al., 2007). De plus, il a été montré que cet agent pouvait induire la mort de cellules Bax $-/-$ et Bak $-/-$ (Vogler et al., 2009). En effet, l'obatoclax peut rompre les

complexes Mcl-1/Beclin-1 et ainsi activer la voie de mort par autophagie indépendante de Bax et Bak dans des lignées de leucémie lymphoïde aiguë (Bonapace et al., 2010). Ainsi, la combinaison associant l'ABT-737 avec l'obatoclox pourrait être une stratégie intéressante à étudier dans le MM.

Enfin, les cellules myélomateuses surexpriment des membres anti-apoptotiques, Mcl-1 ou Bcl-2. L'apoptose des cellules n'est induite que lorsqu'il y a un déséquilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques en faveur des membres pro-apoptotiques. Ainsi, l'augmentation du niveau d'expression protéique de membres pro-apoptotiques tels que Bik ou Noxa permettrait alors de déséquilibrer cette balance et, par conséquent, de sensibiliser les cellules à la mort induite par l'ABT-737.

Nous avons montré que l'augmentation de Bik sensibilise les cellules à la mort. Ainsi, une combinaison associant l'ABT-737 avec le 5'Aza ou le melphalan semble être intéressante car ces agents augmentent l'expression de Bik (Figure R1 et R2) et il faudrait tester ces combinaisons sur les LMM et les cellules primaires de patients afin de voir si l'on obtient une action synergique ou tout du moins additive.

Noxa est un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 qui n'interagit qu'avec Mcl-1. Il a été montré, notamment par notre équipe que les complexes formés entre Noxa et Mcl-1 induit le clivage de cette dernière ainsi que sa dégradation par le protéasome (Gomez-Bougie et al., 2007) (Gomez-Bougie et al.). De plus, l'augmentation de l'expression de Noxa induit une augmentation du nombre de complexes Mcl-1/Noxa au détriment des complexes Mcl-1/Bim et Mcl-1/Bak. De ce fait, les protéines telles que Bak ou Bim vont se retrouver sous forme libre permettant l'induction de l'apoptose. Ainsi, les agents anticancéreux qui augmentent l'expression de Noxa, semblent de bons candidats pour une combinaison avec l'ABT-737. Le bortézomib est un inhibiteur du protéasome utilisé dans la thérapie du MM. Les LMM sensibles à cet agent entrent en apoptose *via* l'augmentation de l'expression de Noxa et de la formation des complexes Mcl-1/Noxa aboutissant au clivage de Mcl-1. De ce fait, le bortézomib (PS 341) est une molécule qui aurait un intérêt potentiel en combinaison avec l'ABT-737. Nous avons testé cette association sur des LMM résistantes à l'ABT-737 ainsi que sur des cellules primaires issues de prélèvements de patients avec l'association de ces deux inducteurs de mort : l'ABT-

737 et le bortézomib (PS-341) (Figure R9). Ces résultats montrent une action en synergie de ces deux agents anticancéreux sur les LMM ($CI_{KMM-1}=0.93$; $CI_{RPMI-8226}=0.77$). De ce fait, il est important de poursuivre l'étude sur un plus grand nombre de LMM et prélèvements de patients pour voir si les résultats de cette étude sont concluants. D'autres agents ont été décrits comme induisant une augmentation de l'expression de Noxa. C'est par exemple le cas de la doxorubicine, de l'étoposide, de l'actinomycine D et de l'Ara-C (López-Royuela et al., 2010) (Zall et al., 2010). Il serait donc opportun de tester ces combinaisons afin de voir si l'une d'entre elles présenterait un intérêt tout particulier pour le traitement des patients.

Nous avons donc mis en évidence un facteur prédictif de la réponse à l'ABT-737. En effet, les LMM, comme les cellules primaires de prélèvements de patients sensibles à l'ABT-737, expriment un fort taux de Bcl-2 accompagné d'un faible taux de Mcl-1, permettant ainsi de définir le ratio Bcl-2/Mcl-1 comme étant prédictif de la réponse des cellules à l'ABT-737. Ainsi, la recherche de ce ratio chez les patients permettrait de connaître en avance la réponse à l'ABT-737 et de proposer ainsi une thérapie ciblée et individualisée.

Conclusion

L'étude de la protéine Bik ainsi que celle de l'ABT-737 dans le MM permettent de proposer de nouveaux traitements aux patients atteints de MM. Ainsi, l'ABT-737 en agent simple pourrait être proposé aux patients ayant un ratio Bcl-2/Mcl-1 favorable, patients appartenant aux groupes des CCND1 et des Hyperdiploïdes. Pour les autres, ceux dont les cellules cancéreuses ont un ratio faible, un co-traitement associant l'ABT-737 à des agents permettant l'inhibition de Mcl-1 ou l'augmentation de l'expression des membres pro-apoptotiques peut être envisagé afin de modifier le ratio Bcl-2/Mcl-1 ou l'équilibre entre pro-et anti-apoptotiques de ces cellules. L'ensemble des traitements évoqués dans la discussion pour une action en association avec l'ABT-737 sont représentés sur la figure C1.

Ainsi, le melphalan, le 5'Aza, l'Ara C, la doxorubicine, l'étoposide, l'actinomycine D ou encore le Bortézomib vont induire l'augmentation de l'expression de Bik ou de Noxa, permettant ainsi un déséquilibre de la balance entre les membres pro-et anti-apoptotiques en faveur de la mort cellulaire. L'obatoclax, *via* son action sur les complexes Mcl-1/membres pro-apoptotiques, permet la libération des facteurs pro-apoptotique et conduit à une augmentation du signal de mort.

Enfin, la diminution de l'expression de Mcl-1 par le flavoriridol, la roscovitine, le CYC202, l'actinomycine D ou encore le sorafenib permettrait d'augmenter la valeur du ratio Bcl-2/Mcl-1 et ainsi de sensibiliser à l'ABT-737 les cellules qui y étaient résistantes. Ces agents pourraient donc avoir un effet synergique très puissant.

Mes travaux s'inscrivent donc dans une démarche de compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'échappement des cellules à l'apoptose ainsi que dans la mise en place de traitements ciblés et individualisés pour les patients atteints de MM. En effet, mes travaux ont, d'un point de vue fondamental, participé à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des cellules de MM au stress oxydatif. Qui plus est, ils ont également permis d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques tant pour les patients sensibles que pour les patients résistants à l'ABT-737.

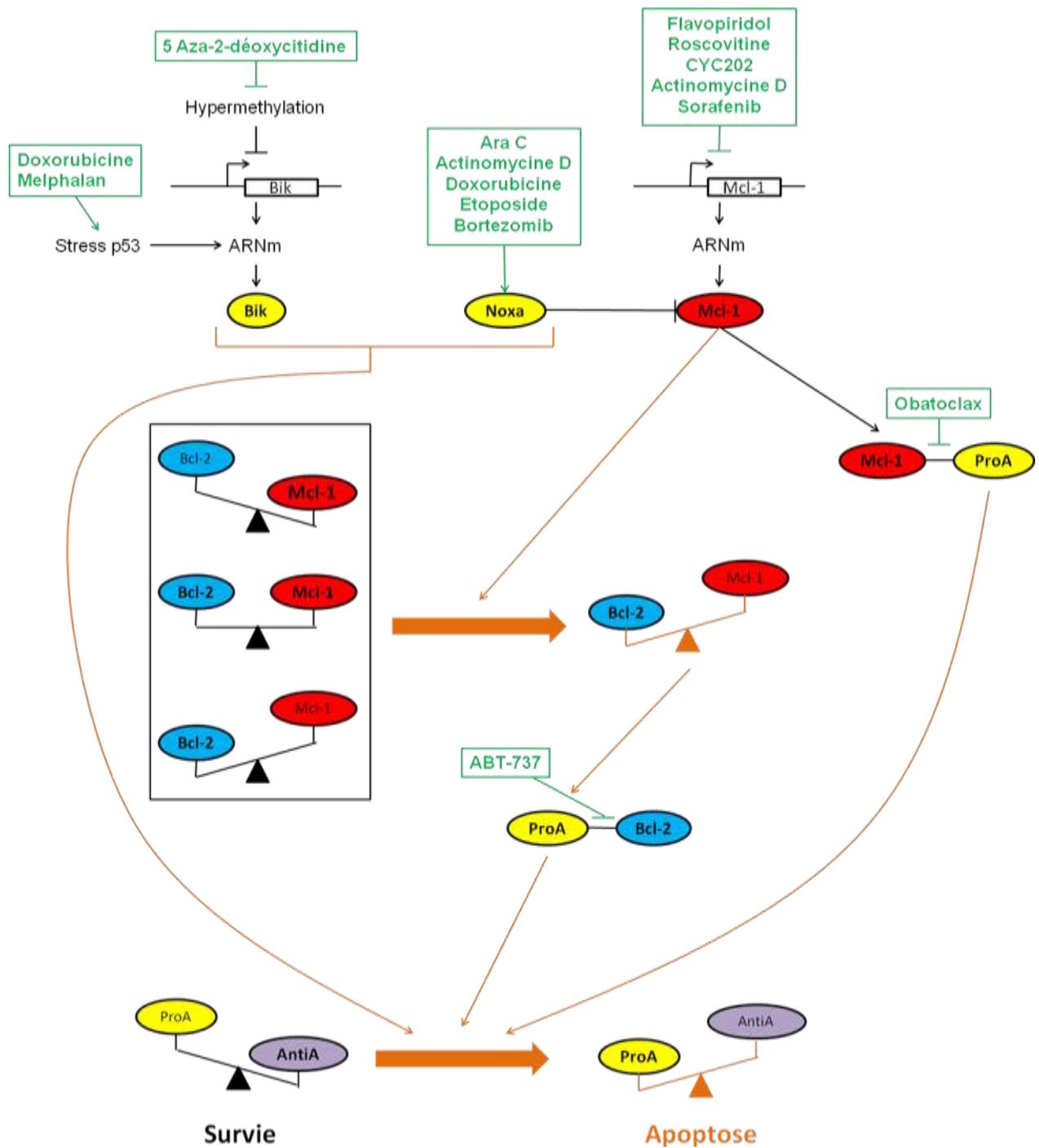


Figure C1 : Schéma bilan de l'effet de l'ABT-737 et de chaque agent anticancéreux proposé pour un traitement en association avec l'ABT-737 sur les cellules de MM.

Les voies de signalisation et les équilibres intrinsèques à la cellule sont représentés en noir. L'effet direct de chaque agent est représenté en vert et leurs effets sur les équilibres de la cellule sont représentés en orange.

Annexe

TITLE:

ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile and synergizes with other anti-neoplastic agents.

Cyrille Touzeau^{1,2}, Christelle Dousset^{1,3}, Linda Bodet^{1,4}, Patricia Gomez-Bougie^{1,3,4}, Stéphanie Bonnaud¹, Anne Moreau⁵, Philippe Moreau^{1,2}, Catherine Pellat-Deceunynk^{1,3}, Martine Amiot^{1,3}, Steven Le Gouill^{1,2}.

¹ *INSERM UMR 892, Université de Nantes, France*

² *Service d'hématologie clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France.*

³ *Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France.*

⁴ *Equipe labellisée ligue 2008.*

⁵ *Service d'anatomie pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France.*

Co-corresponding authors:

Pr Steven Le Gouill, Service d'hématologie clinique Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, INSERM UMR 892 équipe 10, Nantes, France.

and Dr Martine Amiot, INSERM UMR 892 équipe 10, Nantes, France.

Running title: ABT-737 in mantle cell lymphoma

Key words: ABT-737, mantle cell lymphoma, apoptosis, Bcl-2, Mcl-1

Authorship:

CT, MA, and SLG designed the research and wrote the manuscript.

CT and CD performed the experiments.

CT, MA, SLG, CT, LB, PGB, SB, and CPD analyzed the data.

SLG, PM, and AM provided patient samples and clinical data.

Funding:

This study is supported by Région Pays de la Loire (France) and INCa PAIR lymphome.

CT is supported by Association pour la Recherche contre le Cancer.

ABSTRACT:

Background

Mantle cell lymphoma (MCL) is considered to be an incurable disease, and new therapeutic approaches are needed. ABT-737 is a BH3 mimetic that targets the anti-apoptotic protein Bcl-2, which is over-expressed in MCL and implicated in drug resistance. The present work investigated the anti-tumoral effect of ABT-737 in MCL cell lines and primary MCL cells.

Design and Methods

MCL cell lines (JEKO-1, MINO, REC-1, GRANTA-519, UPN-1, JVM-2) 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 (LD_{50} = 20 and 80 nM, respectively), whereas the other cell lines were resistant. In primary MCL cells, 46% of patients' samples were sensitive to ABT-737 alone. Analysis of protein expression levels revealed that both sensitive cell lines and primary MCL cells are characterized by a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile, whereas resistant MCL cells contain high levels of Mcl-1. Flavopiridol induces Mcl-1 down-regulation, and the combination of flavopiridol plus ABT-737 induces 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-arabinoside.

Conclusions

The present work demonstrates that ABT-737 induces strong apoptosis in MCL cells expressing a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile. In ABT-737-resistant MCL cells, down-regulation of Mcl-1 overcomes Mcl-1-induced resistance and synergizes ABT-737 effects. In conclusion, our results strongly support the use of ABT-737 in the treatment of MCL and the concept of targeted therapy based on patient Bcl-2/Mcl-1 tumor cell profiles.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive non-Hodgkin's lymphoma which accounts for approximately 5% of all NHLs.¹ Despite recent improvements in therapy, most patients experience relapses and survive an average of approximately 6 years from the time of diagnosis.² Intensive chemotherapy regimens combined with CD20 antibodies, and with or without autologous stem cell transplantation, has been widely used but is not well-tolerated in elderly or unfit patients. Indeed, there is an urgent need for new targeted molecular approaches using novel compounds. Growing insight into the pathogenesis of MCL tumor cells has recently opened a window of opportunity for innovative targeted therapies.³ One of these new therapeutic approaches is to induce apoptosis via the intrinsic pathway and/or to overcome MCL cell resistance by antagonizing the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. This approach has been prompted by several investigations demonstrating that the anti-apoptotic protein Bcl-2 is constitutively over-expressed in MCL and plays a major role in drug resistance.⁴⁻⁵ 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 interaction between pro-survival and pro-apoptotic members is a major determinate of cell fate.⁶ Structural and functional characteristics divide them into three subgroups: multidomain anti-apoptotic members (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W and A1), multidomain pro-apoptotic 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.⁷ Certain BH3-only proteins, including Bim and Bid, are called activators because of their ability to activate Bax and Bak.⁸ In contrast, the anti-apoptotic molecules antagonize cell death by sequestering either BH3-only proteins or multidomain pro-apoptotic members. The presence of Bax or Bak is required to mediate mitochondrial damage. First, these multi-domain pro-apoptotic family members have to be activated to oligomerize; subsequently, oligomers form pores in the mitochondrial outer membrane. This major step leads to the assembly of a multi-protein structure, the so-called apoptosome, which activates downstream caspases. At this stage, the induction of apoptosis is irreversible. This apoptotic cascade is frequently, if not always, altered in tumor cells, including MCL cells.

ABT-737 is a new cell-permeant compound that selectively binds with high affinity to Bcl-2 and Bcl-x_L.⁹ ABT-737 displaces pro-apoptotic BH3-only from Bcl-2 or Bcl-x_L, leading to activation of Bax and Bak and downstream caspases.⁸ Due to the low affinity of ABT-737 for

Mcl-1, high basal levels of Mcl-1 have been associated with ABT-737 resistance.¹⁰⁻¹³ 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.^{10, 14-16} In the present study, we focused our investigation on the anti-tumoral 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.

DESIGN 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 (Braunschweig, Germany). The UPN-1 MCL cell line was kindly provided by Dr. V. Ribrag (IRG, Villejuif, France). JEKO-1, MINO, REC-1, GRANTA-519 and JVM-2 were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % FCS and 2 mM glutamine. UPN-1 was maintained in MEM α medium supplemented with 10 % FCS and 2 mM 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 had been confirmed according to the WHO classification.¹⁷ MCL cells from blood or ascites were obtained following gradient density centrifugation using Ficoll-hypaque. For Western blotting analysis, MCL cells were purified with CD19-immuno-magnetic beads.

Antibodies (mAbs) and reagents.

Anti-Bcl-2 (clone 124) mouse mAb was obtained from Dako (Roissy, CDG, France). Anti-Mcl-1 (S19) rabbit polyclonal and anti-caspase 3 (E-8) mouse mAb were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-Bcl-x_L rabbit polyclonal was obtained from BD Biosciences (Mississauga, Canada). Anti-Actin (clone C4) rabbit polyclonal antibodies were obtained from Chemicon (Temecula, CA, USA). Anti-Noxa mAb was obtained from Alexis Coger (Paris, France). ABT-737 was kindly provided by Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA). Flavopiridol and cytarabine-arabinoside were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Bortezomib was kindly provided by Millenium Laboratory (Raleigh, NC, USA).

Flow cytometric analysis of apoptosis and Bax conformational change.

Cell death in human 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 FSC). Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). For Bax

immunofluorescence staining, 5×10^5 cells were washed in PBS and fixed using the Intra Prep Permeabilization Reagent Kit (Immunotech, Marseille, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then incubated with anti-Bax (clone 6A7) mAb (BD Biosciences, Pharmingen) or IgG1 isotype control for 20 min. After washing in PBS, cells were incubated with anti-mouse-FITC antibody (Immunotech) for 20 min, washed once in PBS and resuspended in PBS-1% formaldehyde. Flow cytometric analysis was performed as above.

Immunoblotting.

Cells (5×10^6) were resuspended in lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100) containing 2 mM PMSF and 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin. After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at $12,000 \times g$ for 30 min at 4°C . Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, electrotransferred onto PVDF membranes and analyzed following standard procedures. The signal was detected using ECL (Pierce, Rockford, IL, USA).

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 performed using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a MX4000 instrument (Stratagene). BCL2 (Hs00608023_m1), MCL1 (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 min for optimal AmpErase UNG activity, then 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. To control specificity of the amplified product, a melting curve analysis was performed. No amplification of nonspecific product was observed. Amplification of the housekeeping gene RPL37a was conducted for each sample as an endogenous control.

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, cell death was assessed using APO 2.7 staining (Figure 1A). MINO and GRANTA-519 were highly sensitive to ABT-737 with a lethal dose (LD)₅₀ of 25 and 80 nM, respectively. In contrast, the four other MCL cell lines (JEKO-1, REC-1, UPN-1 and JVM-2) were resistant to ABT-737 (LD₅₀ > 8 μM). 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 activation demonstrating that apoptosis occurs via the intrinsic apoptotic pathway. (Figure 1B and 1C).

Because ABT-737 selectively binds to anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-x_L but not Mcl-1, the respective expression level of these proteins was investigated by Western blotting analysis (Figure 2A). 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} profile). 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-x_L did not appear to be related to ABT-737 sensitivity. To confirm the correlation between sensitivity to ABT-737 and the Bcl-2/Mcl-1 profile, we determined the mRNA levels of Bcl-2 and Mcl-1 for the six MCL cell lines using quantitative RT-PCR (Figure 2B). As we had observed with protein expression levels, sensitive MCL cell lines had high Bcl-2/Mcl-1 mRNA ratios (3,3 and 11 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

Next, induced apoptosis was evaluated in primary MCL tumor cells from 13 patients. Characteristics of patients are summarized in Table 1. Nine patients had *de novo* untreated MCL and two displayed a blastic variant. Primary MCL cells were cultured with varying concentrations of ABT-737. After 24 hours of 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 performed (Figure 3A). ABT-737 induced apoptosis in MCL cells in 6 samples (with LD₅₀s ranging from 15 to 150 nM), 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 (Figure 3B). As observed above in MCL cell lines, Western blot analysis revealed that only Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} primary tumor cells were sensitive to ABT-737 and that a high expression of Mcl-1 was consistently associated with resistance to ABT-737.

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

In primary MCLs and MCL cell lines, we found high levels of the antiapoptotic protein Mcl-1, suggesting that the Mcl-1 expression level might be associated with ABT-737 resistance. Flavopiridol, a semisynthetic flavonoid, is known to inhibit mRNA transcription by inhibiting kinases that activate RNA polymerase II.¹⁸ Inhibition of Mcl-1 transcription by flavopiridol has been reported in chronic lymphoid leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM) cells.¹⁹⁻²⁰ ABT-737 resistant MCL cell lines (JEKO-1, REC-1, UPN-1 and JVM-2) were cultured with flavopiridol (250 nM) for 24 hours. A drastic diminution of Mcl-1 protein level was observed, whereas neither Bcl-2 nor Bcl-x_L levels were affected by flavopiridol exposure (Figure 4A). Interestingly, the decrease in the Mcl-1 level occurred rapidly, by 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 (Figure 4B). Following 2 hours of flavopiridol exposure, qRT-PCR analysis confirmed a decrease in Mcl-1 mRNA levels up to 90%. (Figure 4C). Taken together, these results demonstrate that Mcl-1 protein down-regulation 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 down-regulation of Mcl-1, we hypothesized that flavopiridol might overcome the putative Mcl-1-associated resistance to ABT-737. The four 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 (Figure 5A). The measurement of induced apoptosis by the combination of ABT-737 plus flavopiridol shows a major synergistic effect, as demonstrated by a combination index (CI) <1 according to the Chou-Talalay method (Figure 5B).²¹

ABT-737 synergizes with cytarabine arabinoside (Ara-C) or bortezomib in ABT-737 resistant MCL cell lines.

Cytarabine arabinoside (Ara-C) and, more recently, bortezomib have been shown to be important compounds in the treatment of MCL.²²⁻²⁴ Therefore, we assessed the combined effects of ABT-737 plus bortezomib or Ara-C in the two ABT-737 resistant MCL cell lines (JEKO-1 and JVM-2) (Figure 6). As observed with flavopiridol, a synergistic effect of these two compounds when combined with ABT-737 was measured ($CI < 1$ according to the Chou-Talalay method). We further hypothesized that this synergistic effect may also be explained by a modification of Mcl-1 expression levels. As shown in figure 7A, Ara-C exposure induces a rapid caspase-3-independent decrease in Mcl-1 in the JEKO-1 cell line (Figure 7A). In contrast, bortezomib exposure did not alter Mcl-1 levels, although we observed a strong increase in levels of the BH3-only Noxa (Figure 7B), a protein which is known to bind Mcl-1 selectively and counteract its anti-apoptotic function.²⁵

DISCUSSION

The present study evaluated the antineoplastic activity of ABT-737 in MCL cells. It shows that MCL cells are quite heterogeneous regarding their sensitivity to ABT-737 (with LD₅₀ values ranging over 1000 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 ABT-737 concentrations (in the nanomolar range). The investigations conducted with fresh tumor cells from MCL patients confirm this finding and reveal that about half of the patients' samples are highly sensitive to ABT-737 alone. Interestingly, the level of sensitivity in these patients' samples is comparable to that observed in sensitive MCL cell lines. Our results support the use of ABT-737 in MCL but also highlight the need for biological markers which can be used to predict ABT-737 responsiveness. Thus, our first approach involved the identification of these biomarkers with regard to the mechanism of action of ABT-737. Analysis of protein expression revealed that the subset of highly sensitive MCL cells is consistently characterized by a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} protein profile. This is in accordance not only with the molecular mechanism of action of ABT-737 but also with previous studies conducted in other hematological 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 and low levels of Mcl-1.^{10, 26} As such, we have identified Mcl-1 as a valuable biomarker. Specifically, high expression levels of Mcl-1 appear to be related to ABT-737 resistance in MCL, regardless of the level of Bcl-2. Consistent with this, a specific role for Mcl-1 in ABT-737 resistance has been reported in solid and hematological tumor cell lines.¹¹⁻¹³ In both MCL cell lines and primary MCL cells, we observed that the level of Mcl-1 protein is highly variable from one patient to another and from one MCL cell line to another. Khoury and co-workers at MD Anderson also reported that Mcl-1 expression (assessed by immunocytochemistry in patient samples) was heterogeneous: 12 out of 36 MCL samples were found positive for Mcl-1 expression.²⁷ The role of Bcl-2 has been widely described in MCL cell resistance to treatment, but only a few reports have addressed the specific role of Mcl-1. Perez-Galan and colleagues report that Mcl-1 is involved in bortezomib sensitivity in MCL cells.²⁵ Furthermore, it has been interesting to note that ABT-737 also induces apoptosis at a higher drug concentration (5-15 μM) in MM cell lines, which express higher levels of Mcl-1.²⁸ Thus, all these investigations converge on the fact that Mcl-1 plays a key role in

resistance to ABT-737, regardless of the nature of the tumor cell. Taken together, these studies, and ours, identify a uniform profile (Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low}) for ABT-737-sensitive cells and a key role played by Mcl-1 in ABT-737 resistance. Indeed, both types of biomarker profiling (Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} and Mcl-1 levels) could be used to predict responses to ABT-737 exposure for future clinical trials. Our results highlight the fact that Mcl-1 expression levels segregate MCL into at least 2 apoptotic profiles, which depend on the level of Mcl-1 expression. Analysis of Bcl-2 and Mcl-1 expression will provide critical information in future targeted therapies of MCL when treating patients with ABT-737.

Because half of the MCL samples did not undergo apoptosis in the presence of ABT-737 alone, the second part of this work investigated strategies to overcome MCL resistance to ABT-737. Regarding the mechanism of action of ABT-737, one strategy explored decreasing Mcl-1 expression levels. Flavopiridol is known to effectively inhibit Mcl-1 transcription in CLL and MM.¹⁹⁻²⁰ In MCL, flavopiridol has been reported to induce apoptosis through the down-regulation of cell cycle proteins, such as cyclin D1.²⁹ Therefore, flavopiridol is currently under investigation for treatment of several hematological malignancies, including both CLL and MCL.³⁰⁻³² Our investigation confirms that flavopiridol down-regulates Mcl-1 at both the mRNA and protein levels in MCL cells and demonstrates 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.^{11, 33-35} 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.^{22, 36-37} As reported with flavopiridol, Ara-C has also been shown to induce Mcl-1 down-regulation at the mRNA level.³⁸ Therefore, both flavopiridol and Ara-C, which decrease Mcl-1 expression, appear to be promising supplements in ABT-737 therapy of patients presenting with high Mcl-1 levels.

Bortezomib acts as a proteasome inhibitor and is among the most promising new compounds in the treatment of MCL.²³ In contrast to the Ara-C ABT-737 combination, the mixture of ABT-737 with bortezomib shows a synergistic effect, even though no decrease of Mcl-1 protein expression is observed in the presence of bortezomib for up to 24 hours. Thus, the rationale for the use of this combination does not involve down-regulation of Mcl-1 expression but is likely due to another mechanism impacting Mcl-1 and its protein network. Among the various effects of bortezomib in cell biology, one of its pro-apoptotic effects involves the disruption of interactions among Bcl-2 protein family members. Consistent with

this, we found that the expression of Noxa is drastically increased in the presence of bortezomib. Noxa is a BH-3-only protein which specifically interacts with Mcl-1.³⁹ The up-regulation of Noxa leads to an increase of Noxa/Mcl-1 heterodimers. Thus, it counteracts the anti-apoptotic role of Mcl-1 and Mcl-1 fails to protect cells from apoptosis.²⁵ Taken together, our results show that several strategies might be employed to overcome ABT-737 resistance. One strategy would be to include compounds that decrease Mcl-1 expression (such as combining ABT-737 treatment with flavopiridol or Ara-C), but another approach would be to inhibit Mcl-1 anti-apoptotic action by increasing Noxa expression using bortezomib. Recent publications have suggested that ABT-737 exposure may enhance Mcl-1 up-regulation, leading to ABT-737 resistance.^{34, 40} This putative role played by ABT-737 as an Mcl-1 up-regulator further enhances the potential of Mcl-1 targeted therapy used in combination with ABT-737.

ABT-263 (navitoclax, Abbott) is an orally bioavailable BH3-mimetic compound of the same class as ABT-737 and is currently under investigation in hematological and solid malignancies.^{12, 41-43} The present work strongly supports the use of ABT-263 in MCL and opens the window for selected ABT-263 tailored therapies that use biomarkers able to predict patient responses. MCL patients presenting a Bcl-2^{high}/Mcl-1^{low} profile may be good candidates for ABT-263 monotherapy, whereas ABT-263 combined with an 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 treatment induction. In our experience, Bcl-2 and Mcl-1 protein level assessment using Western blotting analysis is a powerful tool to determine patient Bcl-2/Mcl-1 profiles, but other methods such as flow cytometry or quantitative PCR analysis could also evaluate these markers effectively.

In conclusion, ABT-737 is a promising new compound for future treatments of MCL patients. The unique mechanism of action of ABT-737 offers the opportunity to treat patients with 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-263 alone or in combination with Mcl-1 reducing agents in MCL patients.

REFERENCES

1. 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 Aug 15;113(4):791-8.
2. 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 Feb 1;27(4):511-8.
3. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2010 Oct 12.
4. Ek S, Hogerkorp 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 research*. 2002 Aug 1;62(15):4398-405.
5. 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 Aug 1;98(3):787-94.
6. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.
7. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002 May;9(5):505-12.
8. 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 May;9(5):351-65.
9. 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 Jun 2;435(7042):677-81.
10. 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 Jan;117(1):112-21.
11. Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X, Li L, Zakula DM, Verneti 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 Jun 7;26(27):3972-9.
12. 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 Mar;9(3):545-57.
13. 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 Nov;10(5):389-99.
14. 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 Feb 15;111(4):2300-9.
15. 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 Aug;12(2):171-85.

16. 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 Nov;10(5):375-88.
17. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC press. 2008.
18. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltane JM, et al. Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol*. 2001;2(10):RESEARCH0041.
19. Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2513-9.
20. 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 Nov;8(11):3527-38.
21. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*. 2010 Jan 15;70(2):440-6.
22. 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 Mar;91(3):425-6.
23. 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 Mar;20(3):520-5.
24. 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 Aug;95(8):1350-7.
25. 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 Jan 1;107(1):257-64.
26. 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. *The Open Bioinformatics Journal*. 2010;4:5-10.
27. 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. *The Journal of pathology*. 2003 Jan;199(1):90-7.
28. 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 Jul;21(7):1549-60.
29. 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 Nov;30(11):1377-84.
30. 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 May 1;21(9):1740-5.

31. 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 Jan 20;28(3):418-23.
32. 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 Dec 10;27(35):6012-8.
33. 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 research*. 2007 Jan 15;67(2):782-91.
34. 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 Jul 16.
35. 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 Sep 1;16(17):4392-400.
36. 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 Oct 1;112(7):2687-93.
37. 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 Oct;89(10):1275-6.
38. 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 Jul;91(7):912-9.
39. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005 Feb 4;17(3):393-403.
40. 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 Apr 22;115(16):3304-13.
41. 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 Oct;66(5):869-80.
42. Rudin CM, Oliveira MR, Garon EB, Bonomi P, Camidge R, Nolan C, et al. A phase IIa study of ABT-263 in patients with relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:15s(Abstract 7046).
43. 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 research*. 2008 May 1;68(9):3421-8.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. ABT-737 induces apoptosis in MCL cell lines via the intrinsic pathway.

A: Sensitivity of MCL cell lines to ABT-737

Cells were cultured for 24 hours with increasing concentrations of ABT-737 (from 20 nM to 20 μ M). Cell death was quantified by APO 2.7 staining. The lethal dose 50 (LD₅₀) is indicated for each cell line.

B: ABT-737 induces rapid apoptosis via the intrinsic pathway in sensitive MCL cell line MINO

MCL cell line MINO was cultured with 100 nM ABT-737 for different periods of time as indicated. Immunoblot analysis of MINO lysate (70 μ g of protein) reveals the cleavage of caspase 9 and 3. Actin was used as a loading control.

C: ABT-737 induces apoptosis via Bax activation

MINO was cultured for 24 hours with 100 nM ABT-737. Bax activation was detected by flow cytometry after Bax staining.

Figure 2. Bcl-2/Mcl-1 profile correlates with ABT-737 sensitivity.

A: Cell lysates were separated by SDS-PAGE and then electrotransferred onto PVDF membranes. The membranes were probed with the respective antibodies. Actin was included as a protein loading control. Quantification of Bcl-2 and Mcl-1 bands was determined by densitometry relative to actin.

B: BCL2 and MCL1 mRNA levels were measured by qRT-PCR at baseline and determined relative to JEKO-1 mRNA levels.

Figure 3. Sensitivity of MCL patient 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, 1250 nM). Cell death was quantified by FACS analysis of APO 2.7 and CD19 stained cells.

B Western-blotting 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 grey) present high levels of Bcl-2 and low levels of Mcl-1, contrary to resistant MCL samples (in black) which present high levels of Mcl-1.

Figure 4. Flavopiridol induces a rapid down-regulation of Mcl-1 at both the protein and mRNA level.

A: MCL cell lines resistant to ABT-737 (JEKO-1, REC-1, UPN-1 and JVM-2) were cultured for 24 hours with or without 250 nM flavopiridol. Western blot analysis of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-x_L protein expression is shown.

B: MCL cell line JEKO-1 was cultured for 2, 4, 6 and 24 hours with 500 nM flavopiridol. Western-blot analysis of Mcl-1 and caspase 3 proteins is shown.

C: The mRNA level of MCL1 was measured by quantitative RT-PCR at baseline and after 2, 4 and 6 hours of treatment with flavopiridol (500 nM) in JEKO-1.

Figure 5. Effect of combining ABT-737 and flavopiridol in ABT-737 resistant cell lines.

A: ABT-737 resistant MCL cell lines (JEKO-1, REC-1, UPN-1 and JVM-2) were cultured for 24 hours in ABT-737 (white bars), flavopiridol (grey bars) or a combination of ABT-737 plus flavopiridol (black bars). Death was quantified using APO 2.7 staining. Sub-optimal concentrations of ABT-737 (150 nM) and flavopiridol (250 nM for JEKO-1, REC-1 and JVM-2, 150 nM for UPN-1) were used. Synergy was confirmed by combination index (CI) <1 according to the Chou-Talalay method. **B:** CI values of various combinations of flavopiridol (250 nM) and ABT-737 (25-75-150-300-1500 nM) are shown for JEKO-1 MCL cells.

Figure 6. ABT-737 synergizes with bortezomib and cytarabine in ABT-737 resistant cell lines.

ABT-737 resistant MCL cell lines JEKO-1 and JVM-2 were cultured for 24 hours with ABT-737 (white bars), bortezomib or Ara-C (grey bars) or combinations of ABT-737 plus bortezomib or AraC (black bars). Sub-optimal concentrations of ABT-737 (150 nM), bortezomib (10 nM) and Ara-C (20 ng/mL for JEKO-1, 80 nG/mL for Ara-C) were used. Death was quantified using APO 2.7 staining. Synergy was shown by a combination index (CI) <1 according to the Chou-Talalay method.

Figure 7. Effect of Ara-C and bortezomib on Mcl-1 expression.

A: 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 protein expression is shown.

B: JEKO-1 was cultured for 2, 6 and 24 hours with 10 nM bortezomib. Western-blot analysis of Mcl-1 and Noxa protein expression is shown.

Table 1. Characteristics of patients' samples.

MNC: mononuclear cells

Figure 1.

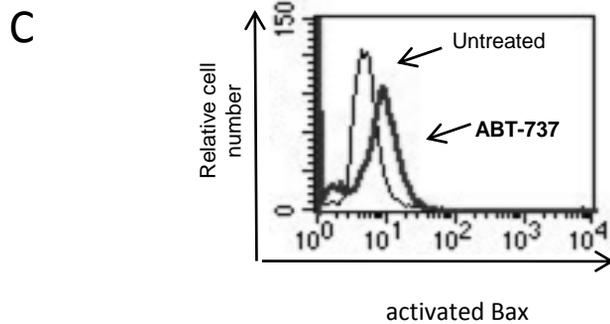
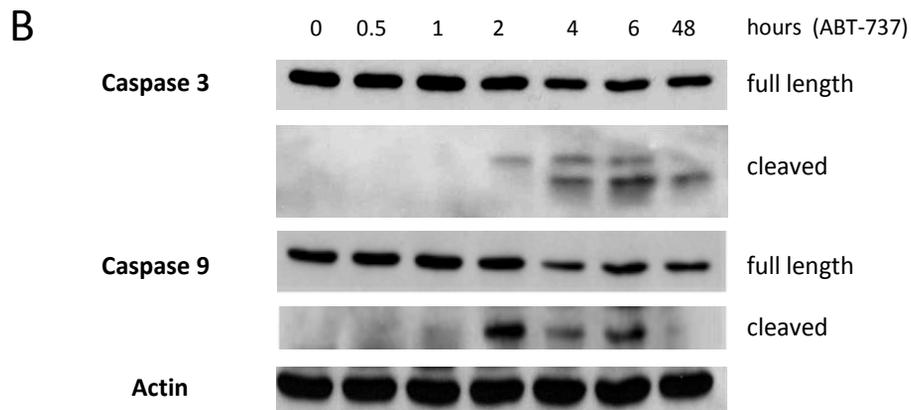
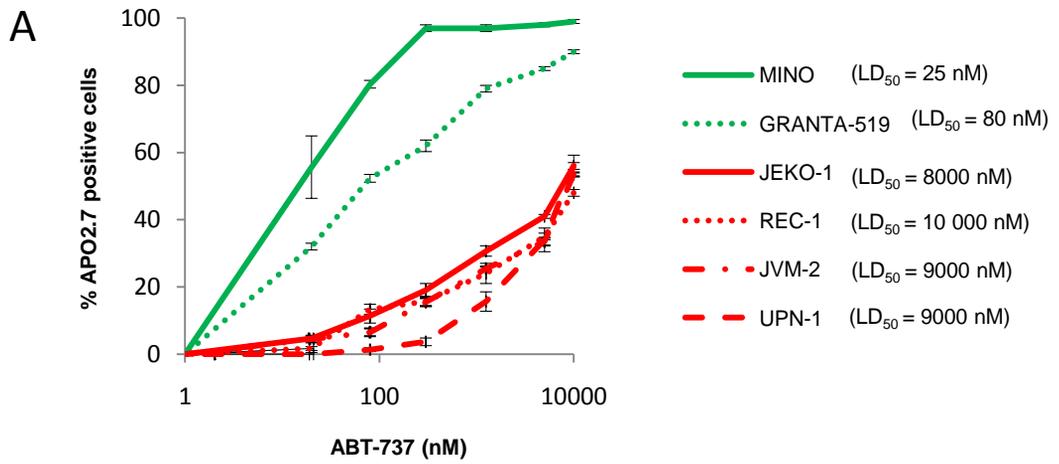


Figure 4.

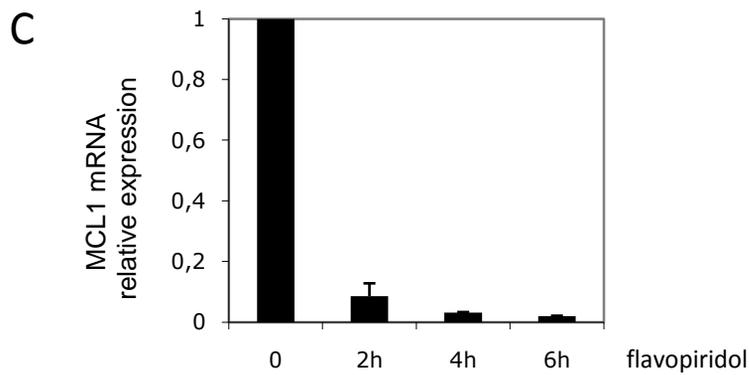
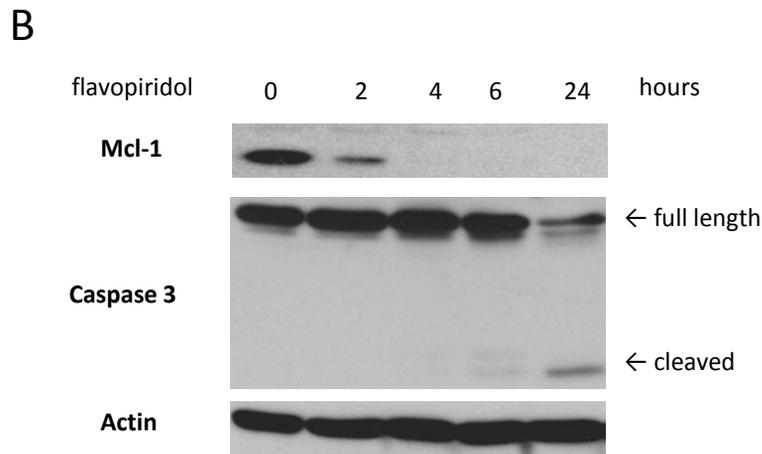
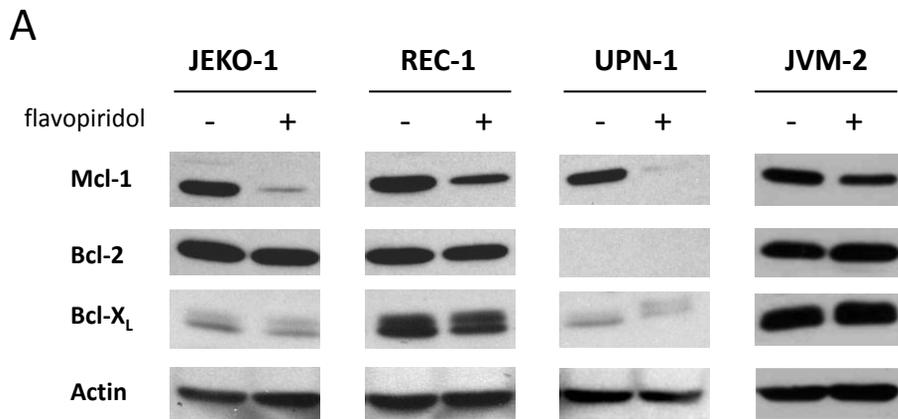


Figure 2.

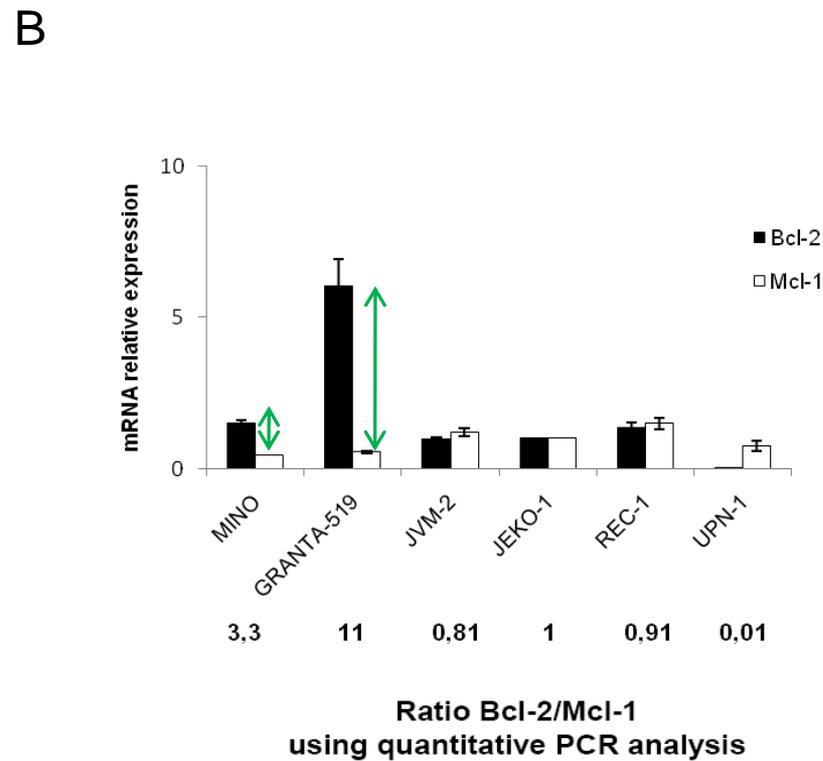
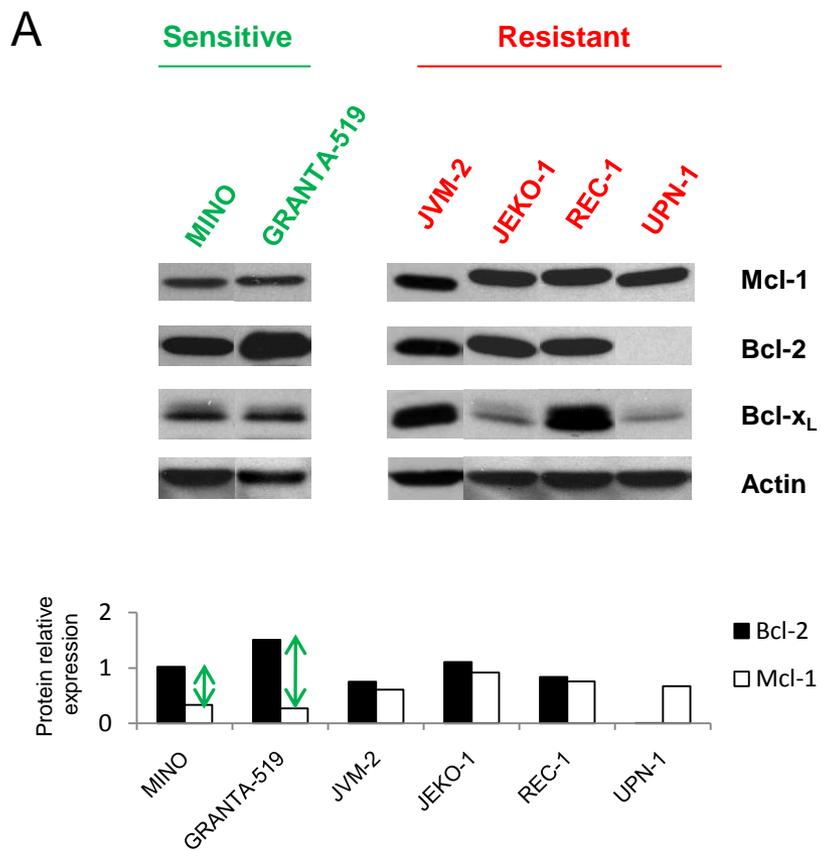
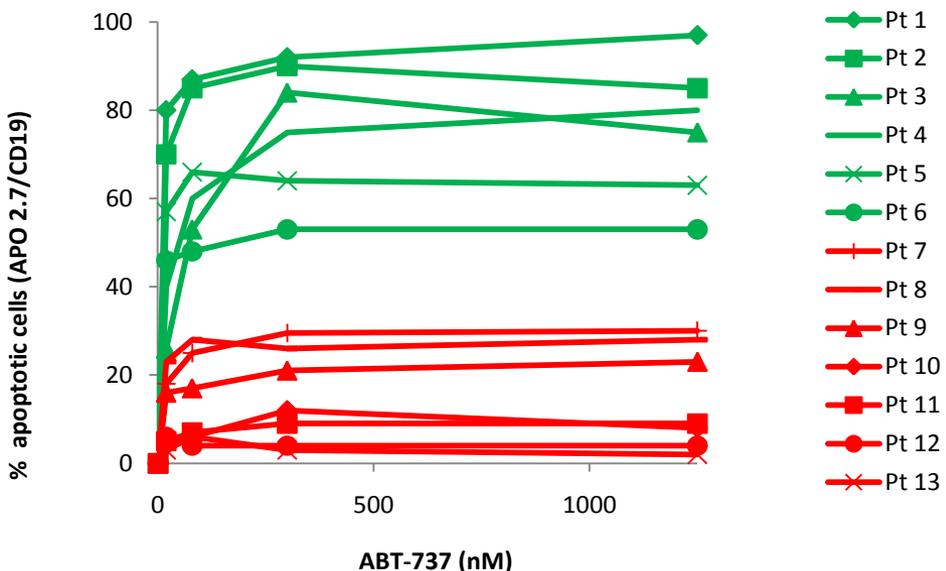


Table 1.

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

Figure 3.

A



B

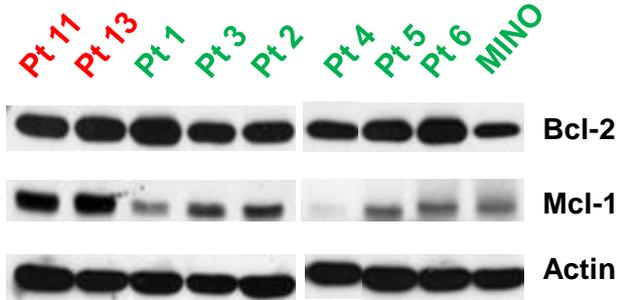


Figure 5.

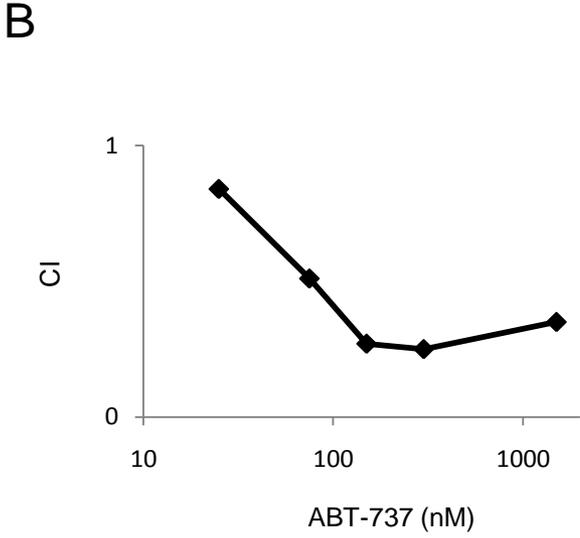
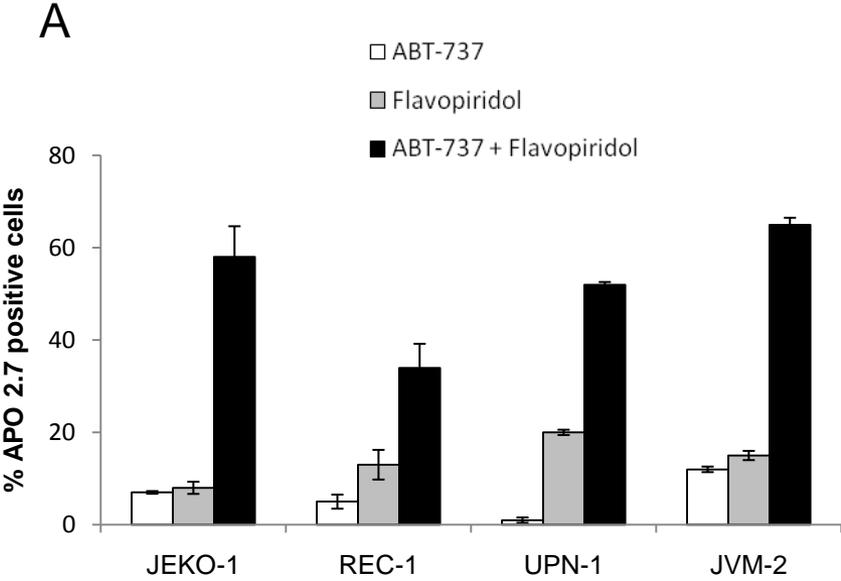


Figure 6.

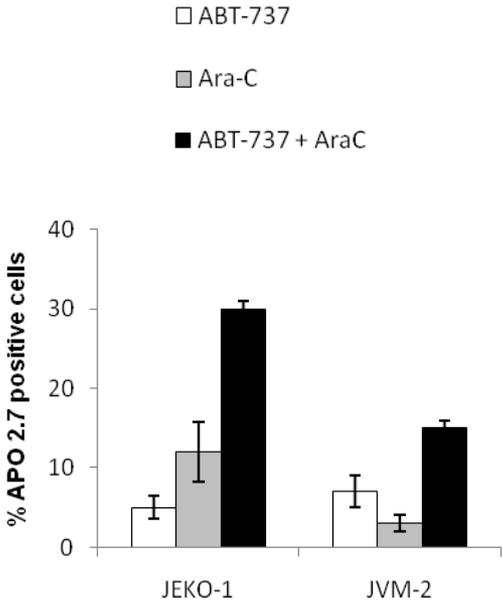
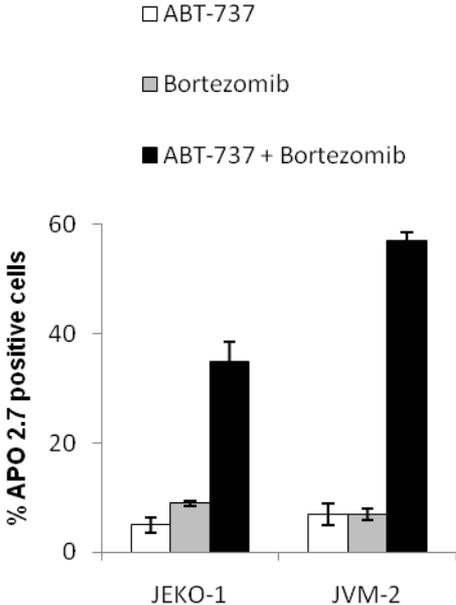
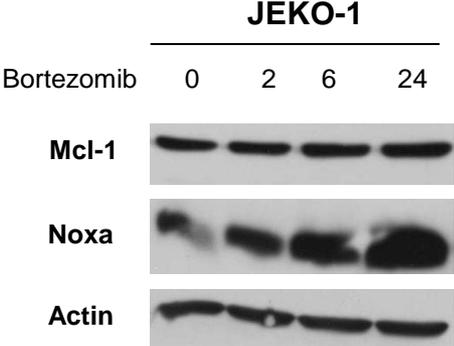
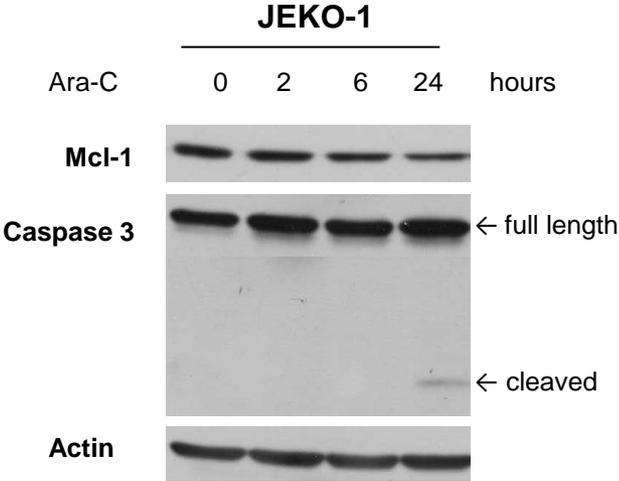


Figure 7.

B



A



Références Bibliographiques

- Adams, J. M., et Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 61-66.
- Akgul, C., Moulding, D. A., White, M. R., et Edwards, S. W. (2000). In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett* 478, 72-76.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., et Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., et al. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.
- Aouacheria, A., Brunet, F., et 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.
- Arena, V., Martini, M., Luongo, M., Capelli, A., et Larocca, L. M. (2003). Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 91-96.
- Arya, R., Mallik, M., et Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J. Biosci* 32, 595-610.
- Attal, M., Lauwers, V. C., Marit, G., Caillot, D., Facon, T., Hulin, C., Moreau, P., Mathiot, C., Roussel, M., Payen, C., et al. (2010). Maintenance Treatment with Lenalidomide After Transplantation for MYELOMA: Final Analysis of the IFM 2005-02. *ASH Annual Meeting Abstracts* 116, 310.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L., et Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 98, 3082-3086.
- Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M. J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., et al. (1998). High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 58, 5640-5645.
- Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S. S., et Rojanasakul, Y. (2006). S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J. Biol. Chem* 281, 34124-34134.
- Badros, A. Z., Goloubeva, O., Rapoport, A. P., Ratterree, B., Gahres, N., Meisenberg, B., Takebe, N., Heyman, M., Zwiebel, J., Streicher, H., et al. (2005). Phase II Study of G3139, a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide, in Combination With Dexamethasone and Thalidomide in Relapsed Multiple Myeloma Patients. *Journal of Clinical Oncology* 23, 4089 -4099.
- Bae, J., Hsu, S. Y., Leo, C. P., Zell, K., et Hsueh, A. J. (2001). Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 6, 319-330.
- Bae, J., Leo, C. P., Hsu, S. Y., et Hsueh, A. J. (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J. Biol. Chem* 275, 25255-25261.
- Bakkus, M. H., Heirman, C., Van Riet, I., Van Camp, B., et Thielemans, K. (1992). Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 80, 2326-2335.

- Barboule, N., Demeter, K., Benmeradi, N., et Larminat, F. (2009). Bcl-2 is an integral component of mitotic chromosomes. *Cell Biol. Int* 33, 572-577.
- Barboule, N., Truchet, I., et Valette, A. (2005). Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis: co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. *Cell Cycle* 4, 590-596.
- Bardwell, P. D., Gu, J., McCarthy, D., Wallace, C., Bryant, S., Goess, C., Mathieu, S., Grinnell, C., Erickson, J., Rosenberg, S. H., et al. (2009). The Bcl-2 family antagonist ABT-737 significantly inhibits multiple animal models of autoimmunity. *J. Immunol* 182, 7482-7489.
- Barillé, S., Thabard, W., Robillard, N., Moreau, P., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R., et Amiot, M. (1999). CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. *Br. J. Haematol* 106, 532-535.
- Bataille, R., Durie, B. G., et Grenier, J. (1983). Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br. J. Haematol* 55, 439-447.
- Bataille, R., et Harousseau, J. L. (1997). Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med* 336, 1657-1664.
- Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X. G., et Klein, B. (1989). Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest* 84, 2008-2011.
- Bataille, R., Jégo, G., Robillard, N., Barillé-Nion, S., Harousseau, J., Moreau, P., Amiot, M., et 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.
- Beierle, E. A., Strande, L. F., et Chen, M. K. (2002). 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.
- Bergsagel, P. L., et Kuehl, W. M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5611-5622.
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., et Shaughnessy, J. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106, 296-303.
- Bigelow, R. L. H., Chari, N. S., Undén, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., Toftgård, R., et McDonnell, T. J. (2004). Transcriptional Regulation of bcl-2 Mediated by the Sonic Hedgehog Signaling Pathway through gli-1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 1197 -1205.
- Billadeau, D., Van Ness, B., Kimlinger, T., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Greipp, P. R., et Witzig, T. E. (1996). Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood* 88, 289-296.
- Blagosklonny, M. V. (2001). Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia* 15, 869-874.
- Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., el-Deiry, W. S., Kingston, D. G., Higgs, P. I., Neckers, L., et Fojo, T. (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 57, 130-135.

- Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nuñez, G., et Thompson, C. B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* *74*, 597-608.
- Bonapace, L., Bornhauser, B. C., Schmitz, M., Cario, G., Ziegler, U., Niggli, F. K., Schäfer, B. W., Schrappe, M., Stanulla, M., et Bourquin, J. (2010). Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest* *120*, 1310-1323.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol* *39*, 615-647.
- Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., et 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., et 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.
- Boyd, J. M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L. K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C., et Chinnadurai, G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* *79*, 341-351.
- Bredel, M., Bredel, C., Juric, D., Harsh, G. R., Vogel, H., Recht, L. D., et Sikic, B. I. (2005). High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res* *65*, 4088-4096.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M., et Dimmeler, S. (2000). Posttranslational Modification of Bcl-2 Facilitates Its Proteasome-Dependent Degradation: Molecular Characterization of the Involved Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* *20*, 1886-1896.
- Brichese, L., et Valette, A. (2002). PP1 phosphatase is involved in Bcl-2 dephosphorylation after prolonged mitotic arrest induced by paclitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *294*, 504-508.
- Brien, G., Debaud, A., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F. M., Haser, R., et al. (2009). C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J. Biol. Chem* *284*, 30257-30263.
- 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., et al. (2009). MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica* *94*, 78-86.
- Castells, A., Gusella, J. F., Ramesh, V., et Rustgi, A. K. (2000). A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* *60*, 2836-2839.
- Castells, A., Ino, Y., Louis, D. N., Ramesh, V., Gusella, J. F., et Rustgi, A. K. (1999). Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* *117*, 831-837.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3

- signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* *10*, 105-115.
- Cecconi, F., et Levine, B. (2008). The Role of Autophagy in Mammalian Development. *Dev Cell* *15*, 344-357.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., et Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* *9*, 351-365.
- Chang, H. Y., et Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* *64*, 821-846.
- Chang, H., Sloan, S., Li, D., et Keith Stewart, A. (2004). Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions. *Br. J. Haematol* *127*, 280-284.
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., et al. (2007). A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* *26*, 2374-2380.
- 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., et Huang, D. C. S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* *17*, 393-403.
- Chen, M., Guerrero, A. D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T., et Wang, J. (2007). Caspase-9-induced Mitochondrial Disruption through Cleavage of Anti-apoptotic BCL-2 Family Members. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 33888 -33895.
- Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V., et Plunkett, W. (2005). Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* *106*, 2513-2519.
- Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., et Grant, S. (2007). Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* *67*, 782-791.
- Chen, S., Dai, Y., Pei, X., et Grant, S. (2009). Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1. *Mol. Cell. Biol* *29*, 6149-6169.
- Cheng, A., Dean, N. M., et Honkanen, R. E. (2000). Serine/threonine protein phosphatase type 1gamma1 is required for the completion of cytokinesis in human A549 lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem* *275*, 1846-1854.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., et Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* *278*, 1966-1968.
- Cheng, E. H. Y., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J., et Korsmeyer, S. J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* *301*, 513-517.
- Chipuk, J. E., et Green, D. R. (2009). PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* *8*, 2692-2696.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., et Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.

- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., et Lutz, R. J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 14, 5589-5596.
- Chng, W. J., Glebov, O., Bergsagel, P. L., et Kuehl, W. M. (2007). Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 20, 571-596.
- Chng, W. J., Gonzalez-Paz, N., Price-Troska, T., Jacobus, S., Rajkumar, S. V., Oken, M. M., Kyle, R. A., Henderson, K. J., Van Wier, S., Greipp, P., et al. (2008). Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 22, 2280-2284.
- Chng, W. J., Price-Troska, T., Gonzalez-Paz, N., Van Wier, S., Jacobus, S., Blood, E., Henderson, K., Oken, M., Van Ness, B., Greipp, P., et al. (2007). Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia* 21, 582-584.
- Choi, B., Feng, L., et Yoon, H. S. (2010). FKBP38 protects Bcl-2 from caspase-dependent degradation. *J. Biol. Chem* 285, 9770-9779.
- Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I., et 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., et 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., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 13944-13949.
- Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., et al. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 554-559.
- Clohessy, J. G., Zhuang, J., et Brady, H. J. M. (2004). Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br. J. Haematol* 125, 655-665.
- Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B. M., et Sinclair, D. A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 13, 627-638.
- Cosulich, S. C., Savory, P. J., et Clarke, P. R. (1999). Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr. Biol* 9, 147-150.
- Coultas, L., Pellegrini, M., Visvader, J. E., Lindeman, G. J., Chen, L., Adams, J. M., Huang, D. C. S., et Strasser, A. (2003). Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ* 10, 185-192.
- Craig, R. W. (2002). MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16, 444-454.
- Craig, R. W., Jabs, E. W., Zhou, P., Kozopas, K. M., Hawkins, A. L., Rochelle, J. M., Seldin, M. F., et Griffin, C. A. (1994). Human and mouse chromosomal mapping of the myeloid cell leukemia-1 gene: MCL1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in

- preneoplastic and neoplastic disease. *Genomics* 23, 457-463.
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E. B., et Cress, W. D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, 1359-1369.
- Dai, Z., Liu, S., Marcucci, G., et Sadee, W. (2006). 5-Aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 351, 455-461.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin. Cancer Res* 13, 7254-7263.
- Danial, N. N., et Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Daniel, P. T., Pun, K. T., Ritschel, S., Sturm, I., Holler, J., Dörken, B., et Brown, R. (1999). Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94, 1100-1107.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., et Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-123.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., et Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest* 117, 112-121.
- 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., et al. (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.
- Demchenko, Y. N., et Kuehl, W. M. (2010). A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 1, 59-68.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., et Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- Deng, X., Gao, F., et May, W. S. (2003). Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood* 102, 3179-3185.
- Denisov, A. Y., Madiraju, M. S. R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G. C., et Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem* 278, 21124-21128.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M., Harousseau, J., Bataille, R., et 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.
- Descamps, G., Wuillème-Toumi, S., Trichet, V., Venot, C., Debussche, L., Hercend, T., Collette, M., Robillard, N., Bataille, R., et Amiot, M. (2006). CD45neg but not CD45pos human myeloma cells are sensitive to the inhibition of IGF-1 signaling by a murine anti-IGF-1R monoclonal antibody, mAVE1642. *J. Immunol* 177, 4218-4223.

- Dewson, G., et Kluck, R. M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Sci* 122, 2801-2808.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L., et Coffey, P. J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol* 10, 1201-1204.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J., Xia, W., Chen, C., Li, L., Lee, D., Liu, J., Zhong, Q., Wang, X., et al. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol. Cell. Biol* 27, 4006-4017.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C., Yang, Y., Lai, C., Lee, D., et al. (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res* 68, 6109-6117.
- Domina, A. M., Vrana, J. A., Gregory, M. A., Hann, S. R., et Craig, R. W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301-5315.
- Drewinko, B., Alexanian, R., Boyer, H., Barlogie, B., et Rubinow, S. I. (1981). The growth fraction of human myeloma cells. *Blood* 57, 333-338.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duriez, P. J., Wong, F., Dorovini-Zis, K., Shahidi, R., et Karsan, A. (2000). A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem* 275, 18099-18107.
- Elangovan, B., et Chinnadurai, G. (1997). Functional Dissection of the Pro-apoptotic Protein Bik. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24494 -24498.
- Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D. M., et Strasser, A. (2003). Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J. Exp. Med* 198, 1119-1126.
- Facon, T., Mary, J. Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J. L., Guillemin, G., Chateix, C., 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.
- Fadeel, B., Zhivotovsky, B., et Orrenius, S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J* 13, 1647-1657.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., et Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 551-562.
- Fennell, D. A., Chacko, A., et Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 27, 1189-1197.
- Fonseca, R., Witzig, T. E., Gertz, M. A., Kyle, R. A., Hoyer, J. D., Jalal, S. M., et Greipp, P. R. (1998). Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br. J. Haematol* 101, 296-301.

- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., et 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.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., et Yeh, E. T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem* 275, 39458-39465.
- Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *Int. J. Cancer* 124, 511-515.
- Furukawa, Y., Iwase, S., Kikuchi, J., Terui, Y., Nakamura, M., Yamada, H., Kano, Y., et Matsuda, M. (2000). Phosphorylation of Bcl-2 Protein by CDC2 Kinase during G2/M Phases and Its Role in Cell Cycle Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21661 -21667.
- García-Sáez, A. J., Fuertes, G., Suckale, J., et Salgado, J. (2010). Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Adv. Exp. Med. Biol* 677, 91-105.
- Geiman, T. M., et Robertson, K. D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J. Cell. Biochem* 87, 117-125.
- Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M., et Shore, G. C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24, 1546-1556.
- Germain, M., Mathai, J. P., et Shore, G. C. (2002). BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J. Biol. Chem* 277, 18053-18060.
- Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., Litzow, M. R., Henderson, K. J., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., et Fonseca, R. (2005). Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 106, 2837-2840.
- Gibson, L., Holmgren, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sutherland, G. R., Baker, E., Adams, J. M., et Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-675.
- Gillissen, B., Essmann, F., Graupner, V., Stärck, L., Radetzki, S., Dörken, B., Schulze-Osthoff, K., et Daniel, P. T. (2003). Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* 22, 3580-3590.
- Gillissen, B., Essmann, F., Hemmati, P. G., Richter, A., Richter, A., Öztop, I., Chinnadurai, G., Dörken, B., et Daniel, P. T. (2007). Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 179, 701 -715.
- 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., et al. (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem* 277, 27217-27226.
- Gojo, I., Zhang, B., et Fenton, R. G. (2002). The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells through Transcriptional Repression and Down-Regulation of Mcl-1. *Clinical Cancer Research* 8, 3527 -3538.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., et Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol* 2, 156-162.

- Gomez-Bougie, P., Bataille, R., et Amiot, M. (2004). The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur. J. Immunol* *34*, 3156-3164.
- Gomez-Bougie, P., Ménoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., et Amiot, M. Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. en soumission.
- Gomez-Bougie, P., Oliver, L., Le Gouill, S., Bataille, R., et Amiot, M. (2005). Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene* *24*, 8076-8079.
- Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., et Amiot, M. (2007). Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res* *67*, 5418-5424.
- Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C., et Michel, M. R. (1998). Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J* *17*, 1268-1278.
- Green, D. R., et Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127-1130.
- Grillot, D. A., González-García, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M. F., et Nuñez, G. (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J. Immunol* *158*, 4750-4757.
- Grimm, S., et Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* *12*, 841-855.
- Gross, A., McDonnell, J. M., et Korsmeyer, S. J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* *13*, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Korsmeyer, S. J. (1999b). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem* *274*, 1156-1163.
- Guo, B., Godzik, A., et Reed, J. C. (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem* *276*, 2780-2785.
- Han, J., Sabbatini, P., et White, E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol. Cell. Biol* *16*, 5857-5864.
- Hanahan, D., et Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Harousseau, J., Avet-Loiseau, H., Attal, M., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Michallet, M., Facon, T., Garderet, L., Marit, G., et al. (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. *J. Clin. Oncol* *27*, 5720-5726.
- Hayflick, L., et Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res* *25*, 585-621.
- Heath-Engel, H. M., Chang, N. C., et Shore, G. C. (2008). The endoplasmic reticulum in apoptosis and

- autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27, 6419-6433.
- Hermiston, M. L., Xu, Z., et Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol* 21, 107-137.
- Herrant, M., Jacquelin, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., et Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 7863-7873.
- Herrant, M., Luciano, F., Loubat, A., et Auberger, P. (2002). The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene* 21, 4957-4968.
- High, L. M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S. L., Vikstrom, I. B., Roberts, A. W., et Lock, R. B. (2010). The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Mol. Pharmacol* 77, 483-494.
- Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Shigekawa, M., Iwase, K., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., et al. (2010). The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52, 1310-1321.
- Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C. S., et Day, C. L. (2006). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 14, 128-136.
- Holmgren, S. P., Huang, D. C., Adams, J. M., et 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 Differ* 6, 525-532.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., et Hsueh, A. J. (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 12401-12406.
- Hsu, S. Y., Lin, P., et Hsueh, A. J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol. Endocrinol* 12, 1432-1440.
- Huang, D. C., Adams, J. M., et Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* 17, 1029-1039.
- Hur, J., Bell, D. W., Dean, K. L., Coser, K. R., Hilario, P. C., Okimoto, R. A., Tobey, E. M., Smith, S. L., Isselbacher, K. J., et Shioda, T. (2006). Regulation of Expression of BIK Proapoptotic Protein in Human Breast Cancer Cells: p53-Dependent Induction of BIK mRNA by Fulvestrant and Proteasomal Degradation of BIK Protein. *Cancer Research* 66, 10153 -10161.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., et Núñez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16, 1686-1694.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., et Ichijo, H. (2002). Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative

- stress. *J. Biol. Chem* 277, 43730-43734.
- Ishikawa, H., Tsuyama, N., Obata, M., et M Kawano, M. (2006). Mitogenic signals initiated via interleukin-6 receptor complexes in cooperation with other transmembrane molecules in myelomas. *J Clin Exp Hematop* 46, 55-66.
- Ishimaru, D., Zuraw, L., Ramalingam, S., Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Reuben, A., Fernandes, D. J., et Spicer, E. K. (2010). Mechanism of Regulation of bcl-2 mRNA by Nucleolin and A+U-rich Element-binding Factor 1 (AUF1). *Journal of Biological Chemistry* 285, 27182 -27191.
- Jamil, S., Mojtavavi, S., Hojabrpour, P., Cheah, S., et Duronio, V. (2008). An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 19, 3212-3220.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., et Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem. J.* 387, 659.
- Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C. G., Valentin, M., et Yang, E. (2008). G0 Function of BCL2 and BCL-xL Requires BAX, BAK, and p27 Phosphorylation by Mirk, Revealing a Novel Role of BAX and BAK in Quiescence Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34108 -34120.
- Jorgensen, T. N., McKee, A., Wang, M., Kushnir, E., White, J., Refaeli, Y., Kappler, J. W., et Marrack, P. (2007). Bim and Bcl-2 mutually affect the expression of the other in T cells. *J. Immunol* 179, 3417-3424.
- Jourdan, M., Veyrone, J., De Vos, J., Redal, N., Couderc, G., et Klein, B. (2003). A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* 22, 2950-2959.
- Jüttermann, R., Li, E., et Jaenisch, R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 11797-11801.
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., et al. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol* 1, 223-232.
- Kang, M. H., Wan, Z., Kang, Y. H., Sposto, R., et Reynolds, C. P. (2008). Mechanism of synergy of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and ABT-737 in acute lymphoblastic leukemia cell lines: Mcl-1 inactivation. *J. Natl. Cancer Inst* 100, 580-595.
- Karlberg, M., Ekoff, M., Huang, D. C. S., Mustonen, P., Harvima, I. T., et Nilsson, G. (2010). The BH3-mimetic ABT-737 induces mast cell apoptosis in vitro and in vivo: potential for therapeutics. *J. Immunol* 185, 2555-2562.
- Kataoka, T., Holler, N., Micheau, O., Martinon, F., Tinel, A., Hofmann, K., et Tschopp, J. (2001). Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J. Biol. Chem* 276, 19548-19554.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., et Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kim, J., Sim, S., Ha, H., Ko, J., Lee, K., et Bae, J. (2009). MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Lett* 583, 2758-2764.

- Kim, J., Ahn, H., Ryu, J., Suk, K., et Park, J. (2004). BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Exp. Med* *199*, 113-124.
- Kinnally, K. W., et Antonsson, B. (2007). A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* *12*, 857-868.
- Kirkin, V., Joos, S., et Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1644*, 229-249.
- Klampfer, L., Zhang, J., et Nimer, S. D. (1999). GM-CSF RESCUES TF-1 CELLS FROM GROWTH FACTOR WITHDRAWAL-INDUCED, BUT NOT DIFFERENTIATION-INDUCED APOPTOSIS: THE ROLE OF BCL-2 AND MCL-1. *Cytokine* *11*, 849-855.
- Klein, B., Tarte, K., Jourdan, M., Mathouk, K., Moreaux, J., Jourdan, E., Legouffe, E., De Vos, J., et Rossi, J. F. (2003a). Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int. J. Hematol* *78*, 106-113.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., et Dalla-Favera, R. (2003b). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *100*, 2639-2644.
- Ko, J., Choi, K., Pan, Z., Lin, P., Weisleder, N., Kim, C., et Ma, J. (2007). The tail-anchoring domain of Bfl1 and HCCS1 targets mitochondrial membrane permeability to induce apoptosis. *J. Cell. Sci* *120*, 2912-2923.
- Ko, J., Lee, M., Cho, S., Cho, J., Lee, B., Koh, J. S., Lee, S., Shim, Y., et Kim, C. (2003). Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene* *22*, 2457-2465.
- Kobayashi, S., Lee, S., Meng, X. W., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Craig, R. W., Kaufmann, S. H., et Gores, G. J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J. Biol. Chem* *282*, 18407-18417.
- Kodama, Y., Taura, K., Miura, K., Schnabl, B., Osawa, Y., et Brenner, D. A. (2009). Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* *136*, 1423-1434.
- Kolluri, S. K., Zhu, X., Zhou, X., Lin, B., Chen, Y., Sun, K., Tian, X., Town, J., Cao, X., Lin, F., et al. (2008). A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* *14*, 285-298.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *10*, 375-388.
- Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., et Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *90*, 3516-3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., et 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. *Am. J. Pathol* *146*, 1309-1319.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., et Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev* 87, 99-163.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., et Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem* 276, 20633-20640.
- Kuehl, W. M., et Bergsagel, P. L. (2005). Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 346-352.
- Kuehl, W. M., et Bergsagel, P. L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* 2, 175-187.
- Kurowska, M., Rudnicka, W., Kontny, E., Janicka, I., Chorazy, M., Kowalczewski, J., Ziolkowska, M., Ferrari-Lacraz, S., Strom, T. B., et Maslinski, 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-xL and Bcl-2. *J Immunol* 169, 1760-1767.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., et Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 17, 525-535.
- Kyle, R. A., Durie, B. G. M., Rajkumar, S. V., Landgren, O., Blade, J., Merlini, G., Kröger, N., Einsele, H., Vesole, D. H., Dimopoulos, M., et al. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 24, 1121-1127.
- Kyle, R. A., et Kumar, S. (2009). The significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 94, 1641-1644.
- Lalier, L., Cartron, P., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., et Vallette, F. M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12, 887-896.
- Lam, L. T., Pickeral, O. K., Peng, A. C., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltneane, J. M., Averett, L. M., Zhao, H., Davis, R. E., Sathyamoorthy, M., et al. (2001). Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2, research0041.1-research0041.11.
- Lapeyre, J. N., et Becker, F. F. (1979). 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 87, 698-705.
- Le Bot, N. (2007). Entosis: cell death by invasion. *Nat. Cell Biol* 9, 1346.
- Leber, B., Lin, J., et Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 29, 5221-5230.

- Lee, D., Lim, M., Youn, D., Jung, S. E., Ahn, Y. S., Tsujimoto, Y., et Lee, J. (2009). hnRNP L binds to CA repeats in the 3'UTR of bcl-2 mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382, 583-587.
- Lee, Y. K., Shanafelt, T. D., Bone, N. D., Strege, A. K., Jelinek, D. F., et 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., et Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 2432-2437.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., et Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., et Cook, S. J. (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J. Biol. Chem* 278, 18811-18816.
- Li, C., Li, R., Grandis, J. R., et Johnson, D. E. (2008). Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther* 7, 1647-1655.
- Li, J., et Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Li, L. Y., Luo, X., et Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, Y. M., Wen, Y., Zhou, B. P., Kuo, H., Ding, Q., et Hung, M. (2003). Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants. *Cancer Res* 63, 7630-7633.
- Li, Z., Chen, H., Campbell, R. A., Bonavida, B., et Berenson, J. R. (2008). NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr. Opin. Hematol* 15, 391-399.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B., et Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol* 72, 8586-8596.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., et Zhang, X. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
- Lin, C., Chen, C., Chang, W., Jan, M., Hsu, L., Wu, R., Fang, Y., Tang, M., Chang, W., et Lin, Y. (2005). Bcl-2 rescues ceramide- and etoposide-induced mitochondrial apoptosis through blockage of caspase-2 activation. *J. Biol. Chem* 280, 23758-23765.
- Lin, E. Y., Orlofsky, A., Berger, M. S., et Prystowsky, M. B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J. Immunol* 151, 1979-1988.
- Lin, S. S., Bassik, M. C., Suh, H., Nishino, M., Arroyo, J. D., Hahn, W. C., Korsmeyer, S. J., et Roberts, T. M. (2006). PP2A Regulates BCL-2 Phosphorylation and Proteasome-mediated Degradation at the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 281, 23003 -23012.

- Lin, X., Morgan-Lappe, S., Huang, X., Li, L., Zakula, D. M., Verneti, L. A., Fesik, S. W., et Shen, Y. (2007). '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* 26, 3972-3979.
- Linette, G. P., Li, Y., Roth, K., et Korsmeyer, S. J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 9545-9552.
- Linette, G. P., Grusby, M. J., Hedrick, S. M., Hansen, T. H., Glimcher, L. H., et Korsmeyer, S. J. (1994). Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8+ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control Points. *Immunity* 1, 197-205.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., et Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis* 14, 549-569.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., et Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., et Kappler, J. W. (2003). The Structure of a Bcl-xL/Bim Fragment Complex: Implications for Bim Function. *Immunity* 19, 341-352.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A. L., Brothers, G., Penninger, J. M., et Kroemer, G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 15, 758-767.
- Lokhorst, H., Einsele, H., Vesole, D., Bruno, B., San Miguel, J., Pérez-Simon, J. A., Kröger, N., Moreau, P., Gahrton, G., Gasparetto, C., et al. (2010). International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol* 28, 4521-4530.
- Lopez, H., Zhang, L., George, N. M., Liu, X., Pang, X., Evans, J. J. D., Targy, N. M., et Luo, X. (2010). Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J. Biol. Chem* 285, 15016-15026.
- López-Royuela, N., Pérez-Galán, P., Galán-Malo, P., Yuste, V. J., Anel, A., Susín, S. A., Naval, J., et Marzo, I. (2010). Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* 79, 1746-1758.
- Lovell, R., Dunn, J. A., Begum, G., Barth, N. J., Plant, T., Moss, P. A., Drayson, M. T., et Pratt, G. (2005). Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br. J. Haematol* 130, 542-548.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., et 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.
- Lutz, R. J. (2000). Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem. Soc. Trans* 28, 51-56.
- Majno, G., et Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol* 146, 3-15.

- Marango, J., Shimoyama, M., Nishio, H., Meyer, J. A., Min, D., Sirulnik, A., Martinez-Martinez, Y., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Zhou, M., et al. (2008). The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood* *111*, 3145-3154.
- Marriott, H. M., Bingle, C. D., Read, R. C., Braley, K. E., Kroemer, G., Hellewell, P. G., Craig, R. W., Whyte, M. K. B., et Dockrell, D. H. (2005). Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance. *J. Clin. Invest* *115*, 359-368.
- Marshansky, V., Wang, X., Bertrand, R., Luo, H., Duguid, W., Chinnadurai, G., Kanaan, N., Vu, M. D., et Wu, J. (2001). Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J. Immunol* *166*, 3130-3142.
- Marvel, J., Perkins, G. R., Lopez Rivas, A., et Collins, M. K. (1994). Growth factor starvation of bcl-2 overexpressing murine bone marrow cells induced refractoriness to IL-3 stimulation of proliferation. *Oncogene* *9*, 1117-1122.
- Mathai, J. P., Germain, M., Marcellus, R. C., et Shore, G. C. (2002). Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* *21*, 2534-2544.
- Mathai, J. P., Germain, M., et Shore, G. C. (2005). BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J. Biol. Chem* *280*, 23829-23836.
- Matsuyama, S., Schendel, S. L., Xie, Z., et Reed, J. C. (1998). Cytoprotection by Bcl-2 Requires the Pore-forming $\alpha 5$ and $\alpha 6$ Helices. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 30995 -31001.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., et Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* *21*, 749-760.
- Mazel, S., Burtrum, D., et Petrie, H. T. (1996). Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J. Exp. Med* *183*, 2219-2226.
- McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., et Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* *96*, 625-634.
- Mebratu, Y. A., Dickey, B. F., Evans, C., et Tesfaigzi, Y. (2008). The BH3-only protein Bik/Bik/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN γ -induced cell death. *J. Cell Biol* *183*, 429-439.
- Meng, H., Yang, C., Ni, W., Ding, W., Yang, X., et Qian, W. (2007). Antitumor activity of fludarabine against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Eur. J. Haematol* *79*, 486-493.
- Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Geffroy-Luseau, A., Daniels, S., Moreau, P., Le Gouill, S., Harousseau, J., Bataille, R., Amiot, M., et Pellat-Deceunynck, C. (2006). Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* *108*, 1346-1352.
- Ménoret, E., Gomez-Bougie, P., Surget, S., Trichet, V., Oliver, L., Pellat-Deceunynck, C., et Amiot, M.

- (2010). Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS Lett* 584, 487-492.
- Mérino, D., Giam, M., Hughes, P. D., Siggs, O. M., Heger, K., O'Reilly, L. A., Adams, J. M., Strasser, A., Lee, E. F., Fairlie, W. D., et al. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol* 186, 355-362.
- Michaelidis, T. M., Sendtner, M., Cooper, J. D., Airaksinen, M. S., Holtmann, B., Meyer, M., et Thoenen, H. (1996). Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron* 17, 75-89.
- Micheau, O., et Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., et Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11, 577-590.
- Ming, L., Sakaida, T., Yue, W., Jha, A., Zhang, L., et Yu, J. (2008). Sp1 and p73 activate PUMA following serum starvation. *Carcinogenesis* 29, 1878-1884.
- Minn, A. J., Vélez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., et Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J. M., Peleato, M. L., Kroemer, G., et Susin, S. A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem* 276, 16391-16398.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., et Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- de Moissac, D., Mustapha, S., Greenberg, A. H., et Kirshenbaum, L. A. (1998). Bcl-2 Activates the Transcription Factor NFκB through the Degradation of the Cytoplasmic Inhibitor IκBα. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23946 -23951.
- Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., et Gores, G. J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133-6140.
- Moulding, D. A., Giles, R. V., Spiller, D. G., White, M. R., Tidd, D. M., et Edwards, S. W. (2000). Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 96, 1756-1763.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettekheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
- Murasawa, M., Okada, S., Obata, S., Hatano, M., Moriya, H., et Tokuhisa, T. (2002). GL7 defines the cycling stage of pre-B cells in murine bone marrow. *Eur. J. Immunol* 32, 291-298.
- Nair, B., van Rhee, F., Shaughnessy, J. D., Anaissie, E., Szymonifka, J., Hoering, A., Alsayed, Y., Waheed, S., Crowley, J., et Barlogie, B. (2010). Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood* 115, 4168-4173.

- Nakagawa, Y., Abe, S., Kurata, M., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Inoue, M., Takemura, T., Suzuki, K., et Kitagawa, M. (2006). IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am. J. Hematol* *81*, 824-831.
- Nakano, K., et Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683-694.
- Naumann, U., Schmidt, F., Wick, W., Frank, B., Weit, S., Gillissen, B., Daniel, P., et Weller, M. (2003). Adenoviral natural born killer gene therapy for malignant glioma. *Hum. Gene Ther* *14*, 1235-1246.
- Nguyen, M., Marcellus, R. C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S. R., Goulet, D., Viallet, J., Bélec, L., Billot, X., et al. (2007). Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 19512-19517.
- Nickson, P., Toth, A., et Erhardt, P. (2007). PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc. Res* *73*, 48-56.
- Nikrad, M., Johnson, T., Puthalalath, H., Coultas, L., Adams, J., et Kraft, A. S. (2005). The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol. Cancer Ther* *4*, 443-449.
- Niture, S. K., et Jaiswal, A. K. (2010). INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death Differ.* Available at: <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1038/cdd.2010.114> [Accédé Novembre 7, 2010].
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M. A., et Almasan, A. (2004). Apoptosis of multiple myeloma. *Int. J. Hematol* *80*, 224-231.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., et Huang, D. C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* *17*, 384-395.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., et Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053-1058.
- Okada, H., et Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 592-603.
- Olberding, K. E., Wang, X., Zhu, Y., Pan, J., Rai, S. N., et Li, C. (2010). Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic: ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression. *Cancer Biol Ther* *10*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818182> [Accédé Novembre 10, 2010].
- 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., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677-681.
- Oppermann, M., Geilen, C. C., Fecker, L. F., Gillissen, B., Daniel, P. T., et Eberle, J. (2005). Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* *24*, 7369-7380.

- O'Reilly, L. A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G. J., Print, C., Bath, M. L., Huang, D. C., et Strasser, A. (2000). The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am. J. Pathol* 157, 449-461.
- O'Reilly, L. A., Harris, A. W., et Strasser, A. (1997). bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8- T cell progenitors. *Int. Immunol* 9, 1291-1301.
- O'Reilly, L. A., Huang, D. C., et Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J* 15, 6979-6990.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., et Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 1259-1263.
- Paiva, B., Vidriales, M., Cerveró, J., Mateo, G., Pérez, J. J., Montalbán, M. A., Sureda, A., Montejano, L., Gutiérrez, N. C., García de Coca, A., et al. (2008). Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 112, 4017-4023.
- Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M. C., et Grandér, D. (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J. Biol. Chem* 277, 44317-44326.
- Patil, C., et Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol* 13, 349-355.
- Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., et Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent Bcl-2 Phosphorylation in Ceramide-induced Macroautophagy. *J Biol Chem* 284, 2719-2728.
- Pei, X., Dai, Y., et Grant, S. (2004). The small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 interacts synergistically with flavopiridol to induce mitochondrial injury and apoptosis in human myeloma cells through a free radical-dependent and Jun NH2-terminal kinase-dependent mechanism. *Mol. Cancer Ther* 3, 1513-1524.
- Pellat-Deceunynck, C., et Bataille, R. (2004). Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol. Dis* 32, 293-301.
- Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., et al. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9, 2528-2534.
- Petros, A. M., Medek, A., Nettesheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., Matayoshi, E. D., Oltersdorf, T., et Fesik, S. W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3012 - 3017.
- Pettersson, M., Jernberg-Wiklund, H., Larsson, L. G., Sundström, C., Givol, I., Tsujimoto, Y., et Nilsson, K. (1992). Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 79, 495-502.
- Pichiorri, F., Suh, S., Rocci, A., De Luca, L., Taccioli, C., Santhanam, R., Zhou, W., Benson Jr., D. M., Hofmainster, C., Alder, H., et al. (2010). Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development.

- Cancer Cell *18*, 367-381.
- Ploner, C., Kofler, R., et Villunger, A. (2008). Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene 27 Suppl 1*, S84-92.
- Podar, K., Chauhan, D., et Anderson, K. C. (2009). Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia 23*, 10-24.
- Pompeia, C., Hodge, D. R., Plass, C., Wu, Y., Marquez, V. E., Kelley, J. A., et Farrar, W. L. (2004). Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res 64*, 3465-3473.
- Putcha, G. V., Moulder, K. L., Golden, J. P., Bouillet, P., Adams, J. A., Strasser, A., et Johnson, E. M. (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron 29*, 615-628.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., et Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science 293*, 1829-1832.
- Puthier, D., Bataille, R., et Amiot, M. (1999a). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol 29*, 3945-3950.
- Puthier, D., Pellat-Deceunynck, C., Barillé, S., Robillard, N., Rapp, M. J., Juge-Morineau, N., Harousseau, J. L., Bataille, R., et Amiot, M. (1999b). Differential expression of Bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia 13*, 289-294.
- Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G., et Anderson, K. C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet 374*, 324-339.
- Rajkumar, S. V. (2009). Multiple myeloma. *Curr Probl Cancer 33*, 7-64.
- Rajkumar, S. V., et Kyle, R. A. (2005). Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc 80*, 1371-1382.
- Rasheva, V. I., et Domingos, P. M. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis 14*, 996-1007.
- Rashmi, R., Pillai, S. G., Vijayalingam, S., Ryerse, J., et Chinnadurai, G. (2008). BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene 27*, 1366-1375.
- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H. E., et Dahl, I. M. S. (2005). Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood 105*, 317-323.
- Reed, J. C., Miyashita, T., Takayama, S., Wang, H. G., Sato, T., Krajewski, S., Aimé-Sempé, C., Bodrug, S., Kitada, S., et Hanada, M. (1996). BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell. Biochem 60*, 23-32.
- Reis, P. P., Rogatto, S. R., Kowalski, L. P., Nishimoto, I. N., Montovani, J. C., Corpus, G., Squire, J. A., et Kamel-Reid, S. (2002). Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene 21*, 6480-6487.

- Rieber, M., et Rieber, M. S. (2008). Mcl-1 cleavage and sustained phosphorylation of c-Jun-N-terminal kinase mediate melanoma apoptosis induced by 2-acetyl furanonaphthoquinone: roles of Bcl-2 and p53. *Cancer Biol. Ther* 7, 1206-1211.
- Rinkenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., et Korsmeyer, S. J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-27.
- Ritchie, A., Gutierrez, O., et Fernandez-Luna, J. L. (2009). PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death Differ* 16, 838-846.
- Roberts, A., Gandhi, L., O'Connor, O. A., Rudin, C. M., Khaira, D., Xiong, H., Chiu, Y., Greco, R., Krivoschik, A. P., et Wilson, W. H. (2008). Reduction in platelet counts as a mechanistic biomarker and guide for adaptive dose-escalation in phase I studies of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 26, 3542.
- Rong, Y., Bultynck, G., Aromolaran, A. S., Zhong, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Mignery, G. A., Roderick, H. L., Bootman, M. D., et Distelhorst, C. W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 14397-14402.
- Sarasquete, M. E., García-Sanz, R., Armellini, A., Fuertes, M., Martín-Jiménez, P., Sierra, M., Del Carmen Chillón, M., Alcoceba, M., Balanzategui, A., Ortega, F., et al. (2006). The association of increased p14ARF/p16INK4a and p15INK4a gene expression with proliferative activity and the clinical course of multiple myeloma. *Haematologica* 91, 1551-1554.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-986.
- Schendel, S. L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B. L., et Reed, J. C. (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J. Biol. Chem* 274, 21932-21936.
- Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., et Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5113 -5118.
- Schorr, K., Li, M., Krajewski, S., Reed, J. C., et Furth, P. A. (1999). Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 153-164.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.
- Scorilas, A., Kyriakopoulou, L., Yousef, G. M., Ashworth, L. K., Kwamie, A., et Diamandis, E. P. (2001). Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family. *Genomics* 72, 217-221.
- Scudla, V., Ordeltova, M., Bacovsky, J., Vytrasova, M., Horak, P., et Minarik, J. (2005). The relationship between proliferation and apoptosis in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance or multiple myeloma. *Haematologica* 90, 1713-1714.

- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., et Korsmeyer, S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 7834-7838.
- Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. J., et Spicer, E. K. (2004). Identification of Nucleolin as an AU-rich Element Binding Protein Involved in bcl-2 mRNA Stabilization. *Journal of Biological Chemistry* 279, 10855-10863.
- Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P., et Korsmeyer, S. J. (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J* 7, 123-131.
- Shaughnessy, J., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Bergsagel, P. L., et Kuehl, M. (2001). Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 98, 217-223.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 13, 1979-1987.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., et Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., et Fesik, S. W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274, 1531-1534.
- Sirohi, B., et Powles, R. (2004). Multiple myeloma. *Lancet* 363, 875-887.
- Smadja, N. V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., et Fruchart, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98, 2229-2238.
- Snowden, R. T., Sun, X., Dyer, M. J. S., et Cohen, G. M. (2003). Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* 17, 1981-1989.
- Son, J. K., Varadarajan, S., et Bratton, S. B. (2010). TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ* 17, 1288-1301.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M., et Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18, 167-178.
- Soto, P., et Smith, L. C. (2009). BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev* 76, 637-646.
- Spender, L. C., O'Brien, D. I., Simpson, D., Dutt, D., Gregory, C. D., Allday, M. J., Clark, L. J., et Inman, G. J. (2009). TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell Death Differ* 16, 593-602.
- Spets, H., Strömberg, T., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K., et Jernberg-Wiklund, H. (2002). Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *Eur. J. Haematol* 69, 76-89.
- Srivastava, R. K., Srivastava, A. R., Korsmeyer, S. J., Nesterova, M., Cho-Chung, Y. S., et Longo, D. L. (1998). Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis

- through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol* 18, 3509-3517.
- Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., et al. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem* 273, 27084-27090.
- Strasser, A., O'Connor, L., et Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem* 69, 217-245.
- Sturm, I., Stephan, C., Gillissen, B., Siebert, R., Janz, M., Radetzki, S., Jung, K., Loening, S., Dörken, B., et Daniel, P. T. (2006). Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* 13, 619-627.
- Subramaniam, D., Natarajan, G., Ramalingam, S., Ramachandran, I., May, R., Queimado, L., Houchen, C. W., et Anant, S. (2008). Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G1025-1032.
- Subramanian, T., Vijayalingam, S., Lomonosova, E., Zhao, L., et Chinnadurai, G. (2007). Evidence for involvement of BH3-only proapoptotic members in adenovirus-induced apoptosis. *J. Virol* 81, 10486-10495.
- Suzuki, M., Youle, R. J., et Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.
- Tanaka, S., Saito, K., et Reed, J. C. (1993). Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J. Biol. Chem* 268, 10920-10926.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., et Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9, 231-241.
- Teodoridis, J. M., Strathdee, G., et Brown, R. (2004). Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resistance Updates* 7, 267-278.
- Terpos, E., Rahemtulla, A., et Dimopoulos, M. (2005). Current treatment options for myeloma. *Expert Opin Pharmacother* 6, 1127-1142.
- Theodorakis, P., Lomonosova, E., et Chinnadurai, G. (2002). Critical requirement of BAX for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells. *Cancer Res* 62, 3373-3376.
- Tong, Y., Yang, Q., Vater, C., Venkatesh, L. K., Custeau, D., Chittenden, T., Chinnadurai, G., et Gourdeau, H. (2001). The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol. Cancer Ther* 1, 95-102.
- Trudel, S., Li, Z. H., Rauw, J., Tiedemann, R. E., Wen, X. Y., et Stewart, A. K. (2007). Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* 109, 5430-5438.
- 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., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 68, 3421-3428.
- Tsujimoto, Y., et Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2,

- the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5214-5218.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., et Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., et Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* 23, 1889-1899.
- Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D., et Anderson, K. C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82, 3712-3720.
- Uhlmann, E. J., D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., Wagner, A. J., Hay, N., et Chinnadurai, G. (1996). Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res* 56, 2506-2509.
- Vairo, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., DeCaprio, J. A., Ewen, M. E., Koff, A., et Adams, J. M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol. Cell. Biol* 20, 4745-4753.
- Vaux, D. L., Cory, S., et 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.
- Vaux, D. L., et Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 304, 499-504.
- Verma, S., Budarf, M. L., Emanuel, B. S., et Chinnadurai, G. (2000). Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences. *Gene* 254, 157-162.
- Verma, S., Zhao, L. J., et Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J. Biol. Chem* 276, 4671-4676.
- Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M. J. S., et Cohen, G. M. (2009). Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* 16, 1030-1039.
- Vogler, M., Furdas, S. D., Jung, M., Kuwana, T., Dyer, M. J. S., et Cohen, G. M. (2010). Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clin. Cancer Res* 16, 4217-4225.
- Vousden, K. H. (2000). p53: Death Star. *Cell* 103, 691-694.
- Wang, J. L., Zhang, Z. J., Choksi, S., Shan, S., Lu, Z., Croce, C. M., Alnemri, E. S., Korngold, R., et Huang, Z. (2000). Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 60, 1498-1502.
- Wang, J. M., Chao, J. R., Chen, W., Kuo, M. L., Yen, J. J., et Yang-Yen, H. F. (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol. Cell. Biol* 19, 6195-6206.
- Wang, J., Lai, M., et Yang-Yen, H. (2003). Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves

- activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol. Cell. Biol* 23, 1896-1909.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., et Korsmeyer, S. J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859-2869.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wang, Y., Guan, X., Fok, K. L., Li, S., Zhang, X., Miao, S., Zong, S., Koide, S. S., Chan, H. C., et Wang, L. (2008). A novel member of the Rhomboid family, RHBDD1, regulates BIK-mediated apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci* 65, 3822-3829.
- Warr, M. R., Acoca, S., Liu, Z., Germain, M., Watson, M., Blanchette, M., Wing, S. S., et Shore, G. C. (2005). BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett* 579, 5603-5608.
- Weber, A., Kirejczyk, Z., Potthoff, S., Ploner, C., et Häcker, G. (2009). Endogenous Noxa Determines the Strong Proapoptotic Synergism of the BH3-Mimetic ABT-737 with Chemotherapeutic Agents in Human Melanoma Cells. *Transl Oncol* 2, 73-83.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., et Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., et Tang, H. (2005). Specific Cleavage of Mcl-1 by Caspase-3 in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis in Jurkat Leukemia T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 10491 -10500.
- Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W. G., Bontjer, I., et Borst, J. (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J. Biol. Chem* 277, 22781-22788.
- Willis, S. N., et Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol* 17, 617-625.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Wilson, W. H., O'Connor, O., Czuczman, M. S., LaCasce, A., Gerecitano, J., Leonard, J. P., Tulpule, A., Xiong, H., Chiu, Y., Busman, T., et al. (2008). Phase 1 Study of ABT-263, a Bcl-2 Family Inhibitor, in Relapsed or Refractory Lymphoid Malignancies. *ASH Annual Meeting Abstracts* 112, 2108.
- Wilson-Annan, J., O'Reilly, L. A., Crawford, S. A., Hausmann, G., Beaumont, J. G., Parma, L. P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M. G., et al. (2003). Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J. Cell Biol* 162, 877-887.
- Witzig, T. E., Timm, M., Larson, D., Therneau, T., et Greipp, P. R. (1999). Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Br. J. Haematol* 104, 131-137.
- Wu, S., Li, C., Chen, J., Chen, Y., Lin, C., Ho, T., et Hsiang, C. (2009). Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G involved in catalysis, magnesium coordination,

and substrate specificity. *J. Biomed. Sci* 16, 6.

- Wuilleme, S., Robillard, N., Lodé, L., Magrangeas, F., Beris, H., Harousseau, J., Proffitt, J., Minvielle, S., et Avet-Loiseau, H. (2005). Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 19, 275-278.
- Wuillème-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J., Amiot, M., et Bataille, R. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 19, 1248-1252.
- Wuillème-Toumi, S., Trichet, V., Gomez-Bougie, P., Gratas, C., Bataille, R., et Amiot, M. (2007). Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 361, 865-869.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., et Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol* 68, 251-306.
- Xu, H., Tai, J., Ye, H., Kang, C. B., et Yoon, H. S. (2006). The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-XL. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 341, 938-944.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., et Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., et Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yang, T., Buchan, H. L., Townsend, K. J., et Craig, R. W. (1996). MCL-1, a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 166, 523-536.
- Yang, X. F., Weber, G. F., et Cantor, H. (1997). A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity* 7, 629-639.
- Yao, Y., Bobkov, A. A., Plesniak, L. A., et Marassi, F. M. (2009). Mapping the interaction of pro-apoptotic tBID with pro-survival BCL-XL. *Biochemistry* 48, 8704-8711.
- Yokoyama, T., Tanahashi, M., Kobayashi, Y., Yamakawa, Y., Maeda, M., Inaba, T., Kiriyama, M., Fukai, I., et Fujii, Y. (2002). The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. *Immunol. Lett* 81, 107-113.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7, 673-682.
- Zaidi, R., et Hadi, S. M. (1992). Strand scission in DNA by gossypol and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen-free radicals. *J. Biochem. Toxicol* 7, 213-217.
- Zall, H., Weber, A., Besch, R., Zantl, N., et Häcker, G. (2010). Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Mol. Cancer* 9, 164.
- Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A. C., et Reed, J. C. (2006). Comparison of chemical inhibitors of

- antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ* *13*, 1419-1421.
- Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C., et Reed, J. C. (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J. Biol. Chem* *283*, 9580-9586.
- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J. P., Kuehl, W. M., Barlogie, B., et Shaughnessy, J. D. (2007). CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* *109*, 4995-5001.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J. P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* *108*, 2020-2028.
- Zhang, B., Gojo, I., et Fenton, R. G. (2002). Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* *99*, 1885-1893.
- Zhang, X. (2007). Targeting Nur77 translocation. *Expert Opin. Ther. Targets* *11*, 69-79.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., et Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085-1095.
- Zhu, H., Guo, W., Zhang, L., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J. J., Dong, F., et Fang, B. (2005a). Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biol. Ther* *4*, 781-786.
- Zhu, H., Zhang, L., Dong, F., Guo, W., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J. J., Chiao, P. J., et Fang, B. (2005b). Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* *24*, 4993-4999.
- Zong, W., et Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* *20*, 1-15.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., et 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.

Étude des mécanismes moléculaires dans la balance survie/apoptose des cellules de Myélome Multiple : rôle de Bik et effet de l'ABT-737

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne incurable. Malgré les avancées thérapeutiques, les patients rechutent avec l'apparition de résistances aux traitements. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes d'échappement à l'apoptose est nécessaire pour la mise en place de nouveaux traitements.

Les protéines membres de la famille de Bcl-2 sont des régulateurs clés de l'apoptose. Les complexes formés entre les membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1) et pro-apoptotiques à multidomaine ou à domaine « BH3 seul » (Bik, Bim) régissent le devenir de la cellule.

L'étude de Bik, dans les lignées de MM (LMM), montre que son expression, qui corrèle avec celle de Bcl-2, est finement régulée tant au niveau protéique que transcriptionnel. De plus, sa surexpression sensibilise ces cellules au stress oxydatif et son expression ectopique induit la mort *via* la rupture des complexes Bcl-2/Bim et Bcl-xL/Bim, soulignant son rôle important dans l'apoptose des LMM. La présence de nombreux complexes Bcl-2/Bik dans les LMM soulève l'intérêt des molécules inhibitrices de Bcl-2, tel que l'ABT-737.

Nous avons montré qu'un groupe de LMM et de cellules primaires est extrêmement sensible à cet agent. Cette sensibilité corrèle avec un ratio Bcl-2/Mcl-1 élevé, constituant un facteur prédictif de la réponse à l'ABT-737. Nous avons également mis en évidence que l'ABT-737 induit la mort très rapidement par la rupture des complexes Bcl-2/Bax et Bcl-2/Bik. Enfin, l'analyse d'une base de donnée de patients atteints de MM montre que les groupes des hyperdiploïdes et des CCND1 présentent les ratios Bcl-2/Mcl-1 les plus élevés, suggérant que l'ABT-737 puisse être proposé aux patients appartenant à ces deux groupes.

Mots clés :

Myélome Multiple, Apoptose, Bik, BH3 mimétique (ABT-737), Bcl-2, Mcl-1, t(11 ;14).

Study of molecular mechanisms in the balance of survival/apoptosis of multiple myeloma cells: role of Bik and effect of ABT-737

Multiple Myeloma (MM) is an incurable plasma cell malignancy. Despite therapeutic advances, patients relapse with emergence of drug resistance. Thus, a better understanding of apoptosis escape-related mechanisms is needed for the establishment of new targeted therapies.

Bcl-2 family members are key regulators of apoptosis. Complexes formed between anti-apoptotic (Bcl-2 and Mcl-1) and multidomain or « BH3 only » (Bik, Bim) pro-apoptotic members govern cell faith.

The study of Bik, in MM cell lines (MCL), showed that its expression, which correlates with Bcl-2, is regulated at transcriptional and protein levels. Moreover, its overexpression sensitized cells to oxidative stress and its ectopic expression induced cell death *via* Bcl-2/Bim and Bcl-xL/Bim complexes disruption, highlighting its important role in MCL apoptosis. The presence of abundant Bcl-2/Bik complexes in MCL supports the use of Bcl-2 inhibitors, like ABT-737, as targeted therapies.

We have shown that a group of MCL and primary cells were extremely sensitive at this agent. Their sensitivity correlated with a high Bcl-2/Mcl-1 ratio, which could be a predictor of ABT-737 response. We have also shown that ABT-737 induced cell death rapidly by the disruption of Bcl-2/Bax and Bcl-2/Bik complexes. Finally, the study of MM patients database showed that hyperdiploid and CCND1 groups exhibit the highest Bcl-2/Mcl-1 ratio, suggesting that ABT-737 could be used in patients belonging to these two groups.

Keywords :

Multiple Myeloma, Apoptosis, Bik, BH3 mimetic (ABT-737), Bcl-2, Mcl-1, t(11 ;14).