

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2014

N° 150

**MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret du 23 janvier 2003, tient lieu de :

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Maxime Halliez

né le 29 avril 1984, à Saint Pol sur Mer (59)

Présentée et soutenue publiquement le *20 octobre 2014*

LE CIBLAGE DE LA GLYCOLYSE PAR LE 2-DG ET DE LA VOIE
MITOCHONDRIALE PAR UN INHIBITEUR SPECIFIQUE DE BCL-2, L'ABT-199,
CONTRECARRE LA RESISTANCE A L'ABT-199 DANS LE MYELOME MULTIPLE

Président : Monsieur le Professeur Philippe Moreau

Directeur de thèse : Madame le Docteur Soraya Wuiilleme

Membres du jury : Madame le Professeur Marie Christine Béné
Madame le Professeur Berthe Marie Imbert
Madame le Docteur Martine Amiot

Remerciements

Je commencerais cette longue liste de remerciements par ma mère et à mes frères sans qui je n'aurais jamais pu faire des études de médecine et enfin arriver à la consécration qui est de soutenir ma thèse d'exercice.

Je remercie également Guerric pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de mon internat.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe 10 de l'UMR892 du CRCNA dans laquelle j'ai réalisé une grande partie de ce travail et tout particulièrement Martine Amiot qui a su m'accueillir au sein de son équipe, me confier un sujet intéressant, m'encadrer et me conseiller dans la réalisation de mon projet.

Je remercie également tout particulièrement Patricia Gomez pour l'encadrement, le temps qu'elle a consacré à ma formation et l'aide qu'elle a pu m'apporter.

Je remercie Sophie Maiga pour sa disponibilité, sa gentillesse et toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Je remercie Benoit, mon co interne de Master 2 qui m'a supporté pendant un an. Merci à ma directrice de thèse Soraya Wullemme qui m'a encadré dans ce travail ainsi qu'aux membres de mon jury de thèse. Merci à l'ensemble du laboratoire d'hématologie, notamment Marion Eveillard, Yannick Lebris, Laurence Lodé et Marie-Christine Béné. Merci également aux cliniciens sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Je remercie également le secteur d'hémostase et notamment le grand Dr Fouassier qui est toujours disponible pour moi.

Je remercie l'ensemble de l'équipe technique et notamment les gens qui m'ont soutenu au quotidien, en 1^{er} lieu Pauline mais aussi Nathalie, Stéphanie, Gwenaëlle, Samuel, Alexis, Myriam, Kadie... et tous les autres.

Je remercie l'ensemble de mes co-internes pour leur soutien notamment Marc, Erwan, Julie, Charlinne, Emilie, Clément, Thomas, Justin, Matthieu, Aurore, Julie 2, Amhine, Amélie, Gaëlle..... et tous les autres j'en oublie forcément.

Je remercie mes amis lillois à qui je pense souvent ainsi que Jérémy qui m'ont soutenu dans les moments difficiles de la maladie.

Merci à tous pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Liste des abréviations

2-DG : 2-déoxyglucose

2-DG-6P : 2-déoxyglucose-6-phosphate

AIF : Apoptosis-inducing factor

APAF-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

ATF6 : Activating transcription factor 6

ATP : Adénosine tri phosphate

BCR : B cell receptor

BH : Bcl-2 homology domain

CCND1 : Cycline D1

CDK : cyclin dependant kinase

CG : centre germinatif

CHOP : C/EBP homology protein

CPA : cellule présentatrice d'antigène

Del : Délétion

eIF2 α : eukaryotic initiation factor-2alpha

ENDO G : Endonuclease G

FGFR3 : Fibroblast growth factor receptor 3

FISH : Fluorescence in situ hybridization

GLUT : Glucose transportor

GRP78 : Glucose regulated protein 78

IAP : Inhibitor of apoptosis

Ig : Immunoglobulines

IgH : Chaîne lourde des immunoglobulines

IRE1 α : Inositol requiring kinase 1

ISS : International Staging System

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAF : musculoaponeurotin fibrosarcoma oncogene

MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance

MM : Myélome Multiple

MMSET : Multiple Myeloma Suvar, Enhancer-of-Zeste and Trithorax domain

MYC : Myelocytomatosis Viral Oncogene

NF- κ B : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

P18INK4C : Cyclin-dependant kinase inhibitor 2C (inhibe la CDK4)

PERK : double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase

RB1: Retinoblastoma 1

RE : Reticulum endoplasmique

SERCA : sarcoendoplasmic reticulum (SR) calcium transport ATPase

siRNA : Small interfering RNA

TNF α : Tumor necrosis factor α

TP53 : Tumor protein p53

UPR : Unfolded protein response

WB : Western Blot

Table des matières

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	3
Table des matières	6
Introduction.....	9
Le myélome multiple (MM).....	10
Epidémiologie	10
Physiopathologie	11
Diagnostic du MM	16
Traitement du MM	21
La voie d'apoptose mitochondriale	23
Généralités sur l'apoptose	23
Les protéines de famille de Bcl-2.....	25
Thérapies ciblées de l'apoptose	28
Métabolisme	31
Glycolyse et cancer	31
Le stress du réticulum endoplasmique	35
Problématique.....	37
Matériel et méthode	38
Culture cellulaire et réactifs	39
Conditions expérimentales.....	40
Cytométrie en flux.....	41
Western Blot.....	43
RT-PCR quantitative en temps réel	43
Dosage du lactate	47
Résultats.....	48
Le 2-DG en monothérapie tue les cellules de lignées de MM de façon hétérogène.....	49
Le 2-DG inhibe la glycolyse dans l'ensemble des lignées mais ce mécanisme semble accessoire dans l'induction de la mort.....	52
Le 2-DG est responsable d'une inhibition des N-glycosylations	54
Cette inhibition des N-glycosylations induit un stress du RE et la mise en jeu du système UPR.....	55
Le mannose restaure les N-glycosylations mais ne reverse que partiellement le stress du RE et la mort induite par le 2-DG	56
Le 2-DG induit une diminution d'expression de Mcl-1 dans l'ensemble des lignées et une augmentation modérée des BH3	58

La mort induite par le 2-DG corrèle avec la dépendance des lignées à Mcl-1 et avec le niveau basal de Bcl-2.....	59
La diminution de Mcl-1 est en partie induite par une dégradation protéasomale.....	61
La combinaison du 2-DG et de l'ABT-199 est synergique dans les lignées de MM	63
Discussion.....	65
Bibliographie	71

Introduction

Le myélome multiple (MM)

Epidémiologie

Le MM correspond à une expansion de plasmocytes clonaux au sein de la moelle osseuse. Il représente 10 à 12% de l'ensemble des hémopathies en France avec environ 4500 nouveaux cas annuels et 2800 décès. La moyenne d'âge de découverte est de 70 ans et il existe une discrète prédominance masculine avec 54% d'hommes (Belot, Velten et al. 2009).

Les facteurs de risque de prédisposition au MM sont encore à ce jour controversés. Il semblerait exister des facteurs génétiques de prédisposition comme le suggère une fréquence de survenue 2 fois supérieure chez les Afro Américains comparé aux caucasiens, de même qu'un risque accru de 3,7 fois pour les individus dont un apparenté au 1^{er} degré a présenté un MM (Brown, Linet et al. 1999; Howlader, Noone et al. 2013).

Le seul facteur de risque environnemental de prédisposition avéré sont les radiations ionisantes liées à des expositions accidentelles (Alexander, Mink et al. 2007). L'exposition aux pesticides (Kachuri, Demers et al. 2013), aux dérivés d'hydrocarbures ou à l'amiante (Linet, Harlow et al. 1987) ont été évoqués comme facteurs prédisposant mais restent controversés.

Finalement, il a été proposé qu'une stimulation antigénique induite par des infections ou des maladies inflammatoires chroniques puisse être un événement initiateur de la pathologie et donc, que des infections ou des maladies inflammatoires chroniques soient un facteur de risque. Cependant les résultats des études sont contradictoires et même si une stimulation antigénique est une hypothèse séduisante quant à la physiopathologie de la maladie, l'implication de cette stimulation dans la genèse de la maladie n'est pas certaine (Linet, Harlow et al. 1987; Brown, Gridley et al. 2008).

Physiopathologie

Pour bien comprendre la physiopathologie du MM, il convient de rappeler brièvement la lymphopoïèse B normale. En effet, la lymphopoïèse est initiée chez l'adulte dans la moelle osseuse où une cellule souche hématopoïétique multipotente va se différencier en un précurseur lymphoïde commun. L'engagement dans la lymphopoïèse B et la différenciation jusqu'au stade de lymphocyte B immature est ensuite conditionné par l'expression du facteur de transcription PAX5 et les réarrangements VDJ des chaînes lourdes puis des chaînes légères des immunoglobulines avec une succession de stades de différenciation (pré-pro-B > pro-B > pré-B > lymphocyte B immature). Le lymphocyte B immature va exprimer une Immunoglobuline IgM de surface et les lymphocytes présentant un BCR auto réactif à des antigènes présentés probablement par les cellules stromales de la moelle sont éliminés (Brown and Ceredig 2009). Les lymphocytes B non auto-réactifs naïfs quittent alors la moelle pour poursuivre leur différenciation au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Figure 1).

Le lymphocyte B naïf peut alors suivre 2 voies de différenciation, la 1ère qui est T-indépendante ne va pas nous intéresser puisqu'elle n'est pas à l'origine de plasmocytes de longue durée de vie et de la survenue des MM. La 2^{ème} nécessite la reconnaissance par le lymphocyte B naïf d'un antigène suffisamment affin pour son BCR, présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) au sein d'un follicule primaire d'un ganglion lymphatique, ainsi que la présence d'un lymphocyte T apportant un signal de costimulation. Cette reconnaissance aboutit à la formation d'un centre germinatif (CG) dans un follicule lymphoïde secondaire. Dans la zone sombre de ce CG, les lymphocytes B stimulés vont réprimer l'expression de leur BCR et de BCL-2, vont proliférer sous forme de centroblastes et vont subir un phénomène d'hypermutations somatiques des gènes des immunoglobulines. Ils migrent alors dans la zone claire, deviennent centrocytes et expriment à nouveau leur immunoglobuline de surface. Cette immunoglobuline va alors être à nouveau testée pour son affinité pour l'antigène. Les lymphocytes dont l'affinité pour l'antigène a été décruée sont conduits vers une voie d'apoptose, ceux dont l'affinité est inchangé subissent un nouveau cycle d'hypermutations somatiques, ceux dont l'affinité est accrue peuvent poursuivre leur différenciation en réalisant un switch isotypique permettant l'expression d'une IgG, une IgA ou une IgE. Ces lymphocytes sortent alors du centre germinatif en

tant que lymphocytes B mémoires switchés ou en tant que cellules plasmocytaire de courte durée de vie. Une partie de ces cellules gagnent la moelle et acquièrent une durée de vie prolongée (Swerdlow 2008). Le MM correspond à l'équivalent malin de ces plasmocytes de longue durée de vie médullaire.

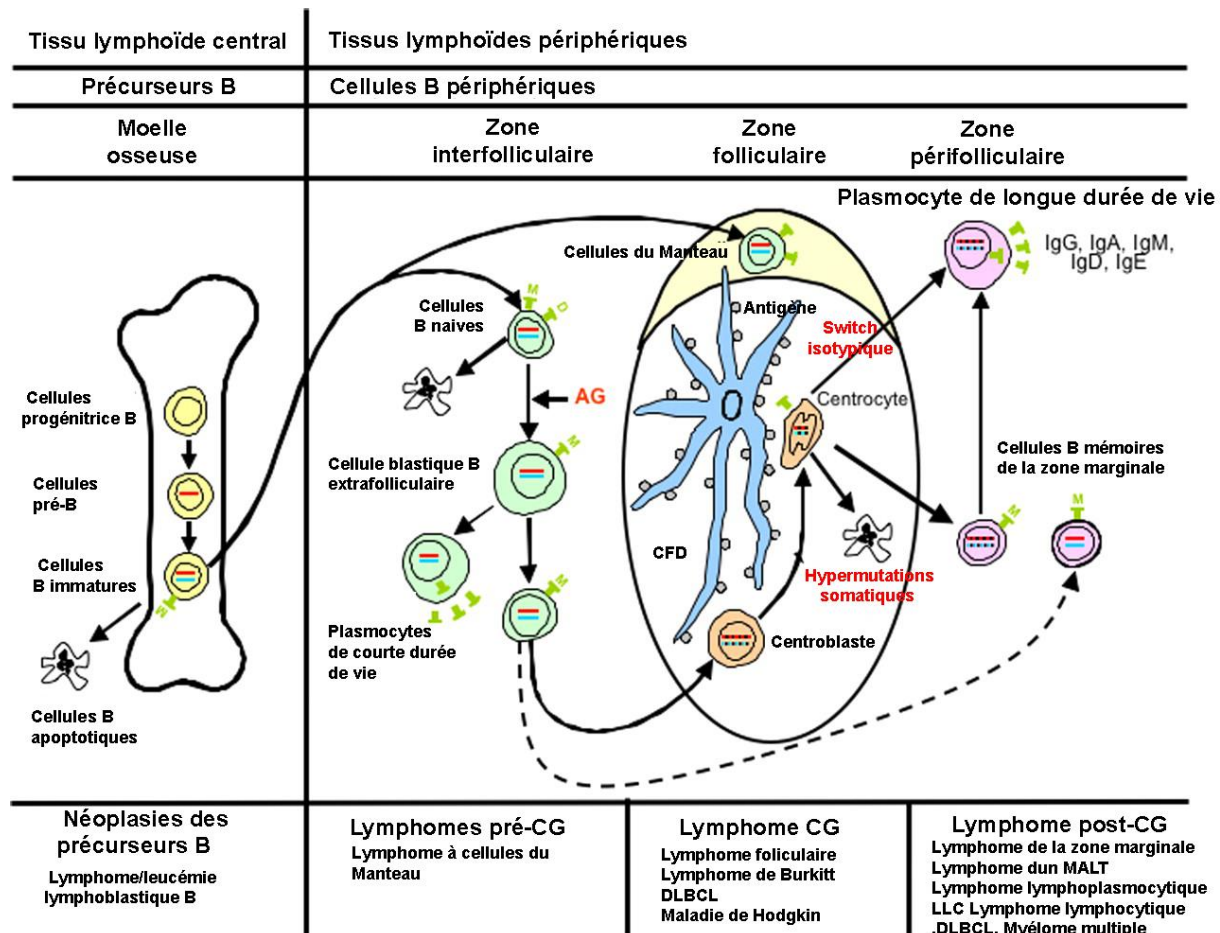


Figure 1 : Lymphopoïèse B et pathologies associées

La lymphopoïèse B débute dans la moelle osseuse où notamment les phénomènes de recombinaison VDJ des chaînes lourdes et des chaînes légères vont permettre l'obtention d'un BCR non autoréactif et la genèse d'une cellule B immature. Cette cellule quitte alors la moelle pour les organes lymphoïdes secondaires où la rencontre de l'antigène et des signaux de costimulations apportés par les lymphocytes T vont permettre la formation d'un follicule secondaire dans lequel le lymphocyte B subit les phénomènes d'hypermutation somatique permettant d'accroître l'affinité de son BCR. Certains de ces lymphocytes B de forte affinité pour l'antigène vont alors subir le switch isotypique et regagner la moelle osseuse pour former les plasmocytes de longue durée de vie, pendant normal des plasmocytes du myélome multiple (adapté de (Swerdlow 2008)).

La pathogénèse du MM et de son état pré-tumoral, la MGUS peut être schématiquement divisée en 3 phases (Figure 2) (Kuehl and Bergsagel 2012) :

- Des événements précoces qui sont en partie commun aux MGUS et au MM et qui mettent en jeu au minimum :
 - Des translocations impliquant le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines sur le chromosome 14,
 - Une hyperdiploïdie
 - La del13

Ces événements conduisent directement ou indirectement à une dérégulation des gènes des cyclines D, qui sont des éléments régulateurs essentiels du cycle cellulaire et permettent notamment l'entrée en phase G1 pour les cyclines D1, D2 et D3 par leur association avec des kinases qui sont des CDK 4 et 6 (cycline dépendant kinase).

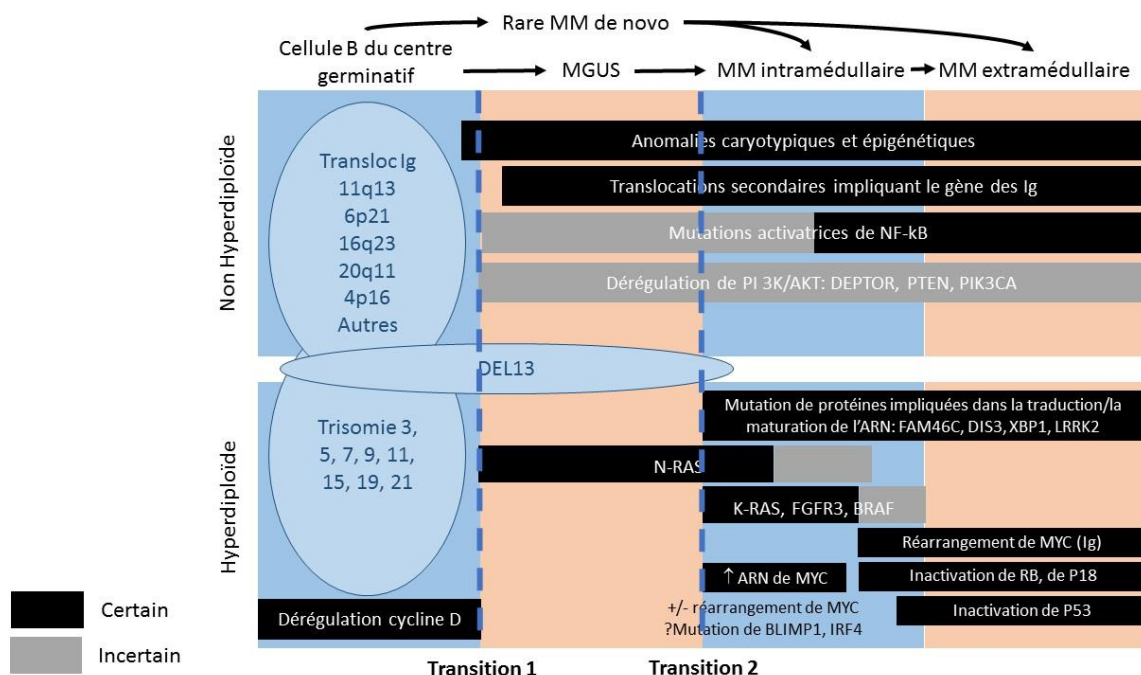


Figure 2 : Événements moléculaires impliqués dans la genèse du MM et de la MGUS

Des événements moléculaires précoces communs à la MGUS et au MM vont induire une dérégulation d'expression des cyclines D dans les cellules B du centre germinatif (Translocations primaires impliquant le gène des Ig, hyperdiploïdie). Des événements secondaires, notamment des dérégulations des voies RAS et MYC vont induire la survenue de la MGUS et du MM. Des événements plus tardifs comme les réarrangements de MYC, des anomalies de RB, de P18 ou de P53 sont responsables des disséminations extra médullaires observés dans les MM avancés (adapté de (Kuehl and Bergsagel 2012)).

Sept translocations primaires impliquant le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) sont retrouvées dans le MM et la MGUS. Le tableau 1 reprend les différents partenaires du locus IgH.

Groupe	Translocation	Gene	Pourcentage
Translocation cycline D	11q13	CCND1	15
	6p21	CCND3	2
	12p13	CCND2	<1
Translocation MMSET	4p16	MMSET	15
Translocation MAF	16q23	MAF	5
	20q12	MAFB	2
	8q24	MAFA	<1
Hyperdiploïde	D1	CCND1	33
	D1+D2	CCND1, CCND2	7
Autres	Aucun	Absence de CCND	2
	D2	CCND2	18

Tableau 1 : Différents groupes moléculaires de MM en fonction du statut cytogénétique

D'après (Kuehl and Bergsagel 2012).

Les translocations impliquant le chromosome 11, 6 ou 12 mettent directement en commun le promoteur du gène des IgH avec le gène d'une cycline D : cycline D1 pour le chromosome 11, D2 pour le chromosome 12 et D3 pour le chromosome 6.

Celles impliquant le chromosome 8, 16 ou 20 induisent une hyperexpression du facteur de transcription MAF qui régule notamment l'expression de la cycline D2.

La t(4 ; 14) induit une hyperexpression de MMSET qui est un facteur de remodelage de la chromatine et dans 75% des cas une hyperexpression du FGFR3. Cette translocation conduit à une hyperexpression de la cycline D2 dont le mécanisme n'est actuellement pas connu.

L'hyperdiploïdie peut également être à l'origine d'une hyperexpression des cyclines D notamment de la D1 par une augmentation du nombre de copies du gène (chromosome 11).

Les rares myélomes qui n'hyperexpriment pas de cycline (moins de 5% des cas) ont souvent une inactivation de RB1. Les cyclines par leur association avec leur CDK vont induire une phosphorylation de RB1, libérant ainsi le facteur E2F et permettant l'initiation de la phase S. Ainsi l'inactivation de RB1 est un événement oncogénique équivalent à l'hyperexpression des cyclines.

Finalement, la del13, dont la conséquence n'est pas encore élucidée, pourrait induire une haploinsuffisance de RB1.

- Des événements supplémentaires vont induire la transition du stade MGUS à MM et impliquent une augmentation d'expression de MYC et parfois des mutations de KRAS.
- Finalement la progression du MM est associée à d'autres événements. Ainsi une augmentation de la prolifération, une instabilité génomique, une indépendance progressive du microenvironnement peuvent être associés à des réarrangements de MYC qui impliquent fréquemment des locus des Ig, des mutations activatrices de la voie NF- κ B, des délétions ou des mutations de TP53 et une inactivation de p18INK4c ou de RB1.

Une hyperstimulation antigénique pourrait être à l'origine des événements précoces de la tumorigénèse myélomateuse mais cette hypothèse est actuellement débattue (Linnet, Harlow et al. 1987; Brown, Gridley et al. 2008). De même, le micro environnement semble jouer un rôle critique mais complexe dans le MM que nous avons décidé de ne pas aborder dans ce manuscrit (Bazzi and Badros 2010).

Diagnostic du MM

Le diagnostic de MM repose sur un cortège d'arguments clinico-biologiques permettant d'objectiver un état pré-tumoral qu'est la MGUS, du MM indolent, exempt de manifestations cliniques, et du MM symptomatique (Tableau 2) (Swerdlow 2008).

MM symptomatique
Immunoglobuline monoclonale dans le sang ou l'urine
Plasmocytes clonaux dans la moelle ou plasmocytome
Atteinte organique ou tissulaire associée (CRAB : hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie, lésions osseuses)
MM asymptomatique
Immunoglobuline monoclonale dans le sang (> 30 g/l)
ET/OU
10 % ou plus de plasmocytes clonaux dans la moelle osseuse
Absence de symptomatologie imputable au MM

Tableau 2 : Critères de distinction du MM asymptomatique et du MM symptomatique

La MGUS est définie par la présence dans le sang du patient d'un pic monoclonal inférieur à 30 g/l mis en évidence par l'électrophorèse des protéines sériques et par une immunofixation (figure 3), l'absence de plasmocytose significative dans la moelle osseuse (plasmocytes < 10% des cellules de la moelle) et l'absence de critères cliniques du CRAB. La MGUS va évoluer en MM à la fréquence de 1% par an.

Le myélome multiple indolent correspond à un pic monoclonal sérique habituellement supérieur à 30 g/l pour les IgG, 20 g/l pour les IgA et/ou à plus de 10% de plasmocytes dans la moelle osseuse en l'absence de critères du CRAB.

Finalement le diagnostic de MM symptomatique est retenu s'il existe une protéine monoclonale sérique habituellement supérieure 30 g/l pour les IgG (50% des patients), 20 g/l pour les IgA (20% des patients), rarement un pic IgD, IgE, IgM ou biclonal (<10% des patients) ou des chaînes légères libres urinaires supérieures à 1 g/24h (20% des

patients) (Anon 2003) associé à une plasmocytose médullaire supérieure à 10% avec habituellement dystrophie plasmocytaire (Figure 4) et l'un des critères du CRAB.

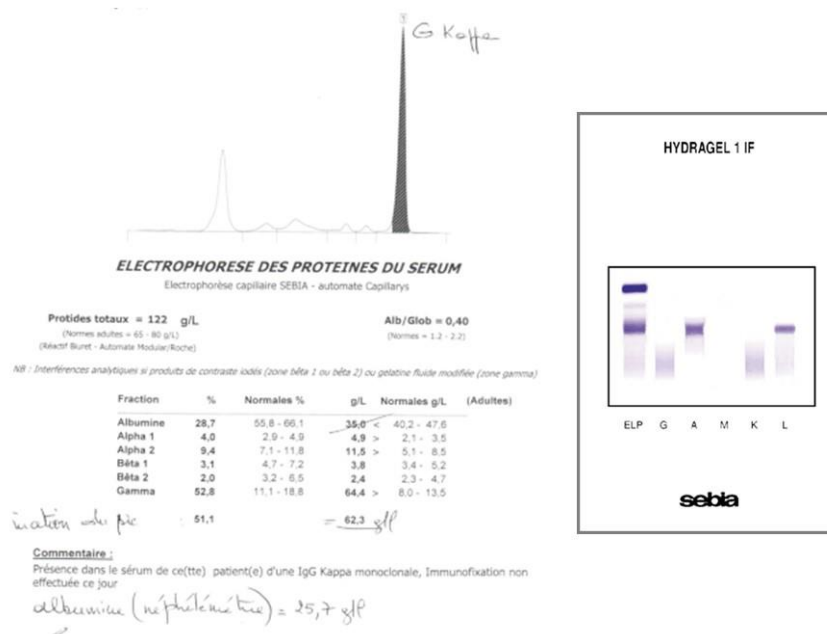
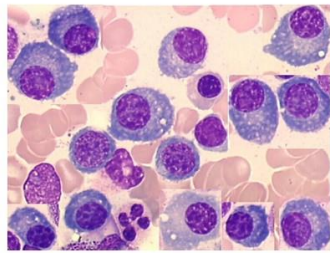
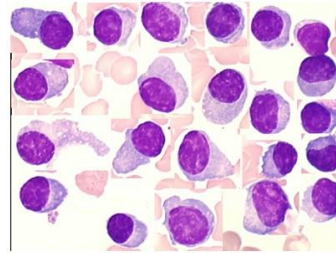


Figure 3 : Exemple d'électrophorèse des protéines sériques

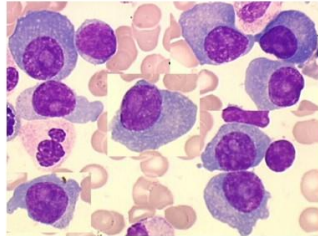
Exemple de profil électrophorétique des protéines sériques réalisé au sein du laboratoire de Biochimie du laboratoire de Nantes et montrant la présence d'un pic dans la zone des Gamma estimé à 51,1% des protéines totales (électrophorèse capillaire Capillarys). La réalisation d'une immunofixation (image de droite) à l'aide d'antisérums spécifiques des chaînes lourdes et des chaînes légères permet ensuite de caractériser la nature de la protéine monoclonale.



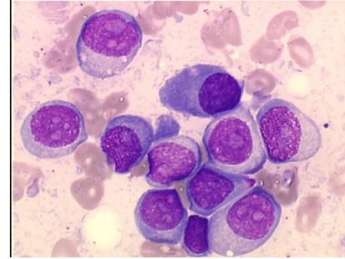
Type I: Forme mature (16% des MM)



Type II: Forme mature, lymphoplasmocytoïde (15% des MM)



Type III: Forme intermédiaire (55% des MM)



Type IV: Forme immature, plasmablastique (14%)

Figure 4 : Différents variant morphologiques de myélome multiple

Les plasmocytes du MM présentent habituellement des dystrophies morphologiques. Une classification morphologique des plasmocytes a été développée classant les plasmocytes en 4 catégories en fonction de leurs atypies (images R. Garand, laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes).

Les critères du CRAB sont définis par (Kyle and Rajkumar 2009):

- Une calcémie supérieure d'au moins 0,25 mmol/L à la limite supérieure à la normale ou supérieure à 2,75 mmol/L
- Une insuffisance rénale avec une créatinine supérieure 173 μ mol/L
- Une anémie avec une valeur d'hémoglobine inférieure de 2 g/dL à la limite inférieure de la normale ou < 10 g/dL
- Des lésions osseuses : lyses osseuses, ostéopénie sévère ou fractures pathologiques

Dans environ 3 % des cas, le MM peut être non sécrétant, le diagnostic nécessitera alors un envahissement plus massif de la moelle osseuse par les plasmocytes avec au moins 30% des cellules de la moelle représentées par des plasmocytes. Dans 2/3 des cas, la présence de chaînes libres plasmatiques augmentées ou d'un ratio anormal peut être détectée et sera informatif.

De nouveaux outils biologiques sont venus s'ajouter à l'arsenal diagnostique, se présentant comme des aides diagnostiques mais également comme des outils à visée pronostique. Ainsi la cytométrie en flux permet d'objectiver dans des approches multicolours (7 ou 8 couleurs) le caractère clonal des plasmocytes en montrant la

restriction isotypique de ceux-ci en intracytoplasmiques mais également en mettant en évidence des modulations de certains marqueurs de surface (Robillard, Wulleme et al. 2014) (Figure 5) :

- Diminution d'expression du CD38, du CD19 ou du CD27 par rapport aux plasmocytes normaux
- Expression aberrante du CD56, du CD28, du CD33, du CD117 ou du CD20

Paiva et Al. vont plus loin en se servant du pourcentage de plasmocytes anormaux par rapport aux plasmocytes totaux afin de prédire le risque de transformation de la MGUS en MM et du MM indolent en MM symptomatique avec un cutt off à 95%. Finalement la cytométrie en flux permet la réalisation d'une maladie résiduelle post-traitement dans le MM, qui est prédictive de la survie sans progression et de la survie globale du patient et qui pourrait permettre dans le futur d'adapter nos prise en charge thérapeutique en fonction de ce paramètre (Paiva, Almeida et al. 2010).

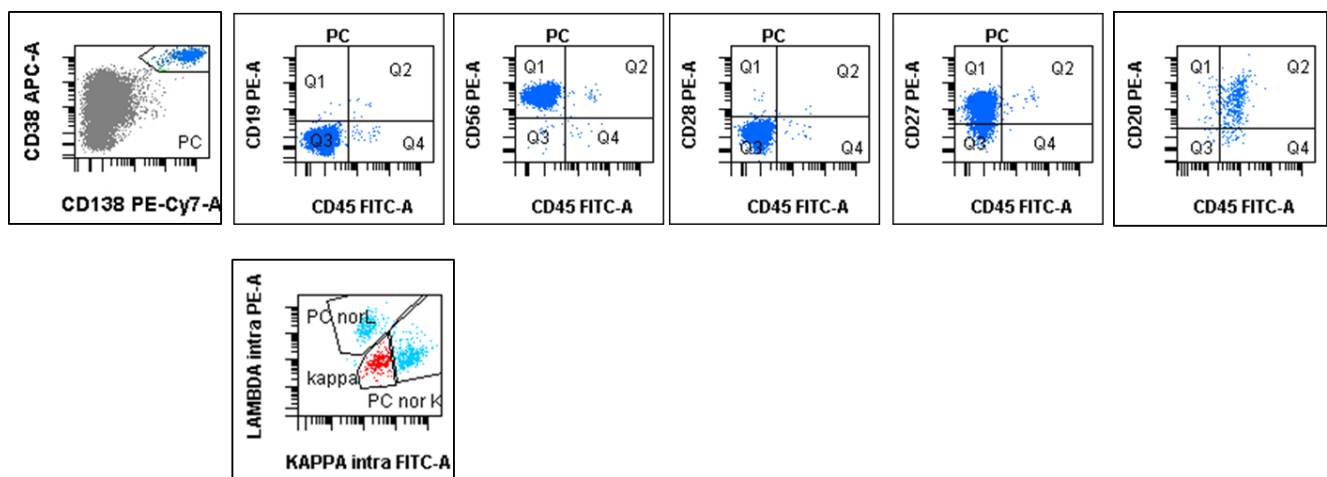


Figure 5 : Exemple de phénotypage des plasmocytes au sein d'une moelle

L'utilisation d'une combinaison de fluorochromes 7 couleurs au sein d'un même tube permet dans un 1^{er} temps de sélectionner la population plasmocytaire exprimant fortement le CD38 et le CD138, puis d'évaluer le niveau d'expressions de marqueurs qui vont être modulés sur les plasmocytes pathologiques, ainsi dans cet exemple les plasmocytes ont perdus l'expression du CD19 et pour certains du CD27, ils ont acquis l'expression du CD56 pour l'ensemble de la population et du CD20. L'ensemble de ces modulations antigéniques permet de définir une population de plasmocytes anormaux et de les quantifier. Cette approche peut être complétée par l'évaluation de l'expression des chaînes légères en intracytoplasmique dans les plasmocytes sur l'ensemble ou une partie de la population définie par l'expression aberrante de marqueurs (graphe du bas) et qui permet d'individualiser des populations restreintes pour l'expression des chaînes légères donc pathologiques.

De même la cytogénétique avec la recherche par FISH interphasique de la t(11 ; 14), de la t(14 ; 16) et de la del17p, va apporter des arguments en faveur du caractère malin des plasmocytes mais aussi offrir des marqueurs à visée pronostique, qui vont permettre une stratification des patients et qui vont conditionner l'approche thérapeutique (Avet-Loiseau, Attal et al. 2012). La grande hétérogénéité moléculaire du MM permet de distinguer différents sous types en fonction d'anomalies chromosomiques, ainsi 50% des patients présentent une hyperdiploïdie et 50% des translocations récurrentes mettant en jeu le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines en 14q32 avec les chromosomes 4, 6, 11 et 16. Les 3 principales translocations sont les t(4 ;14), t(11 ;14) et t(14 ;16) impliquant respectivement MMSET, CCND1 et MAF (Zhan, Huang et al. 2006). Ces translocations corrélerent avec le pronostic et des patients présentant une t(14 ;16) ou une t(4 ;14) présentent un pronostic plus péjoratif (Keats, Reiman et al. 2003). De même, des anomalies du gène TP53 associées dans 37% des cas à des délétions du bras court du chromosome 17 (délétion, mutation ponctuelle, insertion, défaut d'expression) sont observées au cours de l'évolution des MM et fréquemment dans les lignées de myélome multiple et sont également associées à un pronostic plus péjoratif (Lode, Eveillard et al. 2010).

L'historique classification de Durie et Salmon qui permettait une évaluation approximative de la masse tumorale est de moins en moins utilisée. Un autre outil de stratification des patients dans le MM est le score ISS prenant en compte le taux de $\beta 2$ microglobuline et l'albumine et permet de séparer les patients en 3 groupes au devenir très différent (Greipp, San Miguel et al. 2005) (Tableau 3).

Stade	Critères	Survie médiane (mois)
I	• 2M* < 3,5 mg/l et albumine sérique > 35 g/l	62
II	ni I ni III	44
III	• 2M > 5,5 mg/l	29

Tableau 3 : Score ISS et survie médiane

Traitement du MM

Le traitement historique du MM repose sur l'association de corticoïdes : la prédnisone, qui a une action directe sur la tumeur relativement modérée mais à surtout une action sur le microenvironnement tumoral, anti-inflammatoire ; avec un agent alkylant : le melphalan, qui va interagir avec l'ADN induisant notamment la formation de liaisons double brin et empêchant ainsi la réplication (Alexanian, Haut et al. 1969).

Le thalidomide, médicament à action anti-inflammatoire, immuno modulatrice et potentiellement antitumorale directe (Palumbo, Miguel et al. 2008) ainsi que le velcade, inhibiteur du protéasome, sont 2 molécules qui sont venues compléter la combinaison Melphalan Prednisone.

Ainsi, à l'heure actuelle, le traitement du MM indolent n'est pas recommandé.

Le traitement devra être initié devant tout MM symptomatique et il sera conditionné par l'âge du patient et son éligibilité à l'autogreffe (Moreau, San Miguel et al. 2013) :

- Pour les patients les plus âgés, non éligibles à l'autogreffe, une association de Melphalan Prednisone et Thalidomide (MPT) (Hulin, Facon et al. 2009) ou Velcade (MPV) (San Miguel, Schlag et al. 2008) sera proposée en 1^{er} ligne. Une option alternative chez les patients présentant une neuropathie est l'utilisation de Bendamustine, un autre agent alkylant, associée à de la prednisone (Ponisch, Mitrou et al. 2006).
- Pour les patients plus jeunes (age < 65 ans et/ou fit), une induction suivie de hautes doses de chimiothérapies et d'une autogreffe de cellules souches est le traitement standard (Attal, Harousseau et al. 1996; Child, Morgan et al. 2003; Moreau, Avet-Loiseau et al. 2011). Un schéma d'induction comportant 3 à 4 cycles d'une association bortezomib / dexaméthasone / 3^e agent (thalidomide, doxorubicine, lenalidomide, cyclophosphamide) est le standard actuel. Le Melphalan à 200 mg/m² est le standard d'intensification avant autogreffe.

Ni la consolidation, ni la maintenance ne sont à ce jour recommandées.

Le traitement de la rechute ou des maladies réfractaires dépend de plusieurs critères comme l'âge, le performance status, les comorbidités, les traitements antérieurs. Les combinaisons lenalidomide dexaméthasone (Dimopoulos, Spencer et al. 2007) et bortezomib seul ou en combinaison avec la dexaméthasone sont des schémas utilisés à la rechute (Richardson, Sonneveld et al. 2005), la combinaison lenalidomide

bendamustine est également une combinaison efficace (Moreau 2012). Une seule étude a montré l'intérêt d'une combinaison du VTD dans les MM rechutant après autogreffe (Garderet, Iacobelli et al. 2012). Chez les patients jeunes, une 2^e autogreffe devra être envisagée. Finalement, les patients pourront être inclus dans des protocoles d'essais de nouveaux médicaments comme le carfilzomib, un inhibiteur du protéasome de 2^e génération, ou les inhibiteurs d'histones désacétylases, les anticorps monoclonaux ciblant les plasmocytes...

Le suivi de la réponse aux thérapeutiques est basé sur des éléments biologiques et cliniques. Le tableau 4 ci-dessous reprend ces critères :

Sous-catégorie de réponse	Critères de réponse
Réponse complète (RC) Moléculaire	RC plus ASO-PCR négative (Sensibilité 1.10^{-5})
RC phénotypique	RC stringente et absence de plasmocytes anormaux dans la moelle osseuse avec au minimum 1 million de cellules médullaires acquises par un cytomètre multicouleurs (> 4 couleurs)
RC stringente	RC plus ratio des free light normal et absence de plasmocytes en immunohistochimie ou en cytométrie 2 à 4 couleurs
RC	Immunofixation du sang et des urines négative Disparition de tous les plasmocytomes des tissus mous et $\leq 5\%$ de plasmocytes dans la moelle osseuse
Très bonne réponse partielle	Protéine monoclonale détectable dans le sang ou le surines par immunofixation mais pas à l'électrophorèse ou réduction d'au moins 90% de la protéine monoclonale sérique et protéinurie monoclonale < 100 mg/24h
Réponse partielle	$\geq 50\%$ du taux de protéine monoclonale sérique et réduction de la protéinurie monoclonale $\geq 90\%$ ou < 200 mg/24h Si la protéine monoclonale sérique et urinaire est indétectable, une diminution de $\geq 50\%$ des free light est requise Si les free light ne sont pas mesurables, $\geq 50\%$ de diminution de plasmocytes dans la moelle osseuse (taux de base des plasmocytes $\geq 30\%$) En plus, si présent au diagnostic, diminution $\geq 50\%$ des plasmocytomes des tissus mous

Tableau 4 : Critères de réponse aux thérapeutiques dans le MM

D'après (Moreau, San Miguel et al. 2013)

A ce jour, malgré des progrès thérapeutiques constants, le myélome multiple reste une pathologie incurable.

La voie d'apoptose mitochondriale

Généralités sur l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme physiologique par lequel la cellule va être conduite dans une voie de mort non immunologique en réponse à des facteurs extrinsèques ou intrinsèques. Elle met en jeu 2 voies qui peuvent converger induisant au final l'activation de caspases effectrices (Cotter 2009) (Figure 6).

La voie extrinsèque passe par l'activation de récepteurs de mort, notamment les récepteurs au $\text{TNF}\alpha$ et les récepteurs au ligand FAS. Ces récepteurs sont associés à des domaines de mort (Death Domain = DD) qui vont permettre le recrutement de domaines effecteurs de mort et l'activation de la caspase 8. Cette caspase va induire l'activation de la caspase 3 effectrice mais aussi le clivage de Bid, enclenchant également une apoptose par la voie mitochondriale (Wong 2011).

La voie intrinsèque ou mitochondriale met en jeu un ensemble de protéines qui vont induire l'apoptose notamment par le biais de la formation de l'apoptosome formé de la caspase 9, de la protéine APAF-1 et du cytochrome C. Cet apoptosome va notamment induire l'activation de la caspase 3. Le relargage du cytochrome C nécessite la formation de pores mitochondriaux, cet événement est hautement régulé par des protéines de la famille de Bcl-2 que nous décrirons dans le paragraphe suivant. Ces pores qui sont essentiels à l'initiation de l'apoptose vont également permettre le relargage d'autres protéines pro-apoptotiques comme SMAC/ DIABLO ou OMI qui sont des protéines inhibitrices des IAP (inhibitors of apoptosis), l'AIF (apoptosis inducing factor) et l'ENDOG induisent une apoptose indépendante des caspases en induisant une condensation et une fragmentation de la chromatine (Indran, Tufo et al. 2011).

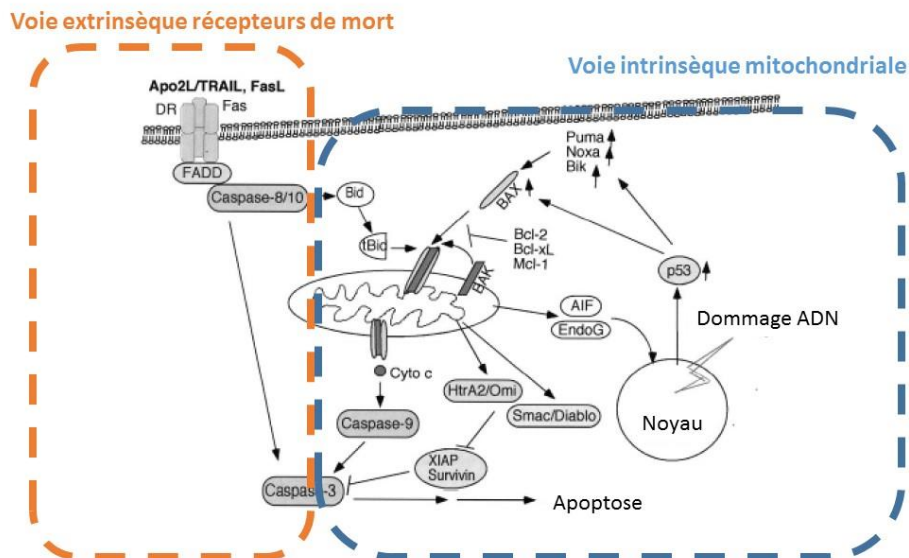


Figure 6 : Les 2 voies d'apoptose

L'apoptose par la voie des récepteur de morts implique une interaction ligand récepteur à la surface de la cellule, les ligands sont notamment FasL, TRAIL, TNFa. Cette interaction induit l'activation de la caspase 8 par l'intermédiaire des domaines FADD. Cette caspase active la caspase 3 effectrice mais clive également Bid induisant l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale.

L'apoptose mitochondriale met en jeu habituellement un signal de stress (stress du réticulum, dommage à l'ADN...) qui va conduire à un déséquilibre au sein des protéines de la famille de Bcl-2 aboutissant au recrutement de BAK et ou BAX et à la formation de pores mitochondriaux. Les substances libérées de la mitochondrie et notamment le cytochrome C ont un fort pouvoir pro-apototique. Ce cytochrome C contribue à la formation de l'apoptosome qui conduit à l'activation de la caspase 3 effectrice.

D'après (Oancea, Mani et al. 2004).

Les protéines de famille de Bcl-2

La voie mitochondriale est finement régulée par les protéines de la famille de Bcl-2. Ces protéines présentent des homologies de structures avec des domaines BH (Bcl-2 homology) communs (Youle and Strasser 2008) (Figure 7). Elles peuvent être distinguées en 3 sous-groupes selon leur fonction:

- les protéines anti apoptotiques représentées notamment par Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2-A1, Bcl-w. Ces protéines présentent habituellement 4 domaines BH et ont au moins les domaines BH1 et BH2 en commun. Leur structure permet la formation d'une poche hydrophobe essentielle pour leur fonction. Cette poche permet la séquestration des protéines effectrices et sensibilisatrices de la famille de Bcl-2 favorisant ainsi la survie cellulaire.
- les protéines pro-apoptotiques effectrices que sont Bax, Bak et Bok. Ces protéines possèdent 3 domaines BH. Leur oligomérisation est responsable de la formation des pores au niveau de la membrane mitochondriale, permettant le relargage du cytochrome C et des autres molécules à activité pro-apoptotique. Plusieurs mécanismes d'activation de ces molécules ont été décrits, ainsi une activation directe par certaines molécules BH3-only activatrices comme PUMA, BIM ou Bid pourraient induire un changement conformationnel direct de Bax et ainsi son oligomérisation. De même, ces protéines seraient inactivées par leur séquestration par des protéines anti-apoptotiques. Leur libération pourrait ainsi induire leur activation.
- les protéines pro-apoptotiques BH3-only sensibilisatrices $\pm$ activatrices qui ont en commun de ne posséder qu'un domaine BH, le domaine BH3. Ces protéines sont les plus nombreuses, elles sont représentées par BIM, NOXA, PUMA, Bid, BAD, HRK, BMF, BIK. Elles ont toutes une fonction sensibilisatrice. En fonction de leur spécificité et de leur affinité pour les molécules anti-apoptotiques, ces protéines vont déloger les protéines effectrices de leur partenaire anti-apoptotique, sensibilisant les cellules à l'apoptose (Figure 8).

L'ensemble de ces protéines, dans les cellules vivantes, est dans un état d'équilibre. Des stress cellulaires aboutissent à l'activation ou à la synthèse de molécules pro-apoptotiques (BH3-only notamment) faisant basculer la cellule sur un versant pro-apoptotique (Figure 9).

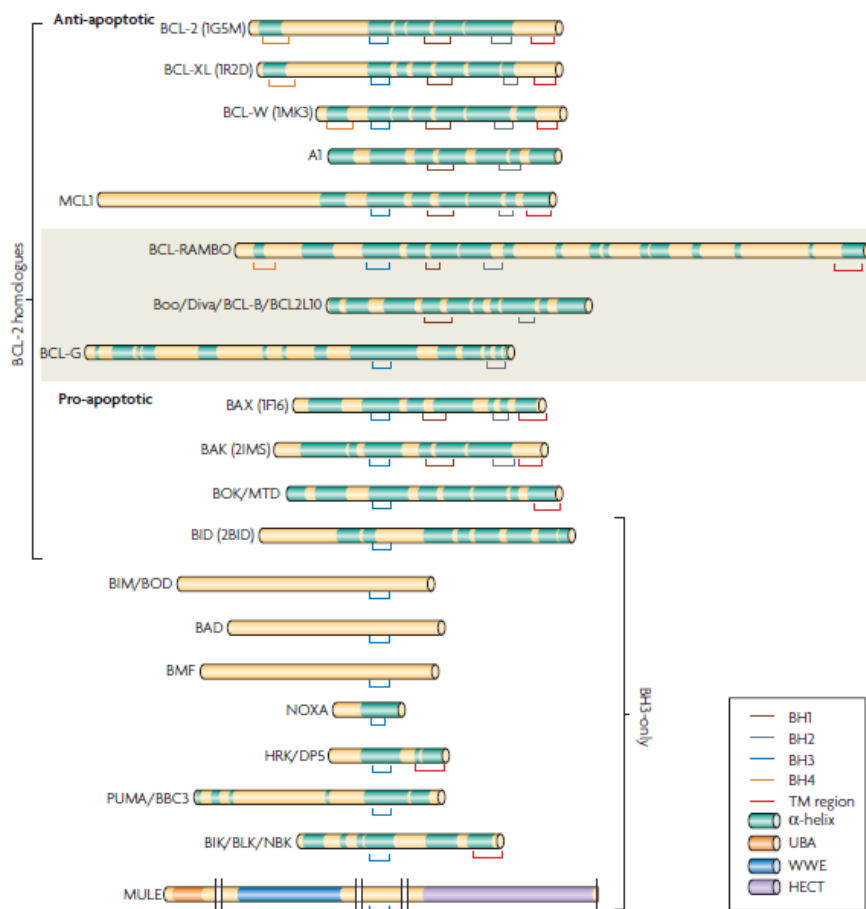


Figure 7 : Protéines de la famille de Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont divisées en anti apoptotiques et en pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques sont-elles mêmes divisées en effectrices (BAX, BAK et BOK) et en BH3-only.

D'après (Youle and Strasser 2008)

	Effecteurs		Sensibilisateurs					
	BIM	BID	BAD	BIK	NOXA	HRK	PUMA	BMF
BCL-2	Red	Red	Red	Orange	Green	Green	Red	Red
BCL-XL	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red
BCL-w	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red
MCL-1	Red	Red	Green	Orange	Red	Green	Red	Red
BFL-1	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green

Figure 8 : Affinité des protéines pro-apoptotiques effectrices et sensibilisatrices pour les protéines anti-apoptotiques

Les cases rouges signent une forte affinité entre pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, une case orange une affinité intermédiaire et une case verte une affinité très faible voir l'absence d'affinité.

D'après (Ni Chonghaile and Letai 2008)

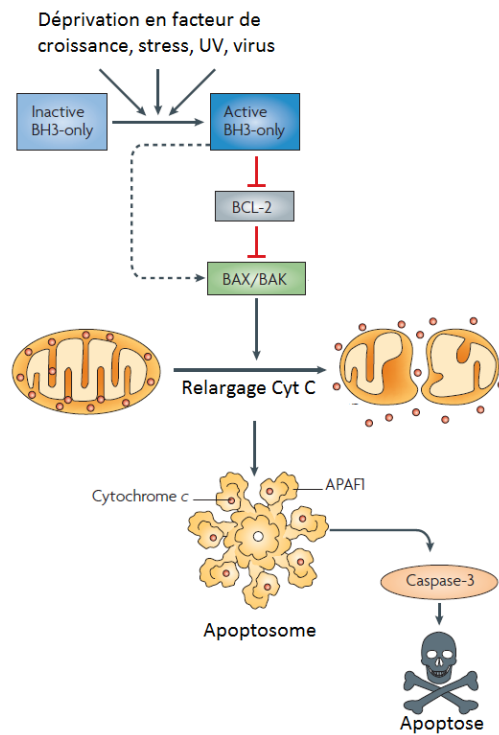


Figure 9 : Equilibre au sein des protéines de la famille de Bcl-2 et apoptose

A l'état basal, il existe un équilibre entre protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et effectrices comme BAK ou BAX permettant le maintien de l'intégrité mitochondriale. Un déficit en facteurs de croissance, le stress, les UV, les virus vont induire l'activation ou la synthèse de pro-apoptotiques qui vont déplacer l'équilibre vers un versant pro-apoptotique en se liant aux protéines anti-apoptotiques conduisant à l'oligomérisation de BAX et/ou BAK et à la formation de pores mitochondriaux. Le cytochrome C mitochondrial est alors relargué et l'apoptosome peut être formé induisant l'apoptose.

D'après (Youle and Strasser 2008)

Thérapies ciblées de l'apoptose

La dérégulation des mécanismes d'apoptose et notamment de la voie mitochondriale est un événement fréquent dans le cancer. Par exemple, dans le MM, il existe une augmentation globale de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 mais également de Bcl-2 dans un sous-groupe de MM, les MM présentant une t(11 ;14) (Gomez-Bougie and Amiot 2013). Ces dérégulations permettent aux cellules tumorales de résister à l'apoptose mais cette résistance repose fréquemment sur un équilibre précaire entre molécules pro et anti-apoptotique. Bouleverser cet équilibre est une solution thérapeutique qui est en train d'émerger avec l'apparition de molécules BH-3 mimétiques qui peuvent interagir avec la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, entraînant un déséquilibre de la balance anti-apoptique/pro-apoptotique et sensibilisant la cellule à l'apoptose (Ni Chonghaile and Letai 2008) (Figure 10). L'ABT-199 fait partie de ces nouvelles thérapies ciblées et est spécifique de Bcl-2, il vient de par sa conformation tridimensionnelle, s'enchâsser dans la poche hydrophobe de Bcl-2 libérant les molécules sensibilisatrices ou effectrices associées à Bcl-2 (Figure 11). Touzeau et Al. a montré que cette molécule était très efficace in vitro dans le sous-groupe de MM avec t(11 ;14) présentant un ratio Bcl-2/Mcl-1 élevé (Touzeau, Dousset et al. 2013). De plus, des expériences de siRNA de Mcl1 dans des lignées de MM sensibilisent des lignées habituellement peu sensibles à l'ABT-199 montrant que le niveau d'expression de Mcl-1 est associé à la résistance des lignées à l'ABT-199 (Figure 12). Cette molécule est actuellement en cours d'essai de phase 1 dans le MM, cependant elle devrait être peu efficace dans les autres sous-groupes de MM et il serait intéressant de trouver une association synergique qui permettrait de traiter un nombre plus important de patients.

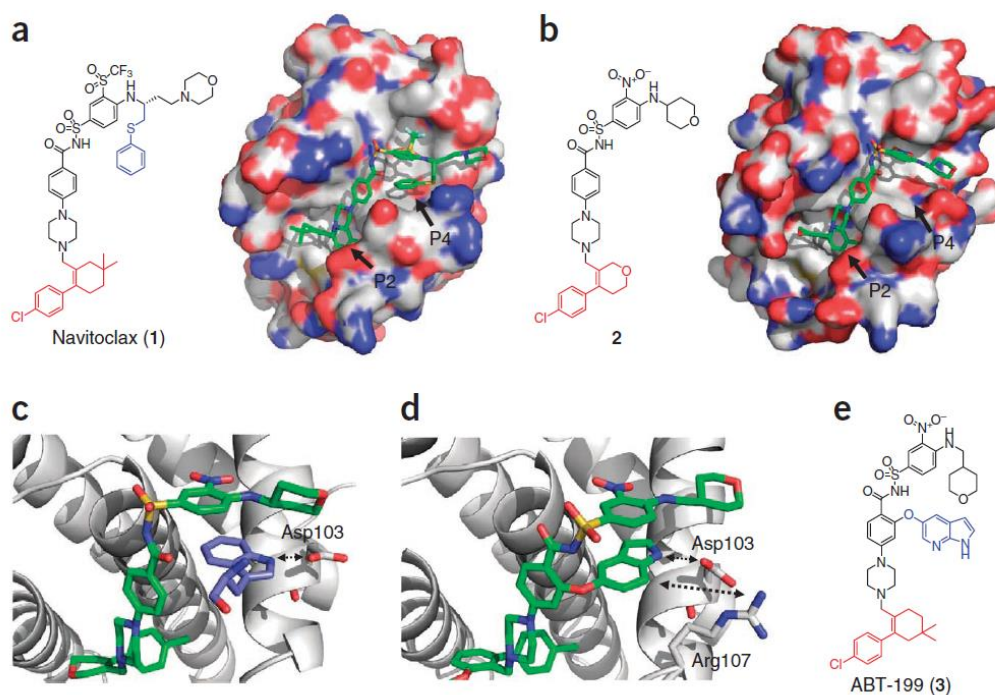


Figure 10 : Découverte de l'ABT-199

Le NAVITOCCLAX (1) fait partie des 1^{ères} molécules BH3-mimétiques qui ont été développées. Il a une affinité pour Bcl-2 mais aussi pour Bcl-xL ce qui explique l'effet secondaire majeur de cette molécule qui est très thrombopénisante du fait d'une survie des mégacaryocytes essentiellement dépendante de Bcl-xL. L'interaction avec la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-xL se fait au niveau du point chaud P4 pour la partie thiophenyl de la molécule et le point chaud P2 pour la partie 1-chloro-4-(4,4-diméthylcyclohex-1-enyl)benzene.

La modification du NAVITOCCLAX pour augmenter son affinité pour Bcl-2 a conduit à la suppression de la partie thiophenyl de la molécule, qui accroît de façon modérée la spécificité pour Bcl-2 (2).

L'ajout d'un motif indole a permis à la fois d'accroître la spécificité pour Bcl-2 tout en ayant une forte affinité pour cette molécule et a abouti à l'ABT-199 (d et e).

D'après (Souers, Levenson et al. 2013)

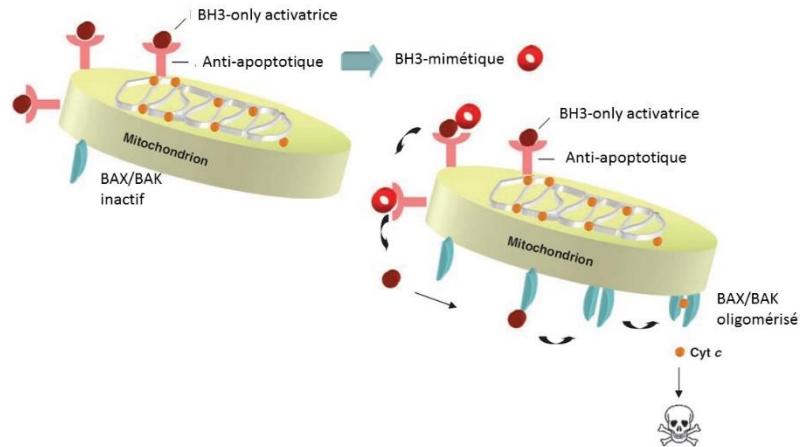


Figure 11 : Mécanisme d'action des BH3 mimétiques

A l'état de basal, il existe un équilibre entre protéines anti-apoptotiques et BH3-only activatrice permettant le maintien de BAK et BAX dans un état inactif et donc la préservation de l'intégrité membranaire mitochondriale. Les BH3-mimétiques, s'ils ont une affinité plus importante pour la protéine anti-apoptotique que la BH3-only qui lui est associée, vont prendre la place de cette BH3-only au niveau de la poche hydrophobe de la protéine anti-apoptotique. Cette BH3-only libre va pouvoir alors activer BAX et/ou BAK induisant leur oligomérisation et le relargage de cytochrome C de la mitochondrie.

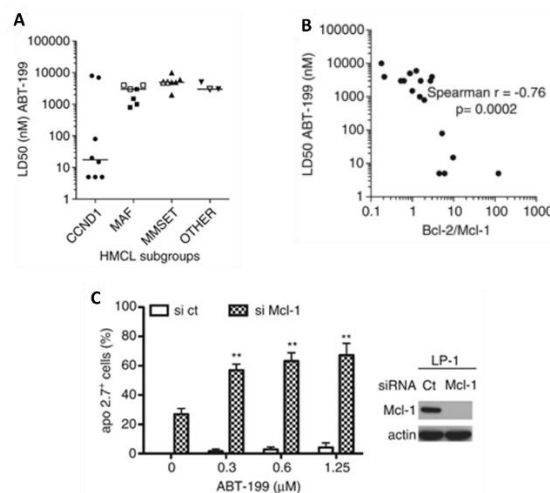


Figure 12 : Evaluation de l'ABT-199 dans le MM

(A) La détermination des doses létales 50 (LD50) sur des lignées de MM permet de distinguer un sous-groupe de lignée très sensible caractérisée au plan moléculaire par une *t(11 ; 14)* induisant une hyperexpression de la cycline D1 (CCND1). (B) Il existe une corrélation forte entre le ratio Bcl-2/Mcl-1 évalué par PCR et la sensibilité des lignées à l'ABT-199. Les lignées présentant le plus haut niveau de Bcl-2 et le plus bas de Mcl-1 sont les plus sensibles à l'ABT-199. (C) La résistance à l'ABT-199 est en partie liée au niveau d'expression de Mcl-1, ainsi des expériences de down régulation de Mcl-1 par siRNA dans des lignées les sensibilisent à l'ABT-199.

Métabolisme

Glycolyse et cancer

La dérégulation du métabolisme émerge actuellement comme un élément clé de la tumorigénèse (Hanahan and Weinberg 2011). Cibler le métabolisme énergétique pourrait être une solution thérapeutique efficace, en effet, les cellules tumorales prolifèrent continuellement, leurs besoins énergétiques et en macromolécules sont donc conséquents (Tennant, Duran et al. 2010; Tabas and Ron 2011). Ces cellules possèdent généralement un métabolisme énergétique particulier et synthétisent leur ATP essentiellement par le biais d'une glycolyse y compris en condition d'aérobiose, c'est l'effet Warburg. Ce processus énergétique possède un faible rendement, globalement 4 molécules d'ATP sont synthétisées par ce biais contre 36 par la phosphorylation oxydative (Figure 13). Plusieurs hypothèses ont été proposées quand à ce changement vers la glycolyse aérobie, par exemple le fait que le substrat énergétique soit habituellement en excès chez les mammifères, la nécessité de générer des quantités importantes de macromolécules afin de produire de la biomasse, l'importance de limiter la synthèse de ROS qui sont produits en quantité importante par la voie mitochondriale et de les détoxifier (Vander Heiden, Cantley et al. 2009).

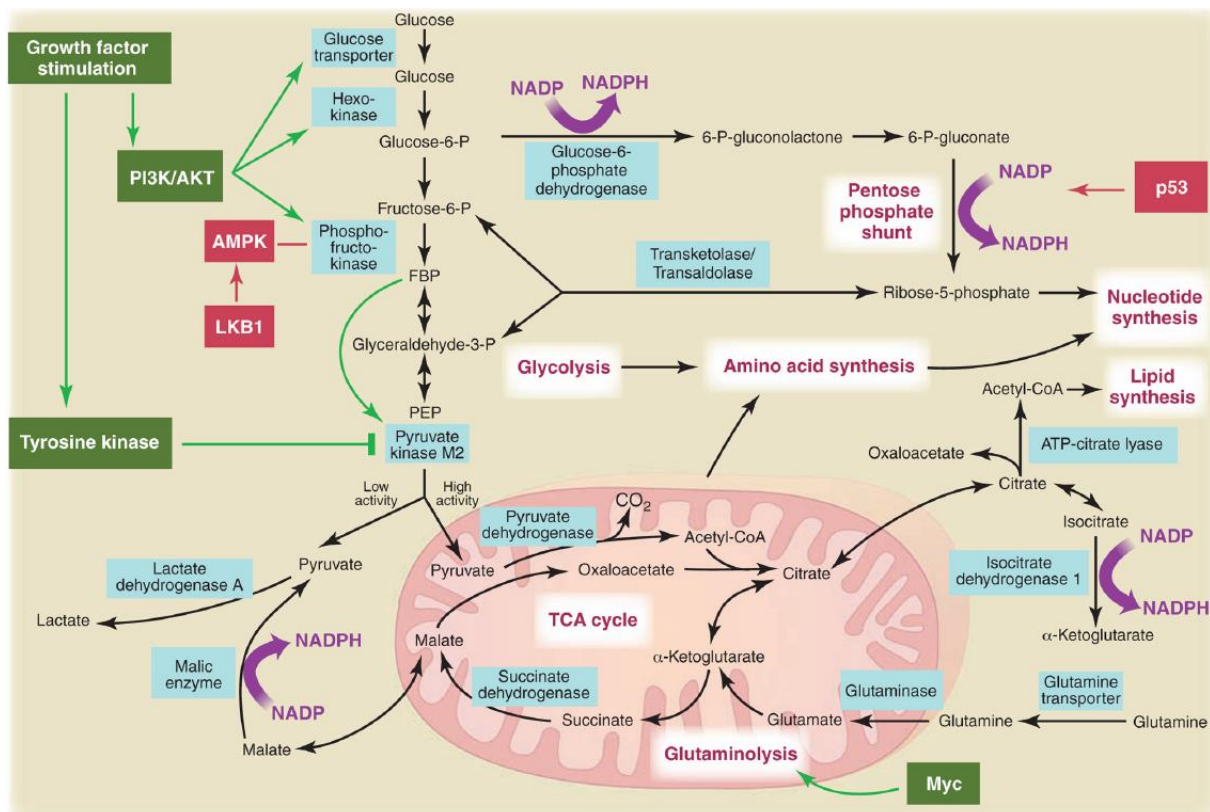


Figure 13 : Voies métaboliques actives dans les cellules proliférantes

Le glucose qui pénètre par des transporteurs, notamment les transporteurs GLUT dans la cellule est phosphorylé en Glucose-6-P par l'hexokinase puis isomérisé en Fructose-6-P par la phosphoglucose isomérase. Un ensemble de réactions enzymatiques vont aboutir à la production de phosphoenolpyruvate (PEP). Le niveau d'activité de la pyruvate kinase M2 va alors conditionner le devenir des molécules de pyruvates produites à partir du PEP : une forte activité aura tendance à conduire le pyruvate sur la voie du cycle de Krebs alors qu'une activité plus faible entrainera une glycolyse avec production de lactates, de même cette activité faible permettra l'accumulation de précurseurs du pyruvate qui seront déviés vers d'autres voies métaboliques comme la voie des pentoses phosphates permettant la production de NADPH et de nucléotides et donc l'accroissement de la biomasse.

D'après (Vander Heiden, Cantley et al. 2009)

Cibler la glycolyse pourrait donc être une approche intéressante pour limiter la prolifération voir même induire la mort. Nous nous sommes intéressés au 2-Déoxyglucose (2-DG), un analogue synthétique du D-glucose (Figure 14A). A l'instar du glucose, cette drogue pénètre dans la cellule par le biais des transporteurs GLUT, elle est métabolisée en 2DG-6P par l'hexokinase, ce 2DG-6P constitue alors un inhibiteur allostérique et compétitif de l'hexokinase, il inhibe également de façon compétitive la phosphoglucose isomérase ce qui conduit à une inhibition de la glycolyse (Figure 14B). Cette molécule a prouvé son efficacité in vitro aussi bien dans les tumeurs solides que les hémopathies (Zhang, Deslandes et al. 2006; Zagorodna,

Martin et al. 2012). Deux autres mécanismes d'action semblent s'ajouter à l'inhibition de la glycolyse : tout d'abord, le 2DG pourrait tuer les cellules par le biais d'une accumulation de ROS (Shutt, O'Dorisio et al. 2010). Une explication pourrait être que le 2DG-6P puisse comme le glucose, entrer dans la voie des pentoses phosphates, cette voie permet notamment la synthèse de NADPH, coenzyme essentiel pour la réduction du glutathion par la glutathion réductase ce qui permet de lutter contre le stress oxydatif. Le 2DG-6P pourrait inhiber l'activité de la 6 phosphogluconate deshydrogenase réduisant la synthèse de NADPH de 50%. De même, il a été montré que le 2-DG, qui possède une structure proche du D-mannose, peut s'incorporer dans la chaîne glucidique à la place du mannose lors de la synthèse des N-glycosylations inhibant leur élongation (Figures 14A et 14C).

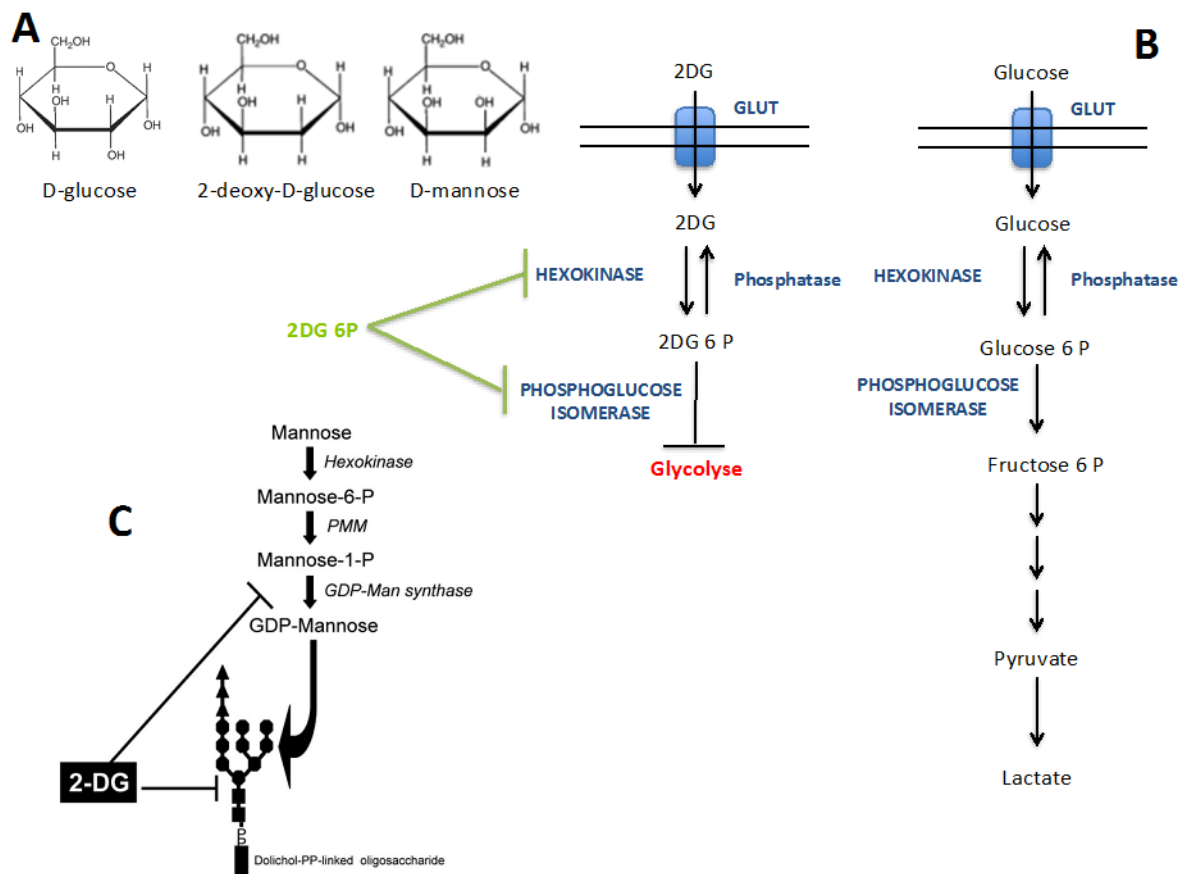


Figure 14 : Mécanisme d'action du 2-DG

Le 2-DG possède une structure proche du D-glucose et du D-mannose (A). Il inhibe sous forme de 2-DG-6-P l'hexokinase et la phosphogluconate isomérase (B). Il inhibe également l'élongation de la chaîne glucidique lors des N-glycosylations en prenant la place du D-Mannose d'après (Kurtoglu, Gao et al. 2007).

Des liens entre métabolisme du glucose et protéine de la famille de Bcl-2 ont été établis et une modulation des protéines de la famille de Bcl-2 a été décrite en réponse à des inhibiteurs de la glycolyse ou lors de privations en glucose. Par exemple, l'inhibition de la glycolyse par le biais de l'axe AMPK/mTOR peut induire dans certains modèles cellulaires une inhibition de la traduction de Mcl-1 (Munoz-Pinedo, El Mjiyad et al. 2012). La privation en glucose, par l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique, pourrait induire la synthèse de protéines BH3-only comme Bim et Puma. Puma, à l'instar de NOXA, peut également être régulé en réponse à la privation de glucose d'une façon P53 dépendante. La déphosphorylation de Bad en réponse en une privation en glucose est responsable de l'induction de l'apoptose (El Mjiyad, Caro-Maldonado et al. 2011).

Le stress du réticulum endoplasmique

Les N-glycosylations sont essentielles pour le bon repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique. Un défaut de N-glycosylation induit ainsi une accumulation de protéines mal conformée et déclenche la mise en jeu du système UPR (unfolded protein response) et la voie du stress du réticulum endoplasmique (RE) (Kang and Hwang 2006; Kurtoglu, Gao et al. 2007).

Le système UPR est composé de 3 protéines senseur transmembranaires enchâssées dans la membrane du RE : PERK, ATF6 et IRE1 α . Elles sont inactivées à l'état basal par leur complexation avec une protéine chaperonne, la GRP78. L'accumulation de protéines mal conformées induit une activation de ces senseurs par leur libération de la GRP78. Une cascade de signalisation est alors enclenchée qui va induire dans un 1^{er} temps le blocage de la traduction cap dépendante par le biais de la branche PERK/eIF2 α /ATF4 du système UPR, induire la synthèse de protéines chaperonnes et du système de dégradation associée au RE afin d'accroître la dégradation protéique (Walter and Ron 2011; Hetz 2012). L'ensemble du processus a pour but de permettre à la cellule de rétablir son homéostasie, cependant si le stress perdure, le système UPR induit une mort cellulaire par apoptose mitochondriale. Les protéines le plus souvent décrites comme induisant l'apoptose par ce biais sont le facteur de transcription CHOP induit essentiellement par le biais de la branche PERK/eIF2 α /ATF4 mais également par le biais d'ATF6 (Figure 15) ; quant aux protéines de l'apoptose impliquées dans cette mort, les protéines BH3-only Bim, Noxa et Puma sont les plus souvent citées (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007; Szegezdi, Macdonald et al. 2009). Certains auteurs ont également décrit une mort induite par le biais d'une autophagie mais ce processus reste controversé (Michallet, Mondiere et al. 2011).

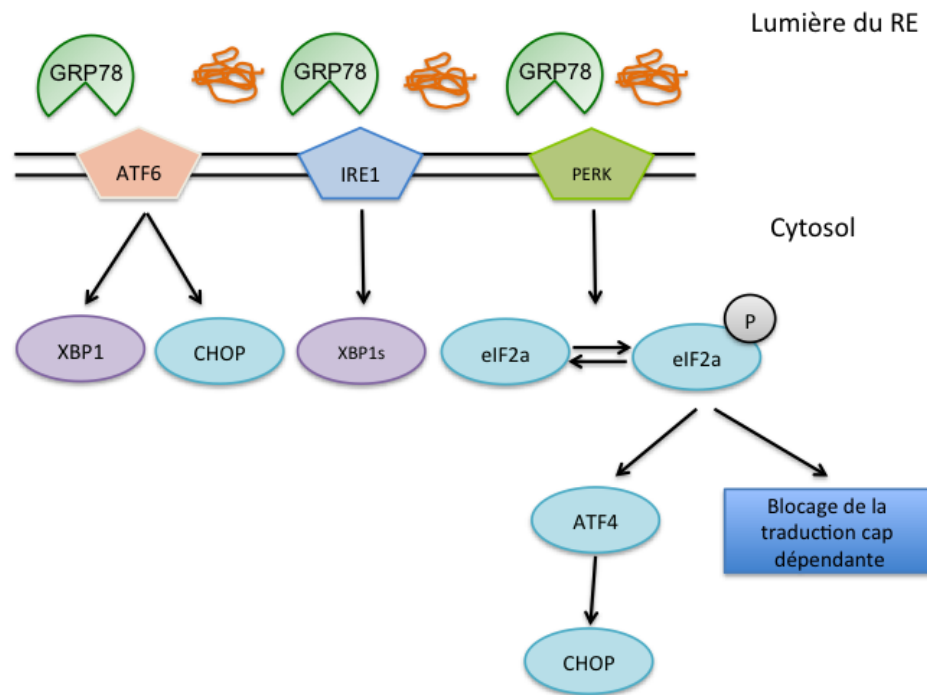


Figure 15 : Schéma du système UPR

Les 3 protéines sensor (ATF6, IRE1 et PERK) enchâssées dans la membrane du RE sont maintenues dans un état inactif par leur complexation avec la protéine chaperonne GRP78. Certains stress cellulaire vont activer tout ou partie du système UPR, en effet l'accumulation de protéines mal conformée induit une libération de la GRP78 des protéines sensor. ATF6 est un facteur de transcription qui va induire notamment une augmentation d'expression de XBP1 et accessoirement de CHOP. IRE1 α va induire une augmentation de splicing de XBP1. Quant à PERK, il va phosphoryler eIF2 α induisant un blocage de la traduction cap dépendante et une augmentation d'expression du facteur de transcription ATF4 qui régule notamment l'expression de CHOP.

Problématique

Développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le MM, pathologie à ce jour encore incurable, est un véritable enjeu. Les inhibiteurs de Bcl-2 sont probablement une solution prometteuse mais comme nous l'indiquons plus haut, ils ne devraient cibler qu'une sous population de MM avec t(11 ;14). Il apparaît donc comme essentiel de trouver des combinaisons synergiques avec ces inhibiteurs afin de pouvoir cibler un nombre plus grand de patients. L'inhibition du métabolisme glucidique et notamment de la glycolyse, par son effet modulateur de la famille de Bcl-2 pourrait être une bonne solution pour accroître l'effet cytotoxique des BH3-mimétiques et quelques études ont déjà montré un intérêt de la combinaison (Yamaguchi, Janssen et al. 2011; Zagrodna, Martin et al. 2012).

L'objet de notre travail a été de montrer :

- l'efficacité du 2-DG in vitro en agent seul sur un panel de lignées de MM représentatif de l'hétérogénéité moléculaire de MM
- de définir le mécanisme d'action du 2-DG dans le MM
- d'évaluer l'efficacité d'une combinaison du 2-DG avec l'ABT-199 sur un panel de lignées de MM et sur des cellules primaires.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire et réactifs

1) Lignées cellulaires

28 lignées cellulaires de myélome multiple ont été utilisées (Moreaux, Klein et al. 2011). Ces lignées cellulaires sont cultivées en milieu RPMI-1640 avec 5% de SVF et 2mM de L-glutamine. Le milieu est complété avec de l'Il-6 à 3ng/mL pour les lignées dépendantes en Il-6. Les cellules sontensemencées à 150 000 cellules/mL deux fois par semaine et incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

2) Réactifs et anticorps

Ce tableau regroupe les différentes drogues et inhibiteurs utilisés dans cette étude.

Produits	Concentration utilisée	Activité	Fournisseurs
MG132	1 µM	Inhibiteur du protéasome	Sigma-Aldrich
2-DG	5 et 10 mM	Inhibiteur de la glycolyse	Sigma-Aldrich
D-Mannose	5 mM	Restaurateur des N-glycosylations	Sigma-Aldrich
ABT-199	62,5 ; 125 ; 250 ; 500 nM	BH-3 mimétique inhibiteur de Bcl-2	Sellechchem

Tableau 5 : Inhibiteurs et drogues utilisées dans cette étude

Le tableau suivant regroupe tous les anticorps (Ac) utilisés dans cette étude.

Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Actin mAb mouse (Millipore)	Goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch)

Bak mAb mouse (Transduction Laboratories)	Goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch)
Bax pAb rabbit (Cell Signaling)	Goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch)
Bcl-2 mAb mouse (Dako)	Goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories)
Bim pAb rabbit (Chemicon)	Goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch)
CHOP pAb rabbit (Santa Cruz)	Goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch)
GRP78 mAb mouse (BD)	Anti-mouse/Anti-rabbit (Roche)
Mcl-1 (S19) pAb rabbit (Santa Cruz)	Anti-mouse/Anti-rabbit (Roche)
Noxa mAb mouse (Alexis)	Goat anti-mouse (Beckman Coulter)
Puma pAb rabbit (Calbiochem)	Anti-mouse/Anti-rabbit (Roche)

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour le western blot

Conditions expérimentales

1) Traitement des cellules

Pour toutes les expériences, les cellules ont été cultivées à 200 000 cellules/mL en plaques 6 puits ou en flasques de 25 ou 75 cm². Pour les analyses de cytométrie en flux, 100 000 cellules sont cultivées dans un volume final de 250µL. Pour les analyses par western blot et RT-PCR quantitative, 5 millions de cellules sont mises en culture dans 25 mL de milieu.

Le 2-DG a été utilisé à la dose de 10 mM pour l'ensemble des expériences hormis l'obtention des culots de OPM-2 et NCI-H929 pour laquelle le 2-DG a été utilisé à 5 mM.

Pour les expériences d'inhibition de la mort, les cellules ont été pré-incubées pendant 30 minutes avec l'inhibiteur (D-mannose) avant que ne soit ajouté le 2-DG.

Pour les expériences utilisant le MG132, les cellules ont été cultivées pendant 48h avec du 2-DG 10 mM et le MG132 a été ajouté 6h avant la fin de l'expérience.

Lors des expériences de combinaison ABT-199 2-DG, 100000 cellules ont été pré incubées avec du 2-DG à des doses variables pendant 30 minutes puis l'ABT-199 a été ajouté à des doses croissantes. L'évaluation de la mort s'est faite à 48h.

Les échantillons primaires de patients avec MM ont été récoltés après consentement éclairé. Les plasmocytes ont été purifiés par des billes immuno-magnétiques anti-CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les cellules sont soumises à un traitement par ABT-199 300 nM, 2-DG 5 mM ou la combinaison pendant 16h.

2) ARN interférence

Les cellules des lignées OPM-2, KMM1, SKMM2, XG-6 et LP1 ont été transfectées par lipofection avec les différents siRNA (small interfering RNA) : siRNA Mcl-1 (Ambion) et siRNA Contrôle (Ambion).

Les cellules (1×10^6 cellules) sont mises en culture dans du milieu RPMI 1640 avec 10% de SVF dans une plaque 6 puits. Une solution A est réalisée en mélangeant le siRNA (100 pmol) à 250µL de milieu Opti-MEM® (Invitrogen) ainsi qu'une solution B en mélangeant la Lipofectamine RNAiMAX (10µL, Invitrogen) à 250µL de milieu Opti-MEM® (Invitrogen). Ces deux solutions sont incubées séparément pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite mélangées et incubées pendant 20 minutes à température ambiante, puis le mélange est déposé sur les cellules.

Cytométrie en flux

1) Mesure de la mort cellulaire : Marquage Apo2.7PE

L'Apo2.7 est un anticorps dirigé contre une protéine nommée 7A6, qui est exprimée au niveau de la membrane mitochondriale, uniquement pendant le processus apoptotique (Zhang, Ao et al. 1996). Contrairement à l'Annexin V, cet anticorps permet de mesurer l'apoptose dite « tardive » car il nécessite que les cellules soient déjà perméables à l'anticorps. L'Apo2.7 est couplé à un fluorophore la Phycoérythrine (PE). Après culture, 100 000 cellules sont transférées par puits dans une plaque 96 puits à fond conique, lavées avec du PBS puis marquées avec 1 µL d'Ac Apo2.7PE (Beckman Coulter). Après 15 minutes d'incubation sur la paillasse, les cellules sont lavées avec du PBS et centrifugées puis elles sont fixées avec 100µL de formaldéhyde 1%. La fluorescence des cellules est mesurée en FL2 par cytométrie en flux (BD FACSCalibur, Biosciences). Le pourcentage spécifique de mortalité est obtenu après soustraction de l'apoptose spontanée.

2) Evaluation du niveau global de N-glycosylation : Marquage par la lectine LEL-couplée au FITC

Les lectines sont des protéines d'origine végétale qui reconnaissent spécifiquement des motifs glucidiques, en l'occurrence la lectine LEL reconnaît le motif GlcNAc₂₋₄ au niveau des N-glycosylation (Venable, Mitalipova et al. 2005).

Après culture, 200 000 cellules sont transférées par puits dans une plaque 96 puits à fond conique, lavées avec du PBS puis marquées avec 0,2 µg de lectine LEL. Après 20 minutes d'incubation sur la paillasse, les cellules sont lavées une fois en PBS. La lecture au cytomètre se fait de suite, la fluorescence des cellules est mesurée par cytométrie en flux (BD FACSCalibur, Biosciences).

3) Evaluation du niveau de CD138 à la surface des plasmocytes des échantillons primaires de patients

La mortalité des plasmocytes d'échantillons primaires de patient est mesurée après culture par la perte d'expression du CD138-PE, caractéristique de l'apoptose des cellules myélomateuses (Jourdan, Ferlin et al. 1998).

Western Blot

Les culots cellulaires recueillis en fin de culture sont lysés, centrifugés et le surnageant est recueilli. La concentration protéique du surnageant du lysat cellulaire est mesurée par spectrophotométrie avec le kit BCA (BCA protein assay kit, Pierce) à 570nm.

50µg de protéines du lysat cellulaire, sont dénaturés 5 minutes à 100°C dans du tampon de reprise (Tris Base 30mM pH 6.8, glycérol 2,5%, SDS 1%, β-mercaptoéthanol 1,25%, bleu de bromophénol).

Des gels de polyacrylamide à 15 % sont réalisés pour identifier les protéines à faible poids moléculaire dont la protéine Noxa et les caspases activées. Des gels de polyacrylamide à 7,5% ; 10% et 12,5% sont utilisés pour les protéines de poids moléculaire supérieur à 30kDa. La migration s'effectue à une intensité constante de 25mA par gel.

Le transfert des protéines séparées durant l'électrophorèse s'effectue sur des membranes de PVDF (Polyvinylidène fluoride) (Immobilon-P transfert membrane 0,45µm, Millipore) dans du tampon Tris Base 25mM, glycine 1,5%, contenant 20% de méthanol, à une tension constante de 22V pendant 30 minutes.

Les membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps primaires en présence de western bloking reagent (WBR Roche) pendant une nuit entière, après lavage, l'anticorps secondaire est ajouté. Après une incubation de 30 minutes et 2 nouveaux lavages, il est procédé à la révélation. .

RT-PCR quantitative en temps réel

1) Extraction de L'ARN total

Les cellules sont culotées par centrifugation puis l'ARN total est extrait en utilisant le kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel). La concentration en ARN de chaque échantillon est ensuite dosée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2) Réverse Transcription (RT)

La réverse transcription est effectuée avec la M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) qui est une ADN polymérase dépendante de l'ARN, utilisée dans la synthèse d'ADNc à partir de longs ARN messagers.

2µg d'ARN et 1µg de primers oligo(dT)₁₅ sont mélangés et chauffés à 65°C pendant 5 minutes au bain-marie. Un mix comprenant du tampon de réaction M-MLV 5X (250mM Tri-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT, Promega), des dNTP à 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 unités d'inhibiteur recombinant des ribonucléases RNasin® (Promega), 200 unités de M-MLV-RT (Promega) et de l'eau RNase free, est ajouté. Le mélange est ensuite incubé à une température d'élongation de 42°C pendant une heure et demie.

A l'issue de cette élongation, on considère que la réaction a été totale, et que l'échantillon d'ADNc est pur et à une concentration de 20ng/µL.

3) PCR quantitative en temps réel

a. Q-PCR Taqman®

L'analyse de l'expression génique de Mcl-1 est réalisée en utilisant la technologie TaqMan® (Applied Biosystems) qui est une technique de PCR quantitative par détection en temps réel de la fluorescence. En effet, cette technique utilise une sonde spécifique oligonucléotidique marquée par deux fluorophores dont l'un est quenché par l'autre dit « Reporter ». Le « Reporter dye R » est fluorescent (FAM) et le « Quencher dye Q » est non fluorescent (MGB). Pendant la PCR, la sonde se fixe sur la cible entre les primers (forward et reverse). Pendant l'élongation, la sonde est clivée par l'activité exonucléase de la Taq polymérase, le « Reporter » est alors séparé du « Quencher ». La fluorescence du « Reporter » est alors émise.

Pour l'étude de chaque gène, une gamme de standard (ou de référence), spécifique du gène étudié, est réalisée afin de vérifier la linéarité et l'efficacité de la PCR. En parallèle, une Q-PCR du gène de ménage, ici le RPL37A qui code pour une protéine

ribosomale, est réalisée afin de pouvoir analyser et comparer les différents échantillons.

Dans des tubes Agilent Technology, 1µL d'ADNc de la gamme standard ou des échantillons est ajouté à 19µL d'un mix comprenant du TaqMan® universal Master mix avec AmpErase UNG 2X et des sondes TaqMan® Gene Expression Assay 20X spécifiques du gène de ménage ou du gène étudié (Mcl1 : Hs00172036_m1, Gène de ménage : RPL37a, Hs01102345_m1).

Les tubes sont ensuite placés dans le thermocycleur MX4000 (Stratagene). La PCR se déroule selon le programme suivant :

Temps et Températures			
Initial setup		40 Cycles	
		Dénaturation	Polymérisation / Elongation
UNG activation	Taq Activation	Cycle	
2 min à 50°C	10 min à 95°C	30 sec à 95°C	1 min à 60°C

b. Q-PCR SYBR® Green

L'analyse de l'expression génique de ATF4 est réalisée en utilisant la technologie SYBR® Green (Applied Biosystems) qui est une autre technique de PCR quantitative par détection en temps réel de la fluorescence. Cette technique utilise un agent intercalant, le SYBR® Green I qui fluoresce lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. L'augmentation de fluorescence pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés. Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces.

Pour l'étude de chaque gène, une gamme de standard (ou de référence), spécifique du gène étudié, est réalisée afin de vérifier la linéarité et l'efficacité de la PCR. En parallèle, une Q-PCR du gène de ménage, ici la Béta actine, est réalisée afin de pouvoir analyser et comparer les différents échantillons.

Dans des tubes Agilent Technology, l'ADNc de la gamme standard ou des échantillons est ajouté à un mix comprenant du Maxima SYBR Green qPCR Master mix (2X) avec une solution de ROX et le couple d'amorces spécifiques du gène de ménage ou du gène étudié (ATF4 : sens : 5'-CCCTTCACCTTCTTACAACCTC-3' et antisens : 5'-GTCTGGCTTCCTATCTCCTTCA-3' ; Gène de ménage : Béta Actine, sens : 5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' et antisens : 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3').

Les tubes sont ensuite placés dans le thermocycleur MX4000 (Stratagene). La PCR se déroule selon le programme suivant :

Temps et Températures		
Initial setup	40 Cycles	
	Dénaturation	Polymérisation / Elongation
Activation ADN polymérase	Cycle	
10 min à 95°C	30 sec à 95°C	1 min à 60°C

c. Analyse des Q-PCR

Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un nombre de cycle de PCR appelé « Ct » pour « Cycle Threshold » ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissant pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (gamme de standard). Le programme de la machine de PCR en temps réel peut calculer l'efficacité E de la réaction.

Lors de l'amplification exponentielle de la PCR, la quantité d'ADN est déterminée selon l'équation suivante : $Q_n = Q_0 \cdot (1+E)^n$ où Q est la quantité d'ADN, n est l'indice du nième cycle, 0 est l'indice du cycle de départ et E est l'efficacité de la réaction.

Donc au cycle de seuil « Ct », on obtient l'équation $Q_0 = Q_{Ct} / (1 + E)^{Ct}$.

Pour effectuer une quantification relative, on établit un rapport R entre la quantité d'ADN de départ d'un échantillon et celle du témoin qui n'a pas subi de traitement selon l'équation suivante : $R = E^{(Ct \text{ échantillon} - Ct \text{ témoin})}$. Pour l'échantillon contrôle, ce rapport sera donc de 1.

Afin d'éliminer les éventuels effets de fluctuations, cette quantification relative est corrigée en effectuant un rapport $R_{\text{gène d'intérêt}} / R_{\text{gène de ménage}}$. L'échantillon contrôle corrigé présentera toujours un rapport de 1.

On considère qu'il y a eu une variation de la quantité d'ARNm lorsque le rapport corrigé de la quantification relative est supérieur ou égal à 3.

Dosage du lactate

Les lignées à la concentration de 200000/mL ont été cultivées pendant 48h en plaque 6 puits en présence ou absence de 2-DG. Le surnageant est alors récupéré, centrifuger puis le niveau de lactate est dosé à l'aide du lecteur Lactate Xpress (Nova Biomedical, Les Ullis, France).

Résultats

Le 2-DG seul tue les cellules de lignées de MM de façon hétérogène

Nous avons évalué le 2-DG en monothérapie sur un panel de 28 lignées de MM représentatives de l'hétérogénéité des patients (Tableau 7). La mort cellulaire par apoptose s'est révélée très hétérogène, variant de 5 à 96% (Figure 16). Nous avons choisi de définir la sensibilité des lignées de MM au 2-DG en fonction de la médiane de mort située à 30,5%. Ainsi les lignées seront considérées par la suite comme résistantes lorsque leur pourcentage de mort sera inférieur à 30,5% exclus.

Nous avons ensuite corrélié la mort induite par le 2-DG aux différents sous-groupes de translocations et au statut P53 de ces lignées de MM. Lorsque l'on compare de façon globale les 4 groupes de translocations, aucun groupe ne se détache des autres au plan statistique, cependant lorsque l'on oppose les lignées présentant une t(4 ;14) à l'ensemble des autres lignées, il s'avère que les lignées avec cette translocation sont plus sensibles au 2-DG ($p = 0,05$; test de Mann-Whitney). Ceci est intéressant lorsque l'on sait que cette translocation est associée à un pronostic plus péjoratif. Lorsque l'on oppose les lignées de MM t(11 ;14) aux autres lignées, on observe la tendance inverse à savoir que les lignées présentant la translocation tendent à être plus résistantes au 2-DG avec un $p = 0,08$ (test de Mann-Whitney) (Figures 17A, B et C).

Les lignées présentant une anomalie de p53 sont globalement plus résistantes au 2-DG que les lignées WT ($p = 0,03$) (test de Mann-Whitney) (Figure 17D). P53 régule négativement la glycolyse par le biais d'une sur-expression de TIGAR, qui diminue le taux du fructose 2,6-biphosphate. Ainsi, ce résultat est en faveur d'une place accessoire de l'inhibition de la glycolyse dans la mort induite par le 2-DG, en effet, les lignées p53 mutées qui ont une tendance à avoir une glycolyse plus importante, auraient dû être plus sensibles au 2-DG que les P53 WT.

Lignée de MM	Translocation	Gène cible	Statut P53
AMO-1	t(12 ; 14)	Autre	Sauvage
JIM-3	t(4 ; 14)	MMSET	Anormal
K620	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
MDN	t(11 ; 14)	CCND1	Sauvage
NAN7	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
NAN8	t(4 ;14)	MMSET	Anormal
NAN9	t(4 ;14)	MMSET	Sauvage
NCI-H929	t(4 ;14)	MMSET	Sauvage
OPM2	t(4 ;14)	MMSET	Anormal
XG6	t(14 ; 16)	MAF	Sauvage
XG7	t(4 ;14)	MMSET	Sauvage
KMS-12BM	t(11 ; 14)	CCND1	Sauvage
KMS-12PE	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
L363	t(20 ; 22)	MAF	Anormal
LP1	t(4 ;14)	MMSET	Anormal
SKMM2	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
XG11	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
XG5	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
BCN	t(14 ; 16)	MAF	Sauvage
JJN-3	t(14 ; 16)	MAF	Anormal (KO)
KMM-1	t(6 ; 14)	Autre	Anormal
MM1-S	t(14 ; 16)	MAF	Sauvage
NAN1	t(14 ; 16)	MAF	Anormal
NAN3	t(4 ;14)	MMSET	Anormal
RPMI	t(14 ; 16)	MAF	Anormal
U266	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
XG1	t(11 ; 14)	CCND1	Anormal
XG2	t(12 ; 14)	Autre	Anormal

Tableau 7 : Caractéristiques des 28 lignées de MM utilisées lors de l'étude

Les 28 lignées testées dans notre étude ont été caractérisées au plan cytogénétique pour les principales translocations retrouvées dans le MM. Le gène hyperexprimé correspondant est indiqué dans la case gène cible. Ces lignées ont également été caractérisées pour le statut P53 : sauvage ou anormal (muté, tronqué ou KO). D'après (Moreaux, Klein et al. 2011).

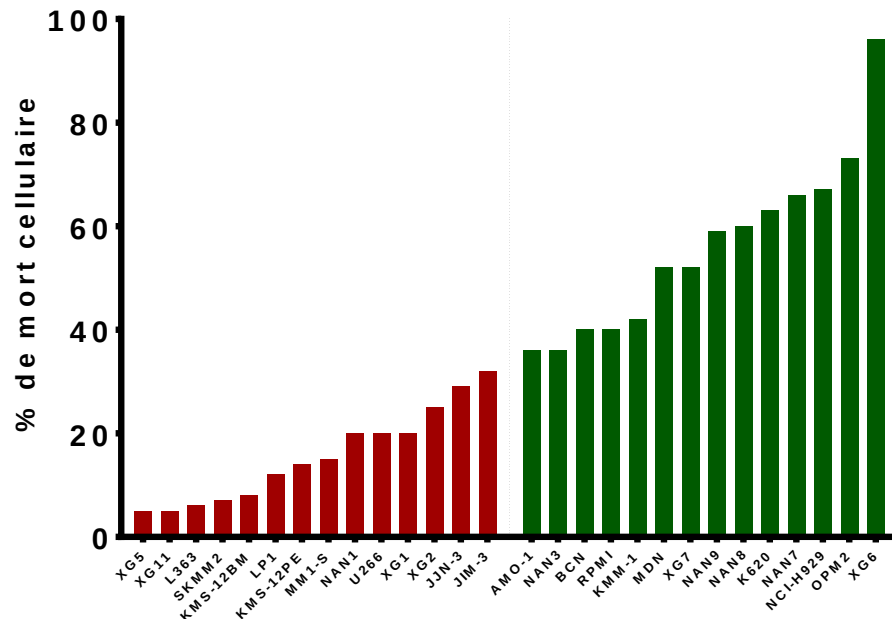


Figure 16 : Le 2-DG tue les lignées de MM de façon variable

La mort par apoptose a été évaluée en cytométrie en flux par marquage à l'APO 2.7 dans 28 lignées de MM traitées pendant 48h avec une dose fixe de 10 mM de 2-DG. Nous avons défini des lignées sensibles en vert et résistantes en rouge en fonction de la médiane située à 30,5%. Ce code couleur sera conservé par la suite.

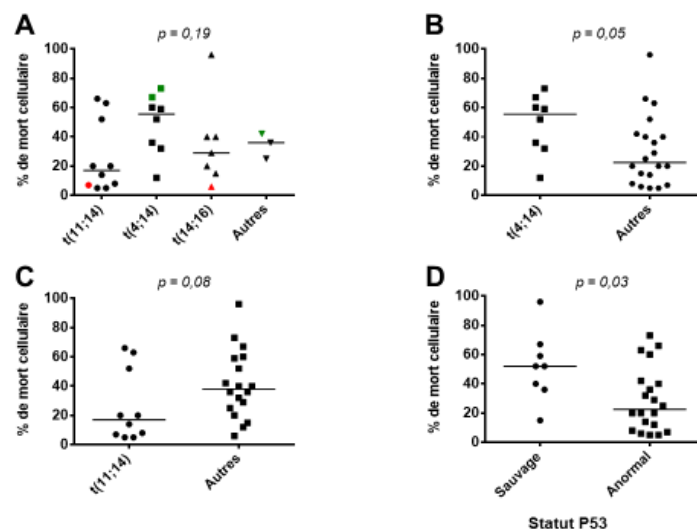


Figure 17 : Sensibilité des lignées en fonction des translocations et du statut P53

Le pourcentage de mort des lignées traitées pendant 48h par 2-DG a été analysé en fonction de leur translocation (A, B et C) ou de leur statut P53 (D) selon (Moreaux, Klein et al. 2011). L'analyse a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (A) ou de Mann-Whitney (B, C, D). Les lignées de la figure A en vert et en rouge sont les lignées qui seront utilisées par la suite dans les différentes expériences.

Le 2-DG inhibe la glycolyse dans l'ensemble des lignées mais ce mécanisme semble accessoire dans l'induction de la mort

Nous avons évalué le niveau de glycolyse de 9 lignées en dosant le lactate produit à l'état basal dans le milieu à 48h. La production de lactate varie de 2,5 mM pour SKMM2 à 20 mM pour KMM-1. Nous avons ensuite corrélié cette production de lactate avec la mort induite par le 2-DG. Il n'existe pas de corrélation entre la glycolyse et la mort ($r = -0,2$; $p = 0,61$; test de corrélation de Spearman) (Figure 18).

De même, nous avons évalué le pourcentage d'inhibition de la production de lactates dans le milieu dans 3 lignées sensibles et 2 lignées résistantes, cette inhibition varie de 50 à 87%, il ne se dégage pas de différence évidente entre les lignées sensibles et résistantes (Figure 19).

L'ensemble de ces données argue en faveur d'une inhibition de la glycolyse comme élément accessoire de la mort induite par le 2-DG.

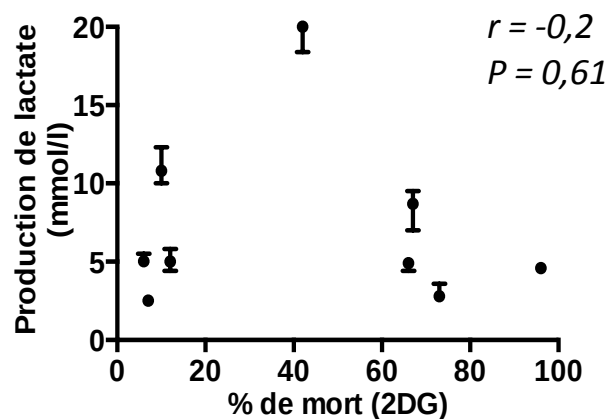


Figure 18 : La sensibilité au 2-DG n'est pas corrélée à la production de lactate

La production de lactate dans le surnageant de culture de 9 lignées de MM cultivées pendant 48h en RPMI-1640 supplémenté de 5% de SVF a été mesurée en utilisant le système Lactate Xpress (Nova Biomedical, Les Ulis, France). Ce taux de lactate a été confronté au pourcentage de mort des lignées évalué en APO 2.7. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de corrélation de Spearman.

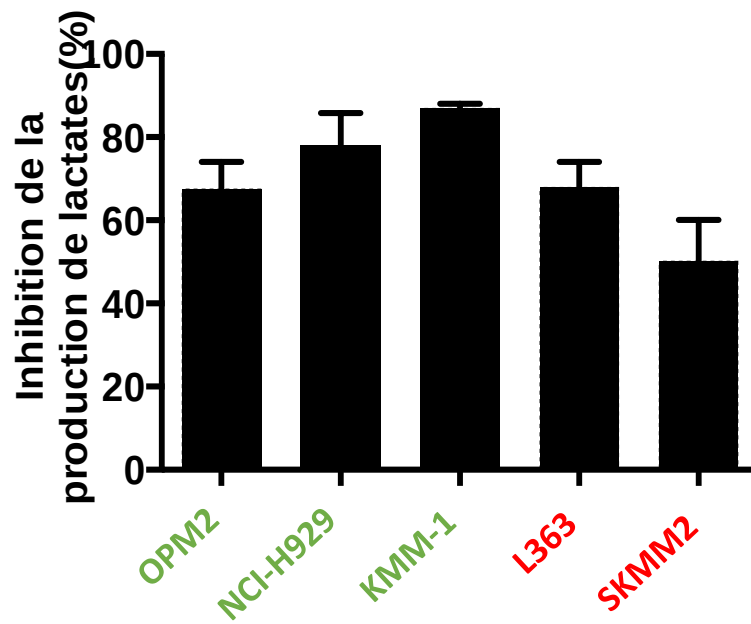


Figure 19 : Le 2-DG inhibe de façon similaire la glycolyse dans les lignées de MM sensibles et résistantes

Nous avons évalué le pourcentage d'inhibition de la production de lactates de 5 lignées : 3 sensibles et 2 résistantes en mesurant la production de lactates de ces lignées cultivées pendant 48h dans du RPMI-1640 supplémenté de 5% de SVF en présence ou non de 2-DG 10 mM.

Le 2-DG est responsable d'une inhibition des N-glycosylations

Nous avons testé la capacité du 2-DG à inhiber les N-glycosylations, pour se faire, nous avons évalué le niveau de N-glycosylation global de lignées traitées ou non pendant 48h par le 2-DG en réalisant un marquage par la lectine LEL et une analyse en cytométrie en flux. Cette lectine reconnaît le motif GlcNAc₂₋₄ présent au niveau des N-glycosylations (Figure 20). Que ce soit dans les lignées sensibles comme KMM1 et NCI-H929 ou résistante comme SKMM2 et L363, le 2-DG est responsable d'une diminution globale des N-glycosylations, en effet, le pourcentage de diminution de la fluorescence varie de 23% pour SKMM2 à 84% pour NCI-H929.

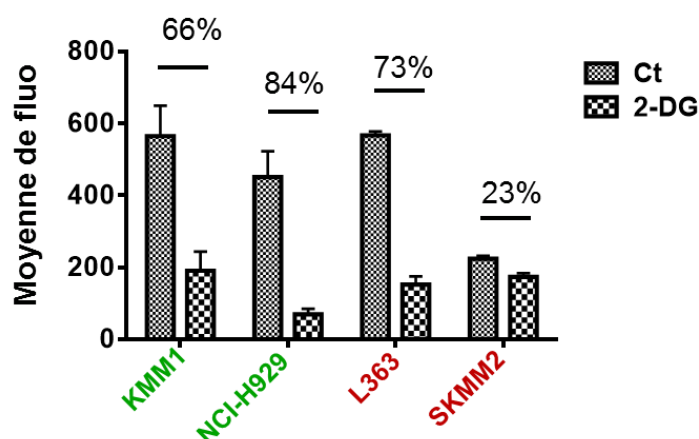


Figure 20 : Le 2-DG induit une inhibition globale des N-glycosylations dans les lignées de MM

Nous avons évalué le niveau global de N-glycosylation de 4 lignées : 2 sensibles et 2 résistantes, à l'aide de la lectine LEL couplée au FITC (0.2 µg pour $2 \cdot 10^5$ cellules). Cette lectine reconnaît les motifs GlcNAc₂₋₄ des N-glycosylations. L'évaluation s'est faite en cytométrie en flux. Le pourcentage d'inhibition de la fluorescence est indiqué pour chaque lignée.

Cette inhibition des N-glycosylations induit un stress du RE et la mise en jeu du système UPR

Nous avons ensuite montré que ce défaut de N-glycosylation induisait un stress du RE. Pour se faire, nous avons évalué en WB et en PCR quantitative l'induction de protéines mises en jeu dans le système UPR, à savoir la protéine chaperonne GRP78, les facteurs de transcription ATF4 et CHOP (Figures 21A et 21B). Nous avons constaté une induction d'ATF4 dans l'ensemble des lignées testées. Globalement, l'ARN augmente dans l'ensemble des lignées avec une augmentation qui varie de 2,19 fois dans SKMM2 à 11,9 fois dans L363.

On observe également une induction de CHOP dans l'ensemble des lignées, ce facteur de transcription a été rapporté comme un élément clé de l'apoptose médiée par le stress du RE, induisant l'expression de certaines protéines BH-3 only comme Bim, Puma ou Bax, ou la diminution de Bcl-2 (Nishitoh 2012), de même CHOP induirait la phosphatase GADD34 entraînant une déphosphorylation de eIF2 α et une reprise de la synthèse protéique responsable de la mort cellulaire (Marciniak, Yun et al. 2004). Cependant dans notre modèle, le rôle pro apoptotique de CHOP semble peu clair, en effet CHOP est induit à des niveaux proches dans l'ensemble des lignées qu'elles soient sensibles ou résistantes. Finalement GRP78 est également augmentée dans l'ensemble des lignées. Ainsi le stress du RE est mis en œuvre en réponse au 2-DG et notamment la voie PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP.

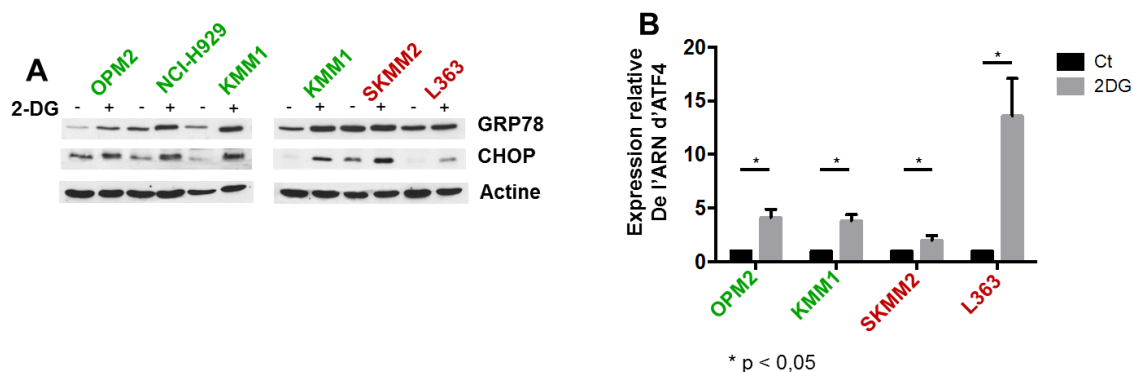


Figure 21 : Le 2-DG induit un stress du RE

Nous avons évalué la mise en jeu du stress du RE en WB sur 5 lignées. Les lignées OPM2 et NCI-H929 ont été traitées par 5 mM de 2-DG ; KMM1, SKMM2 et L363 par 10 mM. La protéine chaperonne GRP78 et CHOP ont été évalué en WB. La figure (A) permet de comparer le niveau d'expression relatif en WB entre les 5 lignées à H24. La figure (B) montre le niveau d'expression relatif par rapport au contrôle d'ATF4 en qPCR SYBR green dans 4 lignées.

Le mannose restaure les N-glycosylations mais ne reverse que partiellement le stress du RE et la mort induite par le 2-DG

Il a été décrit que l'adjonction de mannose dans le milieu de cellules traitées par 2-DG permettait de restaurer au moins partiellement les N-glycosylations. Nous avons cherché à savoir si cette réversion inhibait l'induction des protéines du système UPR, c'est effectivement le cas en partie comme le montre le WB sur KMM-1 et NCI-H929 (figure 22). On observe plus d'induction de CHOP dans KMM-1 alors que l'induction dans NCI-H929 n'est quasiment pas inhibée. De plus, la restauration des N-glycosylations n'inhibe qu'en partie la mort induite par le 2-DG comme le montre la figure 23. Cette inhibition varie de 14% dans NCI-H929 à 61% dans KMM-1. Il semble donc que le stress du RE ne soit responsable que d'une partie de la mort induite par le 2-DG et que certaines lignées soient plus sensibles à un défaut de N-glycosylation que les autres. De plus, l'inhibition de la mort et l'inhibition de l'induction de CHOP semblent corrélées puisque dans KMM-1, lignée dans laquelle le mannose inhibe totalement l'induction de CHOP, la mort est fortement inhibée alors qu'à l'inverse dans NCI-H929, lignée dans laquelle l'induction de CHOP n'est quasiment pas inhibée, la mort n'est quasiment pas inhibée. CHOP semble donc tenir une place importante dans la mort induite par le 2-DG mais son mode d'induction pourrait dépendre des lignées, dépendant du défaut de N-glycosylation dans KMM-1 et probablement d'un autre mécanisme dans NCI-H929, par exemple, par le biais de l'inhibition des SERCA comme pourrait le laisser supposer la forte sensibilité de NCI-H929 à la tunicamycine, drogue inhibant les SERCA (données non montrées) (Moore, Omikorede et al. 2011).

Du fait d'une restauration possible de la glycolyse par de fortes concentrations de mannose et afin de s'assurer que le D-mannose ne restaure que les N-glycosylation et non la glycolyse dans les différentes expériences, nous avons évalué la production de lactate et le pourcentage de mort de KMM-1 incubé en présence de 2-DG 10 mM et de doses croissantes de D-mannose (Figure 24). Ces expériences nous ont permis de retenir la dose de 5 mM de D-mannose pour l'ensemble des expérimentations.

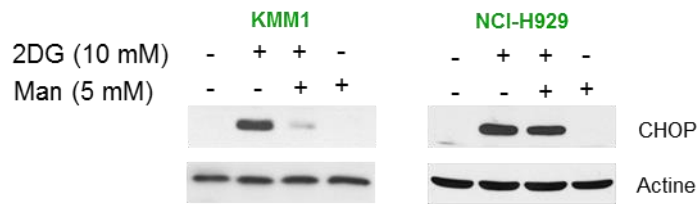


Figure 22 : Le D-mannose inhibe de façon variable l'induction de CHOP selon les lignées

Nous avons évalué dans 2 lignées sensibles l'inhibition de l'induction CHOP secondaire au traitement par 2-DG 10 mM associé à du D-Mannose 5 mM en WB.

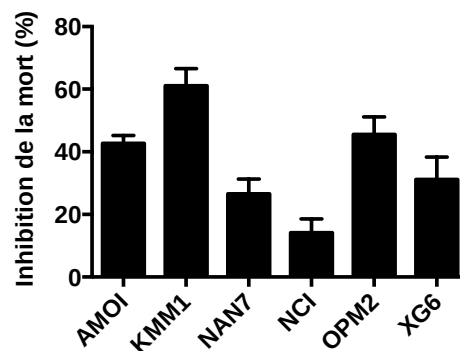


Figure 23 : Le mannose inhibe de façon variable la mort induite par le 2-DG

6 lignées sensibles au 2-DG ont été pré-incubées pendant 30 minutes avec du D-mannose à une concentration de 5 mM avant que ne soient ajoutés 10 mM de 2-DG. La mort a été évaluée à 48h en cytométrie en flux par marquage à l'APO 2.7.

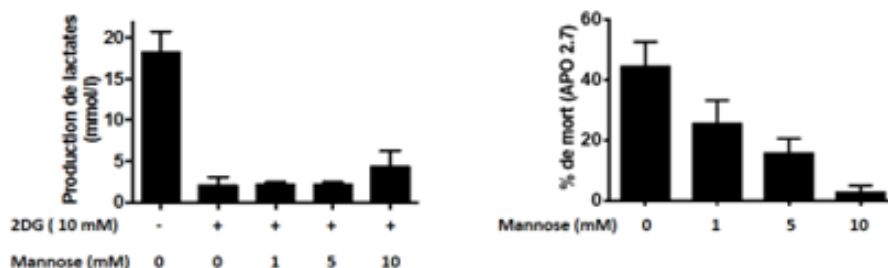


Figure 24 : L'effet du D-mannose sur l'inhibition de la mort est dose dépendante et ne restaure pas la glycolyse

Nous avons évalué la mort dans KMM-1 en cytométrie en flux par marquage à l'APO 2.7 en exposant la lignée à du 2-DG 10 mM précédé d'une incubation de 30 min avec une dose de 1, 5 ou 10 mM de D-Mannose, le traitement a duré 48h. Nous avons également dosé le lactate produit dans le surnageant de culture à l'aide du lactate Xpress.

Le 2-DG induit une diminution d'expression de Mcl-1 dans l'ensemble des lignées et une augmentation modérée des BH3

Nous avons montré en WB une diminution de Mcl-1, protéine anti-apoptotique essentielle dans le MM dans l'ensemble des lignées que nous avons testé à 24h (Figure 25). De plus, on constate une augmentation de certaines BH-3 only variable selon les lignées testées, ainsi, on peut constater une augmentation de Noxa dans NCI-H929, OPM-2 et SKMM-2, une augmentation de Puma dans NCI-H929, KMM-1, SKMM-2 et L-363. Il est à noter que Bcl-2, Bak et Bax ne semblent pas ou peu modulés.

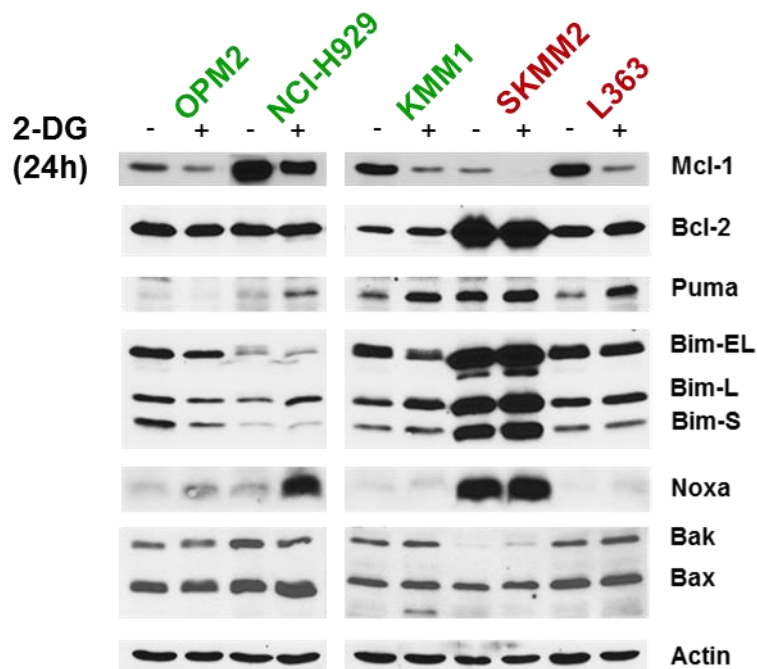


Figure 25 : Le 2-DG induit une diminution de Mcl-1 dans l'ensemble des lignées

Nous avons évalué en WB l'expression d'un panel de protéines pro et anti apoptotiques de la famille de Bcl-2 à 24H sur 5 lignées traitées pour OPM-2 et NCI par 5 mM de 2-DG et pour KMM-1, SKMM-2 et L-363 par 10 mM.

La mort induite par le 2-DG corrèle avec la dépendance des lignées à Mcl-1 et avec le niveau basal de Bcl-2.

Nous avons réalisé des expériences de siRNA de Mcl-1 dans 5 lignées transfectables et avons corrélé le pourcentage de mort à la sensibilité au 2-DG ($r = 0,9$; $p = 0,04$, test de corrélation de Spearman) (Figure 26). Il existe une corrélation entre la mort induite par l'inhibition de Mcl-1 et la mort par 2-DG. Ainsi la diminution de Mcl-1 semble être l'élément essentiel de la mort dans notre système. On peut imaginer, que les BH3 associées à Mcl-1 puissent être captées par Bcl-2 dans les lignées exprimant fortement cette protéine, permettant leur survie, nous avons donc évalué la corrélation entre le taux basal de Bcl-2 évalué à l'aide de puces d'expression et la sensibilité au 2-DG. Nous avons trouvé une corrélation entre les 2 variables avec un $r = -0,46$; $p = 0,013$; test de corrélation de Spearman (Figure 27). Ceci pourrait expliquer la tendance qu'ont les lignées avec t(11 ;14) présentant le plus fort taux de Bcl-2 à être plus résistantes au 2-DG.

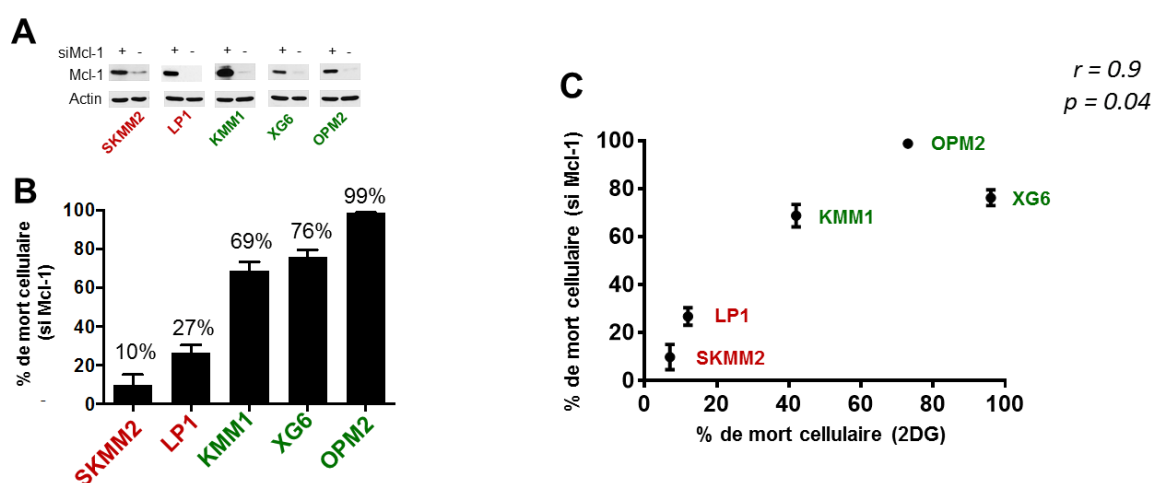


Figure 26 : La mort induite par le 2-DG est corrélée à la dépendance des lignées à Mcl-1 pour leur survie, objectivée par des expériences de siRNA

Nous avons évalué la corrélation dans 5 lignées transfectables entre la mort induite par l'inhibition de Mcl-1 par siRNA et la mort induite par le 2-DG. (A) L'extinction de Mcl-1 par les si-RNA a été confirmée par western blot. (B) Pourcentage de mort évalué en cytométrie en flux par marquage à l'APO2.7 dans les 5 lignées down régulées pour Mcl-1 par siRNA. (C) Corrélation entre la mort cellulaire induite par les siRNA et la mort cellulaire induite par le 2-DG, toutes 2 évaluées par marquage à l'APO2.7. L'analyse s'est faite à l'aide d'un test de corrélation de Spearman.



60

La diminution de Mcl-1 est en partie induite par une dégradation protéasomale

Nous avons évalué la restauration du niveau de Mcl-1 en réponse à l'adjonction de mannose, nous avons observé une restauration au moins partiel de la protéine ce qui signe soit une implication du stress du RE dans la diminution de Mcl-1 ou d'une protéine dont la fonction serait modifiée du fait du défaut de glycosylation (Figure 28).

Nous avons ensuite cherché à comprendre le mécanisme de la diminution de Mcl-1 : défaut de transcription, de traduction et/ou dégradation. Dans un premier temps, nous avons donc évalué l'expression de l'ARN de Mcl-1 en PCR quantitative (Figure 29). Le niveau de Mcl-1 dans 4 lignées varie de 0,56 à 1,56 fois lors du traitement par 2-DG ; il n'existe donc pas de diminution significative de la transcription de la protéine.

Finalement, nous avons également évalué le niveau de Mcl-1 après blocage de la voie du protéasome par le MG-132 (Figure 30). Nous avons donc pu constater une restauration au moins partielle du niveau de Mcl-1. Ainsi la diminution de Mcl-1 serait au moins en partie associée à sa dégradation par le protéasome.

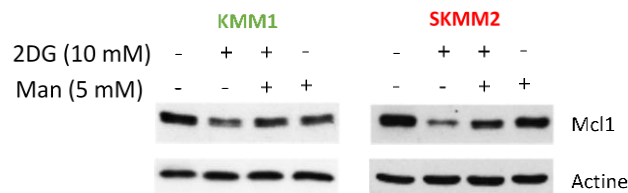


Figure 28: Le D-mannose permet une restauration du niveau de Mcl-1

Nous avons évalué la restauration du niveau Mcl-1 en WB dans une lignée sensible et une résistante pré-incubées pendant 30 minutes avec 5 mM de mannose puis traitées pendant 48h par 2-DG 10 mM.

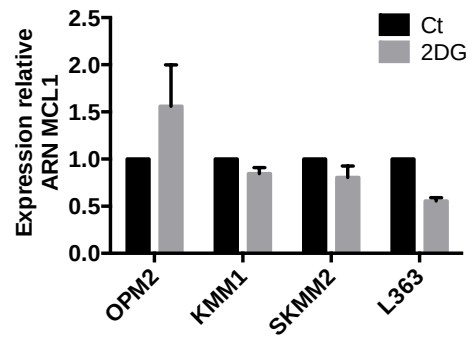


Figure 29 : La diminution de Mcl-1 n'est pas transcriptionnelle

Nous avons évalué en qPCR l'expression de Mcl-1 dans 4 lignées de MM.

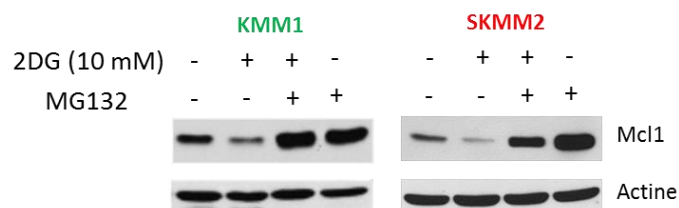


Figure 30 : Le MG132 restaure le niveau de Mcl-1

KMM-1 et SKMM2 ont été traitées par 2-DG 10 mM pendant 48h. 6h avant la fin de la culture, 1 μ M de MG132 a été ajouté au milieu. Le niveau de Mcl-1 a été évalué en Western Blot.

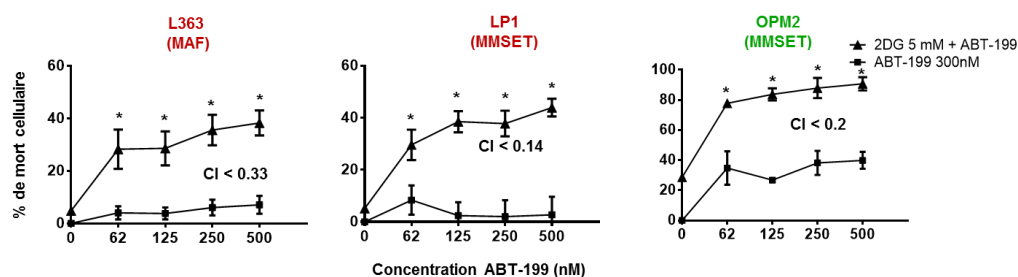
La combinaison du 2-DG et de l'ABT-199 est synergique dans les lignées de MM

Nous avons évalué ensuite la combinaison du 2-DG à des doses sub-optimales d'ABT-199 dans 6 lignées et avons calculé les CI, la figure 31 montre l'effet de l'association à une dose constante de 5 mM de 2-DG dans 3 lignées. Le 2-DG est synergique dans l'ensemble des lignées testées (Figure 31).

Finalement, nous avons testé cette combinaison sur des échantillons primaires de patients triés ou non par billes CD-138 et avons montré une action synergique de la combinaison comme le montre l'augmentation de la médiane de mortalité entre traitement par 2-DG, ABT-199 et 2-DG/ABT-199 (Figure 32 B).

A noter qu'il existe une différence de sensibilité au 2-DG chez les patient en fonction de la présence d'une t(4 ; 14) ou non qui va dans le même sens que ce que nous avons constaté dans les lignées, ainsi les MM avec t(4 ; 14) sont plus sensibles au 2-DG (Figure 32 A).

Le tableau 8 reprend les caractéristiques des patients chez lesquels ont été prélevées les cellules primaires.



* Combination index selon Chou Talalay

Figure 31 : La combinaison 2-DG ABT-199 est synergique dans les HMCLs

3 lignées ont été pré-incubées 30 minutes avec une dose de 2-DG 5 mM. Des doses variables d'ABT-199 ont ensuite été ajoutées au milieu (62,5 125 250 500 nM). La mort a été évaluée à 48h par marquage à l'APO2.7.

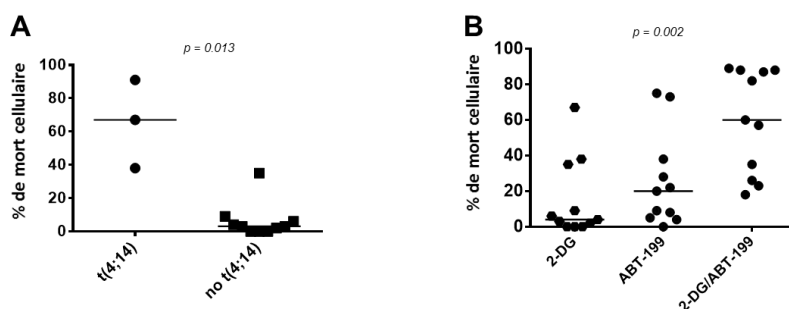


Figure 32 : La combinaison 2-DG ABT-199 est synergique sur les échantillons primaires de patients

Les échantillons primaires de patients ont été incubés toute la nuit dans du RPMI-1640 supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal et 3 ng/ml d'IL-6. Un traitement par 2-DG 5 mM, ABT-199 300 nM et 2-DG ABT-199 est ajouté au milieu. (A) Sensibilité au 2-DG en fonction de la présence d'une t(4 ;14). (B) Sensibilité au 2-DG, à l'ABT-199 et à l'association sur les échantillons primaires de patients.

Caractéristiques des patients						Mort cellulaire		
Echantillon	Pathologie	Statut	Origine	t(4 ;14)	del(17p)	2-DG 5mM	ABT - 199	2-DG /ABT-199
1	MM	D	M	-	-	6%	38%	60%
2	LP	D	S	-	-	3%	5%	23%
3	MM	R	M	-	-	0%	42%	88%
4	LP	R	S	-	-	35%	22%	89%
5	MM	R	M	-	+	9%	73%	87%
6	MM	R	M	+	-	67%	8%	82%
7	MM	D	M	-	-	0%	20%	26%
8	LP	R	S	-	-	4%	9%	18%
9	MM	D	M	-	+	0%	0%	35%
10	LP	D	S	-	+	2%	75%	88%
11	MM	R	S	+	+	38%	28%	57%

Tableau 8 : Caractéristiques des échantillons

Les échantillons primaires de patients ont été incubés toute la nuit dans du RPMI-1640 supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal et 3 ng/ml d'IL-6. Un traitement par 2-DG 5 mM, ABT-199 300 nM et 2-DG ABT-199 est ajouté au milieu. La mort cellulaire est évaluée par la perte d'expression du CD138 en cytométrie en flux. (MM : myélome multiple, LP : leucémie à plasmocytes, D : Diagnostic, R : Rechute, M : Moelle, S : Sang).

Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité du 2-DG à induire la mort cellulaire dans une large cohorte de lignées de MM représentative de la diversité moléculaire du MM. Nous avons stratifié les lignées en 2 groupes selon leur sensibilité au 2-DG après 48h de traitement et nous avons analysé la réponse différentielle au 2-DG en fonction de l'inhibition de la glycolyse, du stress du RE et des mécanismes moléculaires de l'apoptose. Les lignées sensibles au 2-DG ont été définies par une induction de mort cellulaire supérieure à 34% alors que les autres ont été considérées comme résistantes. Nous avons constaté que les sous-groupes moléculaires de MM présentaient une sensibilité différente au 2-DG, le sous-groupe avec t(4 ; 14) étant le plus sensible alors que celui avec la t(11 ; 14) était le plus résistant. Ces différents sous-groupes de patients peuvent également être distingués par leur pronostic différent, les patient avec t(4 ; 14) ayant un pronostic plus péjoratif. Dans une étude récente, nous avons identifié le sous-groupe avec t(11 ; 14) comme une entité particulière très sensible à l'ABT-199 et caractérisée par un ratio d'expression génique Bcl-2/Mcl-1 élevé (Touzeau, Dousset et al. 2014). Alors que la dérégulation des cyclines D est un processus uniforme dans le MM (Bergsagel, Kuehl et al. 2005), différentes cyclines D sont dérégulées dans ces 2 sous-groupes, ainsi, la cycline D2 est hyperexprimée dans les MM avec t(4 ; 14) alors que ceux avec t(11 ; 14) sont caractérisés par une augmentation d'expression de la cycline D1. L'implication biologique de cette dérégulation différentielle des cyclines D est inconnue mais il pourrait exister un lien entre expression différentielle des cyclines D et expression différentielle des protéines apoptotiques comme semble le suggérer les résultats des puces d'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les différents sous-groupes de MM (Gomez-Bougie and Amiot 2013).

L'efficacité du 2-DG à induire la mort cellulaire dans le cancer a souvent été rapportée mais son mécanisme d'action reste controversé. Alors que le 2-DG est un inhibiteur bien connu de la glycolyse, l'implication soit d'un stress énergétique ou soit d'un stress du RE est encore matière à débat et leur conséquence sur la modulation des protéines de la famille de Bcl-2 n'a pas complètement été résolu. Nous avons démontré que le 2-DG inhibait fortement la glycolyse dans toutes les lignées cellulaires testées quelque soit leur sensibilité au 2-DG suggérant que la diminution du niveau d'ATP n'était pas le mécanisme majeur de l'induction de la mort cellulaire. En accord avec ce résultat, il a été démontré précédemment que le 2-FDG, un autre analogue du glucose, qui induit

une diminution plus importante du niveau d'ATP dans les cellules cancéreuses que le 2-DG, était moins efficace dans l'induction de la mort cellulaire, suggérant un autre mécanisme d'induction de l'apoptose (Kurtoglu, Gao et al. 2007). De plus, l'efficacité du 2-DG est plus importante dans les lignées p53 WT qui sont moins dépendante de la glycolyse ce qui constitue un dernier argument en faveur d'une place accessoire de l'inhibition de la glycolyse dans l'induction de la mort cellulaire.

Nous avons montré que le 2-DG inhibait fortement les N-glycosylations des protéines dans les cellules myélomateuses en utilisant une lectine, ce qui est en accord avec ce qui avait déjà été décrit (Kang and Hwang 2006; Kurtoglu, Gao et al. 2007). A noter que cette inhibition des N-glycosylations est présente à la fois dans les lignées sensibles et résistantes. L'inhibition des N-glycosylations met en jeu le système UPR comme le montre l'augmentation de la GRP78 et l'activation de la voie PERK. En effet, nous avons trouvé que CHOP, essentiellement induit par le facteur de transcription ATF4 de la branche PERK, était toujours augmenté. CHOP est décrit comme un important inducteur de mort en réponse à la mise en jeu du système UPR, et qu'il pouvait induire l'expression de différents facteurs pro-apoptotiques comme Bax, Bim ou Puma (Nishitoh 2012). De plus, nous avons montré que l'inhibition des N-glycosylations pouvait être réduite par l'adjonction de D-mannose sans avoir d'impact sur l'inhibition de la glycolyse alors qu'elle induit une diminution de la mort cellulaire. Cette diminution de la mort cellulaire par le D-mannose est très variable dans les lignées cellulaires allant de 14 à 62%. D'une façon similaire, nous avons montré que le D-mannose induisait une diminution hétérogène de l'induction de CHOP. De façon intéressante, nous avons trouvé que la diminution d'intensité corrélait avec le pourcentage de réduction de la mort cellulaire. Ceci souligne probablement un mécanisme différent d'induction du stress du RE dépendant du type cellulaire. En effet, alors que le défaut de N-glycosylation a été proposé comme le mécanisme principal d'induction du stress du RE par le 2-DG, d'autres mécanismes ont été impliqués dans l'augmentation de CHOP. En effet, il a été montré que de faibles concentrations de glucose pouvaient induire une inhibition des pompes SERCA qui permettent l'entrée du calcium dans le RE, induisant un stress du RE (Moore, Omikorede et al. 2011). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que NCI-H929 était très sensible à la Thapsigargine, un inhibiteur des SERCA (données personnelles). Une inhibition des pompes SERCA dans NCI-H929 associée à une inhibition des N-glycosylations

pourrait expliquer la réversion très faible de l'induction de CHOP et de la mort cellulaire par le D-mannose. Cependant, de plus amples investigations sont nécessaires pour élucider le mécanisme d'induction du stress du RE par le 2-DG.

Nous nous sommes également intéressés au rôle des membres de la famille de Bcl-2 dans l'apoptose induite par le 2-DG en investiguant leur modulation à la fois dans les lignées sensibles et résistantes. Nous avons objectivés une diminution significative du niveau de Mcl-1 dans les 5 lignées testées indiquant que cet événement était uniforme. Nous avons ensuite montré que cette diminution de Mcl-1 était en partie secondaire au défaut de N-glycosylation, en effet, l'addition de D-mannose permet une inhibition de la diminution de Mcl-1. Malheureusement nous n'avons pu évaluer si l'implication de ce défaut de N-glycosylation dans la diminution de Mcl-1 impliquait un stress du RE ou un défaut de glycosylation d'une protéine spécifiquement impliquée dans la régulation de Mcl-1. Nous avons également déterminé que la diminution de Mcl-1 n'impliquait pas un mécanisme transcriptionnel mais mettait en jeu au moins en partie une régulation de la dégradation de Mcl-1. Mcl-1 est une protéine à demi vie courte (30 min à 2h) dont la dégradation protéasomale n'est pas complètement élucidée mais au moins 3 ubiquitines ligases, à savoir Mule, β -TRCP et FBW7 et une désubiquitine ligase : USP9X sont impliquées dans ce mécanisme (Opferman and Green 2010; Inuzuka, Fukushima et al. 2011). Ainsi, de plus amples investigations sont nécessaires pour comprendre le mécanisme de la dégradation protéasomale de Mcl-1 induite par le 2-DG. De même, il serait intéressant d'évaluer le niveau de phosphorylation de Mcl-1, en effet, la dégradation de Mcl-1 nécessite une phosphorylation sur la Ser159. L'une des kinases impliquée est GSK3 β qui est activée notamment par l'inhibition de la voie AKT. Une inhibition de la transcription cap-dépendante par le biais de l'activation de l'AMPK (Meynet, Zunino et al. 2013) ou de l'inhibition de la voie AKT/mTOR induisant un arrêt de traduction 4EBP1 dépendante (Coloff, Macintyre et al. 2011) pourrait être une autre hypothèse expliquant la diminution de Mcl-1. Finalement, un arrêt de traduction est toujours possible par le biais de eIF2 α , cependant l'évaluation d'eIF2 α phosphorylé par western blot ne nous a permis de mettre en évidence qu'une phosphorylation très transitoire, durant moins de 1h et il nous paraissait donc peu probable que cet événement soit à l'origine de la diminution de Mcl-1 (données personnelles).

La diminution uniforme de Mcl-1 est accompagnée d'une augmentation globale d'expression des protéines BH3-only. Cependant, en fonction des lignées testées, des BH3-only différentes (Puma et/ou Noxa) sont augmentées. Ceci montre que le 2-DG régule les protéines de la famille de Bcl-2 à différents niveaux modifiant ainsi la balance anti/pro-apoptotiques sur un versant pro-apoptotique. De façon surprenante, ce déséquilibre conduit à une induction de mort cellulaire vraiment différente en fonction de la lignée testée. Comme la diminution de Mcl-1 semblait être une modification majeure, nous avons émis l'hypothèse que les lignées présentaient une dépendance différente envers Mcl-1 pour leur survie. Grâce à l'évaluation de la mort cellulaire induite par la diminution de Mcl-1 par des siRNA, nous avons montré une dépendance très variable envers Mcl-1 pour la survie avec une mort induite par les siRNA variant de 10 à 99% pour SKMM2 et OPM2 respectivement. De plus, nous avons trouvé une corrélation forte entre la dépendance envers Mcl-1 pour la survie et la sensibilité au 2-DG. Il existe une corrélation inverse entre le niveau endogène de Bcl-2 et la sensibilité au 2-DG. Ceci conduit à la possibilité que certaines lignées pourraient être dépendantes envers Mcl-1 pour leur survie, alors que d'autres seraient plus dépendantes envers Bcl-2 pour leur survie.

Il est maintenant bien établi que l'ABT-199, par sa fixation spécifique dans la poche hydrophobe de Bcl-2, exploite la dépendance des cellules envers Bcl-2 pour les tuer. Touzeau et Al. ont récemment démontré que seules les lignées de MM avec un haut ratio Bcl-2/Mcl-1 étaient tuées par l'ABT-199 (Touzeau, Dousset et al. 2014). Toutes les lignées sensibles à l'ABT-199 présentent une t(11 ; 14) ce qui pourrait refléter une tendance de ces lignées à être plus dépendant de Bcl-2 que de Mcl-1 pour leur survie. Nous avons donc pensé à exploiter cette dépendance envers Mcl-1 ou Bcl-2 en investiguant la combinaison ABT-199/2-DG permettant de cibler à la fois Mcl-1 et Bcl-2 pour tuer les cellules myélomateuses. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux lignées des groupes MMSET et MAF avec un pronostic plus péjoratif, qui présentent un effet synergique très fort en réponse à la combinaison. Des investigations réalisées sur des échantillons primaires de patients ont confirmées cette synergie. Le 2-DG a été évalué dans quelques études cliniques seul ou en combinaison avec de la chimiothérapie ou de la radiothérapie et semble bien toléré (El Mjiyad, Caro-Maldonado et al. 2011). D'un autre côté, le développement clinique de l'ABT-199 en monothérapie est en cours chez les patients avec MM en rechute mais

ce traitement devrait n'être efficace que dans les MM avec t(11 ; 14) et les leucémies à plasmocytes. Ainsi l'effet de la combinaison du 2-DG avec l'ABT-199 mériterait d'être évalué en clinique pour le traitement des patients myélomateux avec pronostic péjoratif.

Bibliographie

Alexander, D. D., P. J. Mink, et al. (2007). "Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature." International journal of cancer. Journal international du cancer **120 Suppl 12**: 40-61.

Alexanian, R., A. Haut, et al. (1969). "Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens." JAMA : the journal of the American Medical Association **208**(9): 1680-1685.

Anon (2003). "Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group." British journal of haematology **121**(5): 749-757.

Attal, M., J. L. Harousseau, et al. (1996). "A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome." The New England journal of medicine **335**(2): 91-97.

Avet-Loiseau, H., M. Attal, et al. (2012). "Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **30**(16): 1949-1952.

Bazzi, M. and A. Badros (2010). "Multiple myeloma: Implementing signaling pathways and molecular biology in clinical trials." Cancer biology & therapy **10**(9): 830-838.

Belot, A., M. Velten, et al. (2009). "Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005." INVS.

Bergsagel, P. L., W. M. Kuehl, et al. (2005). "Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma." Blood **106**(1): 296-303.

Brown, G. and R. Ceredig (2009). Cell determination during hematopoiesis. New York, Nova Biomedical Books.

Brown, L. M., G. Gridley, et al. (2008). "Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders." Blood **111**(7): 3388-3394.

Brown, L. M., M. S. Linet, et al. (1999). "Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S." Cancer **85**(11): 2385-2390.

Child, J. A., G. J. Morgan, et al. (2003). "High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma." The New England journal of medicine **348**(19): 1875-1883.

Coloff, J. L., A. N. Macintyre, et al. (2011). "Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition." Cancer Res **71**(15): 5204-5213.

Cotter, T. G. (2009). "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." Nature reviews. Cancer **9**(7): 501-507.

Dimopoulos, M., A. Spencer, et al. (2007). "Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma." The New England journal of medicine **357**(21): 2123-2132.

El Mjiyad, N., A. Caro-Maldonado, et al. (2011). "Sugar-free approaches to cancer cell killing." Oncogene **30**(3): 253-264.

Garderet, L., S. Iacobelli, et al. (2012). "Superiority of the triple combination of bortezomib-thalidomide-dexamethasone over the dual combination of thalidomide-dexamethasone in patients with multiple myeloma progressing or relapsing after autologous transplantation: the MMVAR/IFM 2005-04 Randomized Phase III Trial from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **30**(20): 2475-2482.

Gomez-Bougie, P. and M. Amiot (2013). "Apoptotic machinery diversity in multiple myeloma molecular subtypes." Frontiers in immunology **4**: 467.

Greipp, P. R., J. San Miguel, et al. (2005). "International staging system for multiple myeloma." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **23**(15): 3412-3420.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 89-102.

Howlader, N., A. Noone, et al. (2013). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013."

Hulin, C., T. Facon, et al. (2009). "Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **27**(22): 3664-3670.

Indran, I. R., G. Tufo, et al. (2011). "Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells." Biochimica et biophysica acta **1807**(6): 735-745.

Inuzuka, H., H. Fukushima, et al. (2011). "Mcl-1 ubiquitination and destruction." Oncotarget **2**(3): 239-244.

Jourdan, M., M. Ferlin, et al. (1998). "The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells." British journal of haematology **100**(4): 637-646.

Kachuri, L., P. A. Demers, et al. (2013). "Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men." International journal of cancer. Journal international du cancer **133**(8): 1846-1858.

Kang, H. T. and E. S. Hwang (2006). "2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic." Life Sci **78**(12): 1392-1399.

Kang, H. T. and E. S. Hwang (2006). "2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic." Life sciences **78**(12): 1392-1399.

Keats, J. J., T. Reiman, et al. (2003). "In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression." Blood **101**(4): 1520-1529.

Kuehl, W. M. and P. L. Bergsagel (2012). "Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor." The Journal of clinical investigation **122**(10): 3456-3463.

Kurtoglu, M., N. Gao, et al. (2007). "Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation." Molecular cancer therapeutics **6**(11): 3049-3058.

Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2009). "Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma." Leukemia **23**(1): 3-9.

Linnet, M. S., S. D. Harlow, et al. (1987). "A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use." Cancer research **47**(11): 2978-2981.

Lode, L., M. Eveillard, et al. (2010). "Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma." Haematologica **95**(11): 1973-1976.

Marciniak, S. J., C. Y. Yun, et al. (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Genes Dev **18**(24): 3066-3077.

Meynet, O., B. Zunino, et al. (2013). "Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice." Blood **122**(14): 2402-2411.

Michallet, A. S., P. Mondiere, et al. (2011). "Compromising the unfolded protein response induces autophagy-mediated cell death in multiple myeloma cells." PLoS One **6**(10): e25820.

Moore, C. E., O. Omikorede, et al. (2011). "PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic beta-cells." Molecular endocrinology **25**(2): 315-326.

Moreau, P. (2012). "The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: emerging agents and novel treatment strategies." Seminars in hematology **49 Suppl 1**: S33-46.

Moreau, P., H. Avet-Loiseau, et al. (2011). "Current trends in autologous stem-cell transplantation for myeloma in the era of novel therapies." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **29**(14): 1898-1906.

Moreau, P., J. San Miguel, et al. (2013). "Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO **24 Suppl 6**: vi133-137.

Moreaux, J., B. Klein, et al. (2011). "A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines." Haematologica **96**(4): 574-582.

Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyad, et al. (2012). "Cancer metabolism: current perspectives and future directions." Cell death & disease **3**: e248.

Ni Chonghaile, T. and A. Letai (2008). "Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells." Oncogene **27 Suppl 1**: S149-157.

Nishitoh, H. (2012). "CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response." J Biochem **151**(3): 217-219.

Nishitoh, H. (2012). "CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response." Journal of biochemistry **151**(3): 217-219.

Oancea, M., A. Mani, et al. (2004). "Apoptosis of multiple myeloma." International journal of hematology **80**(3): 224-231.

Opferman, J. T. and D. R. Green (2010). "DUB-le Trouble for Cell Survival." Cancer cell **17**(2): 117-119.

Paiva, B., J. Almeida, et al. (2010). "Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders." Cytometry. Part B, Clinical cytometry **78**(4): 239-252.

Palumbo, A., J. S. Miguel, et al. (2008). "Lenalidomide: a new therapy for multiple myeloma." Cancer treatment reviews **34**(3): 283-291.

Ponisch, W., P. S. Mitrou, et al. (2006). "Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone--a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO)." Journal of cancer research and clinical oncology **132**(4): 205-212.

Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, et al. (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell **129**(7): 1337-1349.

Richardson, P. G., P. Sonneveld, et al. (2005). "Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma." The New England journal of medicine **352**(24): 2487-2498.

Robillard, N., S. Wulleme, et al. (2014). "Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets." Frontiers in immunology **5**: 137.

San Miguel, J. F., R. Schlag, et al. (2008). "Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma." The New England journal of medicine **359**(9): 906-917.

Shutt, D. C., M. S. O'Dorisio, et al. (2010). "2-deoxy-D-glucose induces oxidative stress and cell killing in human neuroblastoma cells." Cancer Biol Ther **9**(11): 853-861.

Souers, A. J., J. D. Levenson, et al. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." Nature medicine **19**(2): 202-208.

Swerdlow, S. H. (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Szegezdi, E., D. C. Macdonald, et al. (2009). "Bcl-2 family on guard at the ER." Am J Physiol Cell Physiol **296**(5): C941-953.

Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Nat Cell Biol **13**(3): 184-190.

Tennant, D. A., R. V. Duran, et al. (2010). "Targeting metabolic transformation for cancer therapy." Nat Rev Cancer **10**(4): 267-277.

Touzeau, C., C. Dousset, et al. (2013). "The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma." Leukemia.

Touzeau, C., C. Dousset, et al. (2014). "The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma." Leukemia **28**(1): 210-212.

Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.

Venable, A., M. Mitalipova, et al. (2005). "Lectin binding profiles of SSEA-4 enriched, pluripotent human embryonic stem cell surfaces." BMC developmental biology **5**: 15.

Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.

Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." Journal of experimental & clinical cancer research : CR **30**: 87.

Yamaguchi, R., E. Janssen, et al. (2011). "Efficient elimination of cancer cells by deoxyglucose-ABT-263/737 combination therapy." PloS one **6**(9): e24102.

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nature reviews. Molecular cell biology **9**(1): 47-59.

Zagorodna, O., S. M. Martin, et al. (2012). "2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines." Oncogene **31**(22): 2738-2749.

Zhan, F., Y. Huang, et al. (2006). "The molecular classification of multiple myeloma." Blood **108**(6): 2020-2028.

Zhang, C., Z. Ao, et al. (1996). "A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells." J Immunol **157**(9): 3980-3987.

Zhang, X. D., E. Deslandes, et al. (2006). "Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro." Anticancer Res **26**(5A): 3561-3566.

Vu, le Président du Jury,

Vu, le Directeur de Thèse,

Vu, le Doyen de la Faculté,

SERMENT MEDICAL

Au moment d'être admis (e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis (e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré (e) et méprisé (e) si j'y manque.

NOM : HALLIEZ

PRENOM : Maxime

Titre de Thèse : LE CIBLAGE DE LA GLYCOLYSE PAR LE 2-DG ET DE LA VOIE MITOCHONDRIALE PAR UN INHIBITEUR SPECIFIQUE DE BCL-2, L'ABT-199, CONTRECARRE LA RESISTANCE A L'ABT-199 DANS LE MYELOME MULTIPLE

RESUME

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie qui correspond à une prolifération de plasmocytes clonaux dans la moelle osseuse et demeure actuellement incurable. Cette pathologie est caractérisée par une dérégulation des mécanismes d'apoptose avec notamment hyperexpression de protéines anti-apoptotiques. Touzeau et Al. ont montré que l'ABT-199, molécule BH3 mimétique spécifique de Bcl-2, était efficace dans le MM dans un sous groupe présentant une t(11 ;14) et un rapport Bcl-2/Mcl-1 élevé. L'objet de ce travail a été d'évaluer une association entre l'ABT-199 et un inhibiteur de la glycolyse, le 2-Déoxyglucose (2-DG) afin d'essayer de cibler un nombre plus important de MM.

Nous avons montré que le 2-DG possédait une efficacité variable sur un panel de 28 lignées de MM et présentait notamment une plus grande efficacité dans le sous groupe de MM présentant une t(4 ;14), associé à un pronostic plus péjoratif. Le 2-DG induit une mort qui ne semble pas impliquer la diminution de la glycolyse mais est en partie induite par un défaut de N-glycosylation. Ce défaut de N-glycosylation est responsable d'un stress du réticulum qui pourrait être impliqué dans la mort cellulaire. Le 2-DG est responsable d'une diminution de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 qui semble tenir une place essentielle dans la mort cellulaire comme le prouve la corrélation importante entre la mort induite par le 2-DG et par expériences de siRNA de Mcl-1.

Finalement, nous avons montré que l'association du 2-DG et de l'ABT-199 était synergique dans les lignées de MM ainsi que dans des échantillons primaire de patients offrant donc un rationnel à son évaluation en clinique.

MOTS-CLES

Myélome multiple, 2-Déoxyglucose, Métabolisme glycolytique, N-glycosylations, ABT-199