

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Nom : TOUMI-WUILLEME

Prénom : Soraya

Date : 17 décembre 2003

Président du jury : Mme le professeur Berthe-Marie IMBERT

Directeur de la thèse : Monsieur le professeur Régis BATAILLE

Titre de la thèse :

EXPRESSION DE LA PROTEINE ANTI-APOPTOTIQUE MCL-1 DANS LE
MYELOME MULTIPLE
CORRELATION AVEC L'ACTIVITE DE LA MALADIE

Résumé de la thèse :

Le myélome multiple est une hémopathie maligne caractérisée par l'expansion clonale de plasmocytes tumoraux qui s'accumulent dans la moelle osseuse. La protéine anti-apoptotique Mcl-1 est un facteur de survie des plasmocytes de MM.

Nous avons quantifié en cytométrie en flux, par quadruple marquage, l'expression de Mcl - 1 chez 45 patients atteints de MM. Nous avons étudié en parallèle à Mcl-1, l'expression de la protéine Bcl-2, autre protéine anti-apoptotique. Nos résultats montrent que Mcl-1, contrairement à Bcl-2, est davantage exprimé dans les plasmocytes de MM que dans les plasmocytes normaux et que cette hyper-expression est essentiellement cantonnée au compartiment le plus proliférant CD45 Fort. L'étude de corrélation entre l'expression de Mcl-1 et la prolifération ne montrent pas, contrairement à Bcl-2, de corrélation significative. Aussi, l'hyper-expression constitutive de Mcl-1, essentiellement dans le compartiment CD45 Fort, est probablement liée directement à la malignité intrinsèque de la tumeur.

Nous avons aussi montré que l'expression de Mcl-1 est liée à l'activité de la maladie. En effet cette protéine est plus exprimée dans les MM en rechutes que dans les MM au diagnostic. Aussi, la protéine Mcl-1 à probablement une valeur pronostic dans la progression du MM.

Mots clés : *MYELOME MULTIPLE*, MCL-1, BCL-2, CD45, Cytométrie en flux.

SOMMAIRE

<i>Index des figures et tableaux</i>	8
<i>Abréviations</i>	10
<i>GENERALITES</i>	11
<i>I. Le Myélome Multiple</i>	12
A. Définition	12
B. Signes cliniques	12
C. Signes biologiques	13
D. Diagnostic, pronostic et classification	14
E. Epidémiologie, pathogénie et physiopathologie	14
1. Epidémiologie	14
2. Anomalies chromosomiques	17
3. Rôle des cytokine	17
4. Rôle de l'environnement médullaire	19
5. Biologie du plasmocyte normal et du plasmocyte malin	20
a. Biologie du plasmocyte normal	20
b. Biologie du plasmocyte myélomateux	22
c. Notion de compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux et de MM	22
F. Thérapeutique	25
<i>II. Mcl-1 et protéines de la famille Bcl-2</i>	27
A. Les protéines de la famille Bcl-2	27
1. Description	27
2. Différents membres de la famille Bcl-2	28
3. Protéine de la famille Bcl-2 et myélome multiple	32
a. Expression dans le MM	32
b. Régulation par des cytokines	32
c. Rôle dans la chimiorésistance	33
d. Rôle dans le pronostic du MM	33
B. Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)	34

1. Description	34
2. Distribution et localisation	34
3. Rôle	34
4. Régulation	36
5. Interaction avec d'autres protéines	36
6. Mcl-1 et MM	37
<u>OBJECTIFS</u>	40
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	42
<u>I. Prélèvement de moelle osseuse normale</u>	43
<u>II. Prélèvements d'amygdales</u>	43
<u>III. Prélèvements de patients atteints de MM</u>	43
<u>IV. Préparation des échantillons</u>	44
<u>V. Cytométrie en flux</u>	44
A. Réactif.....	44
B. Marquage de surface	45
C. Marquage intracellulaire	45
D. Marquage de la phase S du cycle cellulaire	46
E. Analyse en cytométrie en flux (CMF)	47
1. Principe de la CMF	47
2. L'appareillage	47
3. Analyse des résultats	47
F. Difficultés techniques du phénotypage des plasmocytes	49
G. Etude statistique	50
<u>RESULTATS</u>	53
<u>I. Phénotypage des plasmocytes amygdaliens, de moelles osseuses normales et de myélome multiple (MM)</u>	54
A. Phénotype de plasmocytes normaux.....	54
B. Phénotype de plasmocytes myélomateux.....	56

<i>II. Etude de la prolifération plasmocytaire dans les compartiments CD45</i>	58
A. Etude de la prolifération dans les plasmocytes normaux en fonction des sous- populations CD45	58
B. Etude de la prolifération dans les plasmocytes de MM en fonction des sous-populations CD45	60
<i>III. Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2</i>	62
A. Plasmocytes Normaux.....	62
1. Expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2.....	62
2. Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45	64
3. Etude des corrélation entre l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 et la prolifération...	34
B. Plasmocytes de MM.....	68
1. Expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2	68
a. Mcl-1	71
b. Bcl-2.....	71
2. Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45	74
3. Etude des corrélations entre l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 et la prolifération	77
<i>DISCUSSION-CONCLUSION</i>	79
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	90

Index des Tableaux et des Figures

Tableau I : Classification de Durie-Salmon	13
Tableau II: Phénotype des plasmocytes	23
Tableau III : Combinaison d'anticorps monoclonaux pour un phénotypage membranaire des plasmocytes normaux (moelles osseuses normales et amygdales) et de MM.	8
Tableau IV: Combinaison d'anticorps monoclonaux pour un phénotypage intracellulaire des plasmocytes normaux (moelle osseuse et d'amygdales) et de MM.	9
Tableau V : nombre de plasmocytes analysés en fonction du % de plasmocytes parmi les CMN.	13
Tableau VI : Phénotypage des plasmocytes normaux.	18
Tableau VII : Phénotypage des plasmocytes de 45 MM.	20
Tableau VIII : Pourcentage des plasmocytes normaux en phase S dans les deux compartiments CD45 (faible et Fort).	22
Tableau IX: Etude de la prolifération dans les compartiments CD45.	24
Tableau X : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes de moelles osseuses normales et des amygdales.	26
Tableau XI : Expression des protéines Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux.	26
Tableau XII : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45 de plasmocytes normaux de la moelle osseuse.	28
Tableau XIII : Expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux en fonction du CD45.	28
Tableau XIV : Etude des corrélations entre l'expression de Mcl-1 ou Bcl-2 et la prolifération (labelling index LI) dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse. r= coefficient de corrélation, n= nombre d'échantillons.	30
Tableau XV : Comparaison des médianes du RMIF des valeurs de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux de 8 moelle osseuse (MO) et de 45 MM.	32
Tableau XVI : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 au diagnostic et en rechute dans 45 MM.	34
Tableau XVII : Expression de Mcl-1 et de Bcl-2 chez 45 MM.	36
Tableau XVIII : Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45.	38
Tableau XIX : Etude de la corrélation entre la prolifération et l'expression de Mcl-1 et Bcl-2.	40
Tableau XX : Valeurs des ratio de moyenne d'intensité de fluorescence de Mcl-1 et Bcl-2 et le pourcentage de l'index de phase S dans 25 (MM).	41
 Figure 1 : Morphologie du plasmocyte normal	 21
Figure 2 : Morphologie de plasmocytes de MM	21
Figure 3 : La famille Bcl-2	27
Figure 4 : Expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL dans le lignage B et T	28
Figure 5 : Les voies de signalisation possibles pour induire l'expression de la protéine Mcl-1	11
Figure 6 : Système optique d'un cytomètre analyseur (BECTON DICKINSON France)	14

<u>Figure 7 : Stratégie d'identification des plasmocytes : exemple de plasmocytes de la moelle normale (en bleu) et de plasmocytes de MM (en jaune).</u>	15
<u>Figure 8 : Etude de la prolifération des plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses dans les compartiments CD45.</u>	22
<u>Figure 9 : Etude de la prolifération des plasmocytes de 16 MM dans les compartiments CD45.</u>	24
<u>Figure 10 : Etude de l'expression de la protéine Mcl-1 en fonction des compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses normales.</u>	29
<u>Figure 11 : Etude de l'expression de la protéine Bcl-2 en fonction des compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses normales.</u>	29
<u>Figure 12 : Etude de la corrélation entre l'expression de la protéine Bcl-2 et l'index de phase S dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse.</u>	30
<u>Figure 13 : Cytogrammes de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl2 dans les compartiments CD45.</u>	33
<u>Figure 14 : Histogramme de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les MM au diagnostic et en rechute.</u>	35
<u>Figure 15 : Etude de l'expression de Mcl-1 dans les compartiments CD45 de 25 MM.</u>	39
<u>Figure 16 : Etude de l'expression de Bcl-2 dans les compartiments CD45 de 25 MM.</u>	39

Abréviations

ASO = antisense oligonucleotide

Bcl-2 = B-cell leukemia/lymphoma 2

BJ = Bence Jones

ERK = Extracellular signal-regulated protein Kinase

GM-CSF = Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor

Ig = Immunoglobuline

IL = Interleukine

IRS-1 = Insulin Receptor substrate

kDa = kilo-Dalton

LLC = Leucémie Lymphoïde Chronique

MAPK = mitogen activated protein kinase

MGUS = Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

Mcl-1 = Myeloid Cell Leukemia-1

NCAM = Neural cell adhesion molecule

antigen PI3-K = Phosphatidylinositol-3-kinase

STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription

BH = Bcl-2 Homology domain

CD = Cluster of Differentiation

EGF = Epidermal Growth Factor

IGF = Insulin-like Growth Factor

IFN = Interferon

JAK = Janus Kinase

LI = labeling index

MM = Myélome Multiple

PCNA = proliferation cell nuclear

VLA-4 = Very Late Antigen 4

GENERALITES

I. Myélome multiple

A. Définition

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne qui affecte les cellules terminales de la différenciation lymphocytaire B, les cellules plasmocytaires. Le MM se caractérise par l'expansion clonale de plasmocytes tumoraux incomplètement différenciés qui s'accumulent principalement dans la moelle osseuse. Les cellules myélomateuses s'accumulent de façon hétérogène dans le squelette, créant des lésions ostéolytiques multiples, d'où la dénomination de myélome multiple. Malgré les progrès apportés à cette hémopathie en terme de chimiothérapie, les rémissions complètes sont rares et l'issue de la maladie reste fatale. La médiane de survie des patients traités par chimiothérapie standard est de 24 à 30 mois. Elle passe à 5 ans pour les patients bénéficiant d'une autogreffe de cellules souches du sang ou de la moelle.

B. Signes cliniques

Au début de la maladie, le MM se caractérise généralement par des atteintes ostéolytiques. Ces lésions sont présentes chez la majorité des patients dès le diagnostic. L'atteinte osseuse se présente le plus souvent sous forme de lésions de type lytique qui sont très invalidantes et très douloureuses. Elles sont en général multifocales et atteignent particulièrement les os du crâne, les côtes, la clavicule, le sternum, l'axe pelvirachidien et les régions proximales des os longs. Des fractures spontanées ainsi qu'une hypercalcémie sont souvent associées aux lésions osseuses. Une ostéoporose peut être observée dans les rares cas de MM qui ne présentent pas d'ostéolyse radiologiques.

Une insuffisance rénale est souvent observée. Elle est d'autant plus accentuée qu'il existe une protéinurie importante.

C. Signes biologiques

Le MM est généralement associé à la production par les plasmocytes malins d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale ; dans ce cas de figure le MM est dit sécrétant. Dans 56% des cas, il s'agit d'une Ig G, dans 26% des cas d'une Ig A et plus rarement d'une chaîne légère retrouvée dans les urines et qui constitue la protéinurie de Bence-Jones. Des myélomes à Ig D, à IgM ou à IgE sont très rarement observés. La présence d'une Ig monoclonale entraîne une forte élévation de la vitesse de sédimentation.

Il existe des MM dit non sécrétants pour lesquels aucune immunoglobuline monoclonale n'est détectée dans les liquides biologiques.

L'hypercalcémie est un signe majeur du MM. L'atteinte rénale secondaire à la présence d'une protéinurie de Bence-Jones ainsi que la déshydratation, favorisent et accentuent cette hypercalcémie.

Parmi les conséquences de l'envahissement de la moelle osseuse qui entraîne une inhibition de l'hématopoïèse normale, on observe une anémie ainsi qu'une thrombopénie. Une hypogammaglobulinémie polyclonale est souvent la cause d'infections bactériennes récidivantes parfois révélatrices, mais surtout, pouvant entraîner le décès du patient.

Des formes moins typiques de MM peuvent être observées. Certains MM à croissance lente appelés MM indolents ou « Smoldering Myeloma » sont caractérisés par un tableau initial limité à une Ig monoclonale, sans signes osseux, rénaux ou hématologiques. Une plasmocytose faible de l'ordre de 10 à 30 % est observée. Cette forme de MM peut évoluer sur une longue période avant que d'autres manifestations cliniques n'apparaissent.

Une forme de MM appelée leucémie à plasmocytes peut être observée et elle correspond à un passage sanguin de plasmocytes malins en grande quantité.

D. Diagnostic, pronostic et classification

Le diagnostic du MM repose sur un faisceau d'arguments. On retrouve les lésions osseuses documentées par la radiographie ou l'IRM, la présence d'une Ig monoclonale sérique et/ou urinaire et la présence sur le myélogramme ou la biopsie ostéomédullaire d'un infiltrat plasmocytaire. On estime qu'une plasmocytose supérieure à 10% associée ou non à des anomalies morphologiques des cellules plasmocytaires confirme le diagnostic.

Au début de la maladie, le MM se développe par l'accumulation de plasmocytes tumoraux au niveau de la moelle osseuse. Ces plasmocytes sont peu proliférants. Par la suite, la cinétique de la maladie s'accélère et les plasmocytes sont de plus en plus proliférants. On peut ainsi observer une infiltration extramédullaire de la tumeur.

Durie et Salmon ont établi une classification qui permet de déterminer le stade de la maladie selon différents critères cliniques et biologiques (Tableau I).

Le pronostic du MM est corrélé au stade de la maladie ainsi qu'à la masse tumorale. Actuellement le pronostic du MM est donné par des marqueurs biologiques plus pertinents tels que le taux de la β 2-microglobuline (Kyle, 1995) ou par la délétion du chromosome 13.

E. Epidémiologie, pathogénie et physiopathologie

1. Epidémiologie

L'incidence du MM varie fortement d'un pays à l'autre : elle est faible par exemple en chine avec environ 1 cas pour 100 000 habitants, elle est d'environ 3 à 4 pour 100 000

habitants dans la plupart des pays industrialisés occidentaux. En France, le MM représente environ 1 % des nouveaux cas de cancers et 10 à 15% des hémopathies malignes. Aux Etats-Unis, il est responsable d'environ 12000 décès par an, soit près de 2% des décès par cancer et environ 20% des décès par hémopathie maligne. L'incidence du MM varie en fonctions de différents facteurs : l'origine ethnique semble jouer un rôle. En effet le MM est plus fréquent dans la population caucasienne et environ deux fois plus chez les sujets de race noire. On note une prédominance masculine avec un ratio homme / femme de 1,4 (Bataille and Harousseau, 1997) et une augmentation de l'incidence en fonction de l'âge. En effet, 98% des patients au diagnostic ont plus de 40 ans et un pic de survenue de la maladie est observé entre 65 et 70 ans. Cette liaison à l'âge permet d'expliquer en partie l'augmentation actuelle de l'incidence du MM compte tenu du vieillissement de la population. On constate cependant une augmentation récente des cas de myélome survenant avant l'âge de 55 ans. Cette tendance semble indiquer l'existence de facteurs environnementaux à l'origine de la maladie.

Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (ou MGUS pour *monoclonal gammopathies of undetermined significance*) constituent un état pré-néoplasique. Elles sont également caractérisées par la production d'une immunoglobuline monoclonale d'isotype G ou A, mais sans retentissement clinique et plus particulièrement sans lésions osseuses. Elles évoluent dans 25% des cas vers un myélome multiple avec une médiane d'apparition de 10 ans, et la plupart des MM se développent sur une MGUS préexistante (Kyle, 1994).

Le MM peut être considéré comme la conséquence de deux événements : le premier est oncogénique, précoce, responsable d'une gammopathie monoclonale, et le second, plus tardif, à l'origine du MM (Bataille and Harousseau, 1997; Hallek et al., 1998).

Stade I :

Si tous les critères suivants sont observés :

- hémoglobine > 10 g/dl
- calcémie $\leq 2,60$ mmol/l
- absence de lésions osseuses ou une seule lésion
- taux de composant monoclonal :
 - IgG < 50 g/l
 - IgA < 30 g/l
 - BJ < 4 g/24h

Stade II :

Ni I, ni III

Stade III :

Si un ou plusieurs des critères suivants sont réunis :

- hémoglobine < 8.5 g /dl
- calcémie > 3 mmol/l
- Lésions ostéolytiques avancées
- Taux de composant monoclonal :
 - IgG > 70 g/l
 - IgA > 50 g/l
 - BJ > 12 g/24h

Sous-classification (A ou B) :

A : fonction rénale à peu près normale

(Créatinémie < 170 μ mol/l)

B : Dysfonctionnement rénal

(Créatinémie ≥ 170 μ mol/l)

Tableau I : Classification de Durie-Salmon

2. Anomalies chromosomiques

Les cellules myélomateuses prolifèrent lentement dans la moelle osseuse. Elles perdent leur capacité de division et de différenciation complète.

Les causes de ces défaillances sont inconnues, néanmoins la translocation entre le chromosome 14q32 et différents chromosomes partenaires tels que les chromosomes 11 et 4 surtout mais aussi 6, 16, 9, 18, 8 semble intervenir dans ces différents événements (Avet-Loiseau et al., 1998)

La dérégulation de l'oncogène *c-myc* pourrait aussi intervenir (Avet-Loiseau et al., 2001). Des mutations ponctuelles de l'oncogène ras (N-ras, K-ras) semblent jouer un rôle dans les rechutes médullaires et surtout extramédullaires (Bezieau et al., 2001) et des mutations de la p53 ont été retrouvées dans les rechutes extramedullaires (Bataille and Harousseau, 1997).

L'existence d'une monosomie du chromosome 13 semble être un événement majeur dans l'évolution du MM. Elle est considérée actuellement comme un facteur de mauvais pronostic de la maladie (Avet-Loiseau et al., 1999a; Avet-Loiseau et al., 1999b) (Facon et al., 2001).

Enfin, la translocation 14q32 et la délétion du 13q ne sont pas des événements aléatoires dans le MM mais plutôt des événements de l'oncogenèse du MM. Le réarrangement en 14q32 serait un événement précoce dans le développement clonal et définirait des groupes de MM selon le chromosome partenaire alors que la délétion du 13q est vraisemblablement corrélée à l'agressivité de la maladie (Avet-Loiseau et al., 2002).

3. Rôle des cytokines

L'IL-6 est un facteur essentiel dans la physiopathologie du MM. C'est un facteur de croissance et de survie des cellules myélomateuses (Kawano et al., 1989); (Hardin et al.,

1994; Klein et al., 1989); (Lichtenstein et al., 1995). Le taux d'IL-6 est augmenté chez les patients atteints de MM (Bataille et al., 1989). Cette production est dépendante de l'environnement médullaire.

L'IL-6 agit par l'intermédiaire de son récepteur constitué de deux sous-unités : une chaîne α ou gp80 qui lie l'IL-6 et une chaîne β ou gp 130 responsable de la transduction du signal. Alors que la gp 80 est spécifique de l'IL-6, la gp 130 intervient dans la transduction du signal d'autres cytokines tel que l'Oncostatine M (OSM) et le Leukemia Inhibitory Factor (LIF). La liaison de l'IL-6 à la gp 80 provoque le recrutement de la gp130 formant un complexe constitué de deux de chacune des protéines : IL-6, gp80, gp130.

L'agrégation du récepteur conduit à l'activation de plusieurs voies de transduction du signal. Tout d'abord, la voie JAK/STAT, qui fait intervenir des protéines nommées Janus Kinases (JAK1, JAK2, Tyk2), est de loin la voie la plus documentée dans le MM. Son activation aboutit à l'activation de STAT 3, facteur de transcription dont le rôle est d'induire la transcription de gènes de molécules de survie tel que Mcl-1 (Puthier et al., 1999a). La voie Ras/MAPKinase, moins décrite que la voie JAK/STAT, semble être importante dans le MM. Elle permet d'activer la voie ERK1/ERK2 qui va alors activer plusieurs facteurs de transcriptions tel que NF et AP1 (pour revue (Hallek et al., 1998). Enfin, la voie des phosphatidylinositol-3-kinases-Akt1 (PI3-K/Akt1) semble aussi activée (Hideshima et al., 2001).

Il semble que la voie JAK/STAT soit préférentiellement liée à la survie des cellules tandis que la voie Ras/MAPK est plutôt liée à la prolifération.

L'IGF-1 est aussi un facteur de survie du MM. Il est produit par la matrice osseuse et est capable d'induire directement la prolifération des cellules myélomateuses (Georgii-Hemming et al., 1996). IGF-1 active son récepteur membranaire IGF-1R. Ce récepteur activé, stimule

les cellules de MM par la phosphorylation de IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) qui à son tour active différentes voies de signalisation cellulaire et en particulier la voie des PI3-K/Akt (Ferlin et al., 2000); (Ge and Rudikoff, 2000).

4. Rôle de l'environnement médullaire

Le micro-environnement médullaire joue un rôle essentiel dans la survie des plasmablastes et des plasmocytes. Kawano et coll. ont montré qu'après purification, les plasmocytes meurent rapidement par apoptose, et cette mort cellulaire peut être antagonisée par la co-culture avec des cellules stromales médullaires (Kawano, 1995). Cette même étude a montré que le surnageant de culture des cellules stromales est également capables d'inhiber l'apoptose des cellules plasmocytaires. Ceci semble être lié à la synthèse par ces cellules stromales de facteurs solubles, en particulier l'IL-6 (Lokhorst et al., 1994) ; (Uchiyama et al., 1993).

Le contact direct de plasmocytes avec les cellules stromales via leurs molécules d'adhésion respectives, semble jouer un rôle important dans la survie des plasmocytes. De même, l'interaction des cellules plasmocytaires avec les composants de la matrice extra-cellulaire est essentielle pour la survie et la différenciation des plasmablastes. L'interaction de la fibronectine (produite par les cellules stromales) et l'intégrine VLA-4 semble en particulier jouer un rôle important, comme le montre l'action bloquante des anticorps anti-VLA-4 et anti-fibronectine, sur la différenciation plasmocytaire induite par le surnageant de culture de cellules stromales médullaires (Roldan et al., 1992).

5. Biologie du plasmocyte normal et du plasmocyte malin

A) Biologie du plasmocyte normal :

Sur le plan physiologique, le plasmocyte est une cellule issue du lignage lymphocytaire. En effet, les lymphocytes B naïfs (résultat de la lymphopoïèse dite précoce) quittent la moelle osseuse et circulent dans le sang périphérique pendant environ trois jours. C'est le contact avec l'antigène (Ag) dont il est spécifique qui va induire l'activation du lymphocyte B et son transfert dans un des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) où se produit, au sein des follicules lymphoïdes, la différenciation terminale en lymphocyte B « mémoire » ou en plasmocyte. Les plasmocytes générés par les lymphocytes B produisent des anticorps responsables de l'immunité humorale. Ils représentent 0,5% des cellules mononucléées de la moelle osseuse.

En ce qui concerne les lymphocytes B « mémoire », il existe une controverse au sujet du type de cellule responsable de la mémoire immune. En effet, deux hypothèses sont émises : la première suggère que les lymphocytes B « mémoires » sont capables de générer tout au long de la vie des plasmocytes à durée de vie courte, alors que la deuxième hypothèse garde la notion de cellules B « mémoires », mais aussi l'existence de plasmocytes, dit à longue durée de vie, capable de survivre tout au long de la vie de l'individu dans un microenvironnement capable de leur apporter les facteurs nécessaires pour leur survie (Manz et al., 2002) (Arpin et al., 1997).

Sur le plan morphologique (Figure 1), le plasmocyte normal représente la cellule effectrice de la réponse immunitaire humorale. Sa fonction principale est la production et la sécrétion d'une immunoglobuline qui représente un taux inférieur à 1 ng/cellule/jour. Ceci explique

l'abondance de son cytoplasme et l'important développement de son réticulum endoplasmique et de son appareil de golgi.

Le plasmocyte est une cellule complètement différenciée et par conséquent ne se divise plus. Ils ont une durée de vie de quelques semaines (Altmeyer et al., 1997) et meurent par apoptose. La différenciation des lymphocytes B vers le plasmocyte s'accompagne par l'acquisition ou la perte d'antigènes de surface. Les plasmocytes sont caractérisés par l'expression dans le cytoplasme d'une immunoglobuline (Ig), d'une forte expression membranaire de l'antigène CD38 (T10), molécule présente essentiellement dans les thymocytes mais aussi les plasmocytes, une forte expression du CD138 (Syndecan-1, *heparane sulfate protéoglycan*) et une expression positive du CD19 (j4.119), une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobuline qui joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B indépendante de l'antigène. Par opposition aux cellules myélomateuses, l'expression de l'antigène CD56 (Neural cell adhesion molecule : NCAM) est négative. La NCAM est une glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines présente, en dehors du tissu nerveux, sur les cellules NK (Natural Killer). Le CD56 interviendrait dans l'attachement des cellules tumorales aux cellules endothéliales.

Cependant, le phénotype des plasmocytes normaux est fonction de leur site d'origine: les plasmocytes de la moelle osseuse sont CD38 fort, CD138 (syndecan-1) fort, CD19 positive, CD56 (NCAM) négatif (Harada et al., 1993) et CD45 fortement positif. Les plasmocytes normaux des amygdales, du sang périphérique et ceux d'une plasmocytose réactionnelle ont quasiment le même phénotype que ceux de la moelle osseuse à l'exception du CD138 qui dans le dernier cas est faiblement positif voir négatif (Tableau II).

B) Biologie du plasmocyte myélomateux :

On ne connaît pas la nature exacte de la cellule souche myélomateuse capable d'auto-renouvellement, néanmoins elle semble provenir d'un compartiment lymphoïde B post-folliculaire ayant subi les processus d'hypermutation somatique, de sélection antigénique et de commutation isotypique après stimulation antigénique. Elle pourrait être un lymphocyte B « mémoire » ou plus sûrement un plasmablaste dont la prolifération est stimulée par l'IL-6 (Jego et al., 2001). Les cellules myélomateuses migrent ensuite dans la moelle osseuse et son microenvironnement favorable. Elles produisent quelques picogrammes d'immunoglobuline par jour.

Sur le plan morphologique (Figure 2), le plasmocyte malin a un aspect plus ou moins immature. Les MM sont aussi classés en fonction de leur morphologie : mature (28%), intermédiaire (38%), immature (19%), ou plasmablastique (15%). L'aspect morphologique est corrélé avec le pronostic de la maladie (Garand et al., 2003). En effet, les formes les plus immatures présentent une médiane de survie inférieure aux autres formes.

L'immunophénotypage des plasmocytes myélomateux est caractérisé par une forte expression du CD38 et du CD 138, le CD19 est, dans 97% des MM, négatif et enfin le CD 56 est positif dans la majorité des MM (Van Camp et al., 1990) (Tableau II).

C) Notion de compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux et de MM :

L'antigène CD45 est une protéine tyrosine phosphatase (Charbonneau et al., 1988). Le CD45 est décrit comme un antigène commun leucocytaire nécessaire pour l'activation et le développement des lymphocytes B ((Kawauchi et al., 1994); (Hermiston et al., 2003). L'expression de l'antigène CD45 a été évaluée dans des plasmocytes normaux de différentes origines : amygdale, sang périphérique et moelle osseuse (Medina et al., 2002).

Cette étude a montré que plus on se rapproche de la maturation plasmocytaire, de l'amygdale vers la moelle osseuse en passant par le sang périphérique, plus l'expression du CD45 diminue. Aussi, les plasmocytes de l'amygdale et du sang périphérique sont immatures et expriment fortement le CD45, alors que les plasmocytes de la moelle osseuse réduisent clairement cette expression tout en gardant une expression hétérogène de ce marqueur.

De plus, il a été décrit une association entre l'expression du CD45 et la prolifération (Jego et al., 1999). En effet la forte expression du CD45 est associée à la prolifération dans les plasmocytes immatures d'amygdales et de sang périphérique et une faible expression du CD45 est associée à l'arrêt de la prolifération observée dans les plasmocytes matures de la moelle osseuse.

Dans le MM, un modèle de deux compartiments plasmocytaires en fonction de l'expression du CD45 a été établi. En effet, on distingue deux sous-populations de plasmocytes : une sous-population à faible expression, voire négative, du CD45 majoritaire et une sous-population à forte expression du CD45 minoritaire (Bataille et al., 2003). En terme de prolifération, la forte expression du CD45 est associée à une forte prolifération (Joshua et al., 1996) et représente une sous-population immature comparée à la sous-population CD45 faible plus mature et moins proliférante.

La maturation des plasmocytes normaux est associée à la diminution de l'expression du CD45 sans que ça soit une perte totale. Cependant, dans le MM il a été observé que la maturation des plasmocytes malins est associée à la diminution de l'expression du CD45, comme pour les plasmocytes normaux, mais avec une possibilité de la perte totale de cette expression.

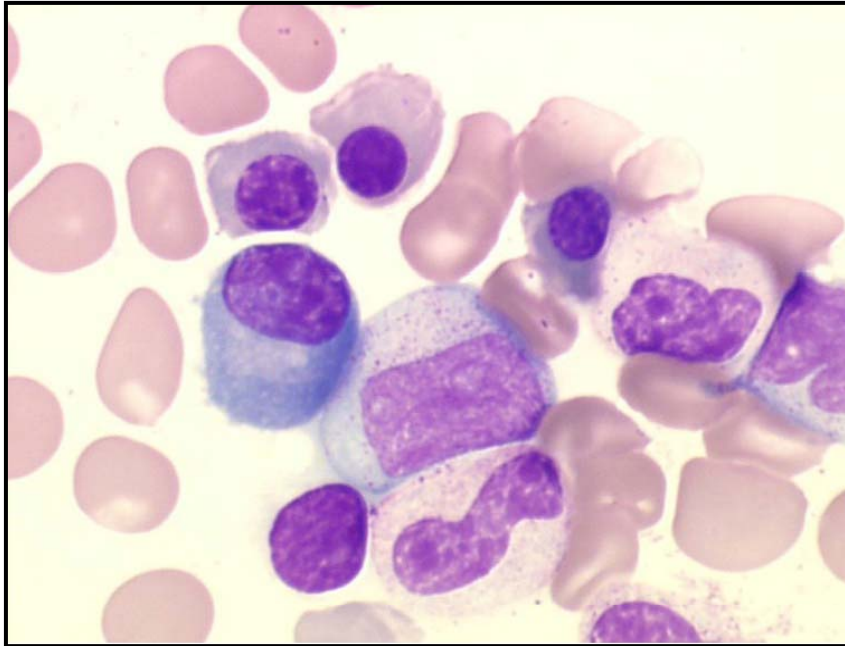


Figure 1 : Morphologie du plasmocyte normal

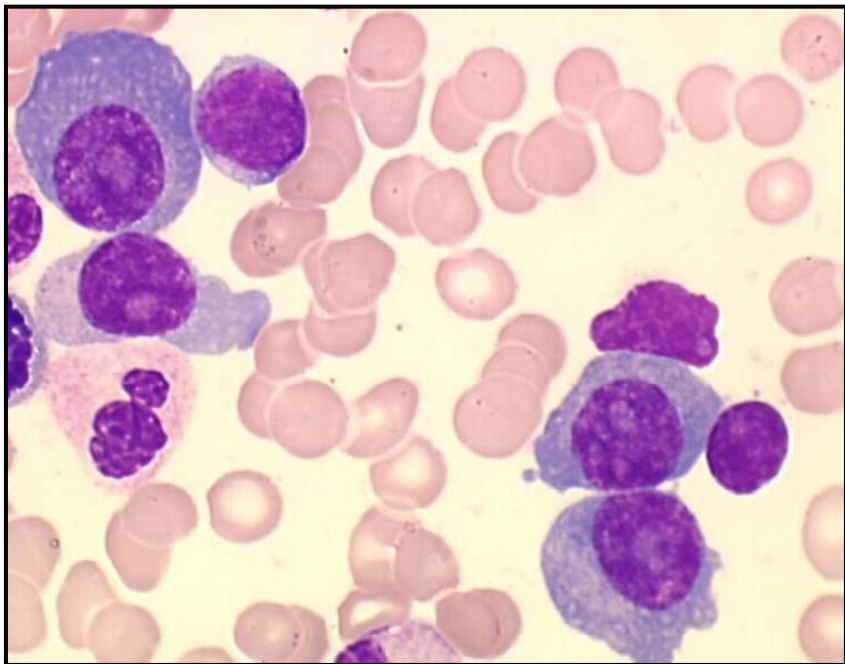


Figure 2 : Morphologie de plasmocytes de MM

F. Thérapeutique

Le traitement conventionnel du MM consiste en une chimiothérapie associant le melphalan à la prednisone. Ces traitements ont été mis en place dans les années 1970, ont permis d'améliorer l'espérance de vie des patients d'environ 1 an. Cette thérapeutique reste néanmoins décevante, la rémission complète est rare et l'issue de la maladie reste fatale. Cependant des progrès récents ont été accomplis dans le traitement de cette maladie avec l'utilisation de facteurs pronostique plus ciblés et une prise en charge des complications permet d'améliorer la qualité de vie.

Actuellement la greffe de cellules souches hématopoïétiques sanguines ou médullaires est réservée aux patients jeunes, elle permet d'avoir une médiane de survie à 5 ans (Attal et al., 1996). Seule l'allogreffe de moelle permet d'espérer une guérison mais elle ne s'adresse qu'à un groupe minoritaire de patients jeunes avec donneur HLA compatible, malheureusement la mortalité et la morbidité sont élevée (Gahrton et al., 1995).

D'autres thérapeutiques plus récentes semblent être encourageantes. La thalidomide qui semble être efficace, les inhibiteurs de farnésyl-transférase ou encore les inhibiteurs du protéasome (PS341).

	CD 38	CD 138	CD 45	CD 19	CD 56
AMYGDALE	++	+ à -	+++	+ (100%)	-
SANG	++	+ à -	+++	+ (100%)	-
PR SANG	+++	++ à -	+++	+	-
MO NORMALE	+++	++	+++ à +/-	+ (80%)	-
MM	+++	+++	- à +++	- (97%)	++

Tableau II: Phénotype des plasmocytes

Intensité de la fluorescence : -, négatif ; + faiblement positif ; ++ positif ; +++ fortement positif. Le pourcentage de la population positive est indiqué. MO : moelle osseuse ; PR : plasmocytose réactionnelle.

II. Mcl-1 et protéines de la famille Bcl-2

A. Les protéines de la famille Bcl-2

1. Description

La protéine Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) a été découverte en 1986 grâce au clonage du point de cassure de la translocation t (14 ;18)(q32 ;q21) des lymphomes B de type folliculaire (Tsujimoto and Croce, 1986).

La protéine Bcl-2 est le membre fondateur de la famille Bcl-2. La découverte de cette protéine a permis d'établir une nouvelle classe d'oncogènes ayant une même fonction anti-apoptotique et dont le mécanisme d'action consiste à prévenir la mort cellulaire programmée mais non à favoriser la prolifération cellulaire.

La protéine Bcl-2 est constituée de 239 acides aminés et de 4 domaines d'homologie, appelés BH (Bcl-2 homology) numérotés de 1 à 4 de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. Ces domaines d'homologie sont conservés entre les différents membres de la famille Bcl-2. La structure tridimensionnelle de la protéine Bcl-2 est formée de 7 hélices α (Figure 3A). Les domaines BH1 et BH2 forment une poche hydrophobe constituant un domaine récepteur. Le domaine BH3 intervient dans les interactions avec les autres protéines de la famille Bcl-2 pour former des dimères. Les dimérisations se font aussi bien avec des protéines pro-apoptotiques que des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ceci est fonction de la conformation de la protéine. Un quatrième domaine BH4 existe seulement dans les protéines anti-apoptotiques et est nécessaire à l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et de Bcl-x_L. Les deux premières hélices α hydrophobes forment un domaine de régulation et de phosphorylation de la protéine, et la cinquième et sixième hélice α participent à la formation de pore dans la membrane phospholipidique (Cory and Adams, 2002) (Reed, 1995)

2. Différents membres de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend plus de 15 membres chez les Mammifères. Cette famille est constituée aussi bien de protéines anti- que pro-apoptotiques. Ces différentes protéines possèdent au moins un domaine BH (Figure 3 B). Les protéines anti-apoptotiques possèdent au moins les domaines BH1 et BH2, les protéines les plus homologues de Bcl-2 possèdent les quatre domaines BH comme par exemple Bcl-x_L, Mcl-1.

Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous familles : Bax, Bak, Bcl-x_S, Bok/MTD qui présentent une forte homologie avec Bcl-2 et Bad, Bid, Bim/Bod qui n'ont en commun avec Bcl-2 que le domaine BH3 d'où leur nom de « BH3-only ».

Ces différentes protéines ont une localisation cellulaire différente selon leur rôle anti- ou pro-apoptotique. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 ont un domaine transmembranaire leur permettant de se localiser dans des membranes intracellulaires telles que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire. Seul Bak est constamment lié à la membrane mitochondriale.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont régulées par différents mécanismes :

i) Régulation de l'expression par des cytokines ou par d'autres signaux de survie ou d'apoptose. Ce type de régulation est important dans certains types cellulaires. En effet, l'exemple le plus parlant est la translocation (14; 18) (q32 ; q21) dans le lymphome B de type folliculaire. Une hyperexpression de la protéine Bcl-2 est observée dont la conséquence est l'inhibition de l'apoptose dans les lymphocytes malins.

ii) Régulation de l'activité par dimérisation, par phosphorylation ou par clivage.

La dimérisation entre les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. En effet, la protéine Bcl-2 est capable de s'homodimériser et de s'hétérodimériser plus particulièrement avec la protéine Bax. L'hyperexpression de Bcl-2 dans la cellule déclenche son hétérodimérisation avec Bax ce qui

provoque un effet antiapoptotique. A l'inverse, l'hyperexpression de la protéine Bax déclenche un effet apoptotique. Ainsi, il existe un équilibre entre l'expression des deux protéines Bcl-2 et Bax et le ratio entre ces deux molécules conditionne l'effet pro ou anti-apoptotique.

D'autres protéines de la famille Bcl-2 ont été décrites comme formant des homo- ou hétérodimères (Chao and Korsmeyer, 1998). Comme exemple, on retrouve les couples Bcl-x_L et Bak ou Bad, Bim et Bcl-2 ou Bcl-x_L. L'interaction de Bcl-2 /Bax et Bcl-x_L/Bak provoquent une neutralisation de l'activité pro-apoptotique de ces protéines.

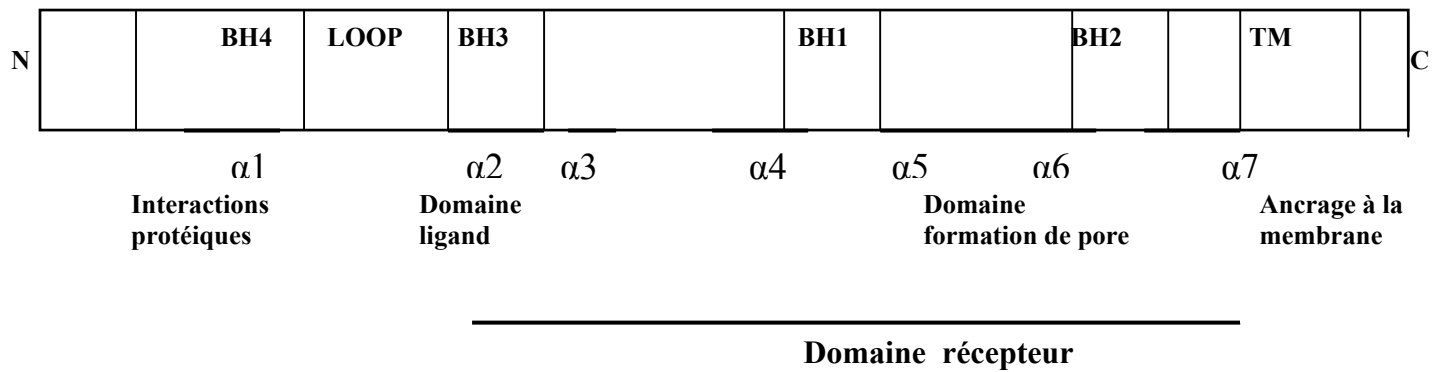
Plus généralement, il a été suggéré que le ratio entre les protéines pro-apoptotiques et protéines anti-apoptotiques détermine la susceptibilité à l'apoptose.

iii) La régulation peut aussi se faire par phosphorylation. C'est le cas de la protéine Bad qui est phosphorylée et semble inactive sous cette forme. La phosphorylation de la protéine Bid la rend résistante au clivage par la caspase 8.

iv) La régulation par clivage de la protéine est aussi décrite.

Elle concerne essentiellement la protéine Bid (Li et al., 1998) et la protéine Bcl-2 (Cheng et al., 1997). Les protéines de la famille Bcl-2 ont un rôle dans l'apoptose qui est bien documenté. Néanmoins, l'apoptose ne semble pas être la seule fonction de ces protéines. En effet, elles semblent intervenir dans la régulation du cycle cellulaire et dans la maturation des lymphocytes (Figure 4).

A/ Structure de la protéine Bcl-2



B/ Les différents membres de la famille Bcl-2

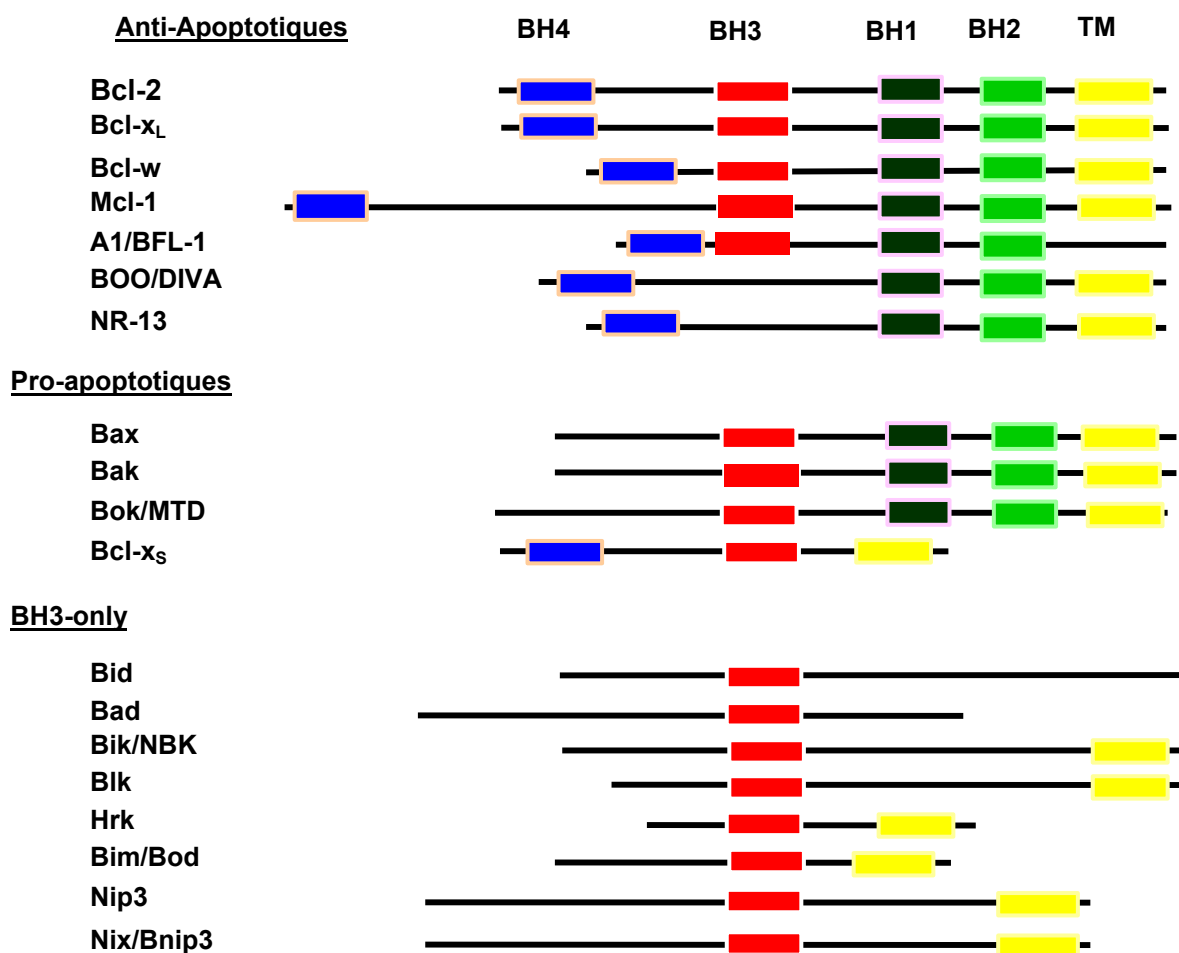
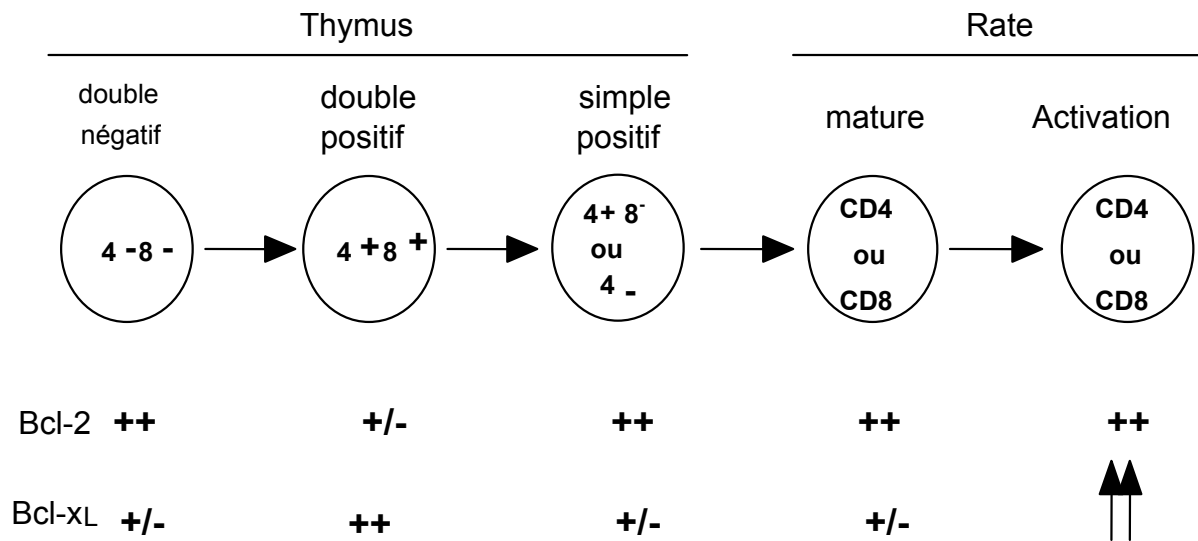


Figure 3 : La famille Bcl-2

A/ Lignage T



B/ Lignage B

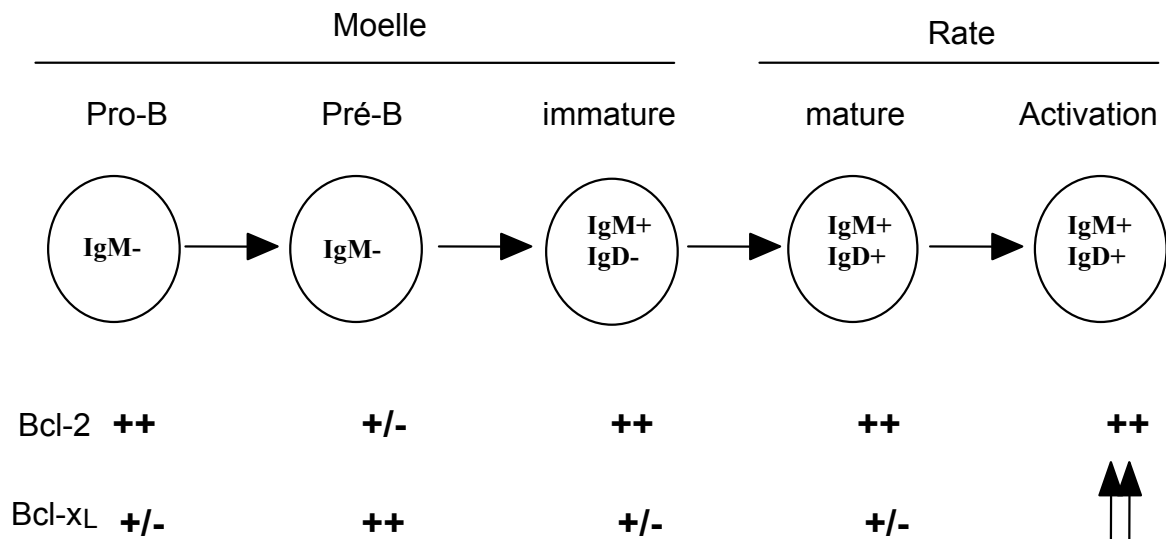


Figure 4 : Expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL dans le lignage B et T

3. Protéine de la famille Bcl-2 et myélome multiple

a. Expression dans le MM

La protéine Bcl-2 est exprimée aussi bien dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse que dans les plasmocytes myélomateux (Hamilton et al., 1991); (Pettersson et al., 1992). La quantification de l'expression de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux et malins a montré une corrélation inverse entre l'expression de Bcl-2 et la prolifération des plasmocytes malins. Bcl-2 a donc deux fonctions : anti-apoptotique et inhibitrice de la prolifération (Puthier et al., 1999b) ; (Miguel-Garcia et al., 1998). Quant à la protéine Bcl-x_L, elle est exprimée aussi bien chez les patients que dans les lignées (Krajewski et al., 1995); (Tu et al., 1998). L'expertise de la protéine Bax a montré une variabilité d'expression de cette protéine entre les patients. La présence d'IL-6 n'interfère pas sur son niveau d'expression. Par contre, l'étude parallèle de l'expression de Bcl-2 et de Bax montre que les patients atteints de MM expriment fortement ces deux molécules par rapport aux patients atteints de plasmocytome, d'une MGUS ou de myélomes indolents (Renner et al., 2000).

b. Régulation par des cytokines

Comme cité précédemment, certaines cytokines telle que l'IL-6 joue un rôle important dans la physiopathologie du MM. L'absence d'IL-6 dans un milieu de culture de plasmocytes malins provoquent l'entrée en apoptose. La surexpression de la protéine Bcl-2 protège ces cellules de l'apoptose, néanmoins aucune augmentation de Bcl-2 en présence d'IL-6 n'a été décrite. Cependant l'expression de la protéine Bcl-x_L est augmentée en présence d'IL-6,

suggérant que cette protéine pourrait être la protéine clé de l'apoptose dans le MM et que le signal IL-6, transduit par la voie JAK/STAT, est un signal de survie de

cellules tumorales ((Schwarze and Hawley, 1995) (Lotem and Sachs, 1995) (Catlett-Falcone et al., 1999).

Une augmentation de Bcl-x_L a aussi été décrite en présence de IGF-1 et la protection des cellules vis-à-vis de l'apoptose ferait intervenir, dans ce cas, les voies des MAP-Kinases ou des PI3-Kinases (Ogawa et al., 2000).

Dans la littérature, l'ensemble des travaux ont suggéré jusqu'à récemment que Bcl-x_L étant la protéine la plus importante dans le MM. Cependant la protéine Mcl-1 a ensuite été étudiée en parallèle à Bcl-x_L et s'est avérée importante dans le MM.

c. Rôle dans la chimiorésistance

L'implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la chimiorésistance dans le MM s'appuie sur plusieurs observations. Tout d'abord, le haut niveau d'expression de Bcl-2 semble contribuer à la résistance des plasmocytes à différentes drogues telles que la dexaméthasone en agissant sur la protéine NF-κB. En effet, Bcl-2 prévient la répression de cette protéine par la dexaméthasone et donc l'apoptose.

La chimiorésistance interviendrait en partie par la stimulation de Bcl-2 et non pas par la sélection de cellules résistantes (Tu et al., 1996). Elle peut aussi être expliquée par l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L en présence d'IL-6 (Tu et al., 1998).

d. Rôle dans le pronostic du MM

L'expression de Bcl-x_L semble être corrélée à la réponse au traitement par le melphalan, la prednisone ou l'association VAD. En effet, les patients qui hyperexpriment Bcl-x_L ne répondent que dans 20 à 30 % des cas au traitement contrairement à ceux qui expriment

Bcl-x_L à un niveau plus faible. Ces patients répondent dans 80% des cas au traitement (Dalton and Jove, 1999).

Actuellement aucune étude n'a pu montrer une corrélation entre l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et la survie des patients ou la réponse au traitement.

B. Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)

1. Description

La protéine Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Elle a été décrite pour la première fois en 1993 dans une lignée cellulaire myéloïde ML-1 (Kozopas et al., 1993). C'est une protéine de 37 kDa, qui possède les quatre domaines BH1, 2, 3, 4 et le domaine transmembranaire comparable à la protéine Bcl-2. La protéine Mcl-1 a une demi vie courte d'environ 3 heures qui peut être imputée à la présence de séquences PEST, site de dégradation rapide de la protéine par la voie du protéasome.

Il a été décrit une forme courte de Mcl-1 dite Mcl-1_s. Cette forme est le résultat d'un épissage alternatif du gène de Mcl-1. Mcl-1_s conserve uniquement le domaine BH3 et par conséquent appartiendrait au groupe des « BH3-only ». Elle semble se comporter comme une protéine pro-apoptotique (Bae et al., 2000; Bingle et al., 2000).

2. Distribution et localisation

Comme la protéine Bcl-2, la protéine Mcl-1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires. En effet, elle est présente dans les cellules épithéliales, les follicules des ganglions lymphatiques, les amygdales, et dans le muscle cardiaque et squelettique (Krajewski et al., 1995).

La protéine Mcl-1 est localisée essentiellement au niveau de la membrane mitochondriale. Elle se lie à cette membrane grâce à son domaine carboxy-terminal hydrophobe. Elle est aussi associée à d'autres membranes non mitochondriales.

3. Rôle

La protéine Mcl-1 a été largement décrite comme impliquée dans l'induction de la différenciation cellulaire de la lignée myéloïde. Son expression semble être augmentée en présence d'un stimulus de différenciation, dans le but de protéger les cellules de l'apoptose (Fukuchi et al., 2001; Kozopas et al., 1993; Moulding et al., 2000; Yang et al., 1996). En effet, dans les lignées U937, la diminution de Mcl-1, en présence d'oligonucléotides antisens, provoque une apoptose rapide des cellules lors de la différenciation induite par le PMA. Dans les mêmes conditions, l'expression de Bcl-2 n'est pas modifiée ce qui suggère que dans le modèle cellulaire U937, Bcl-2 ne compense pas la perte de Mcl-1 et que ces deux protéines ont des fonctions distinctes.

Le rôle anti-apoptotique de Mcl-1 a été confirmé sur un modèle de souris transgéniques (Zhou et al., 1998) et dans différents types cellulaires : les lymphocytes B (Lomo et al., 1997; Lomo et al., 1996), lymphocytes B immatures (Myklebust et al., 1999) ou encore dans la lignée granuleuse (Leuenroth et al., 2000) (Moulding et al., 2001).

Récemment, l'équipe de Nijhawan a montré que l'élimination de la protéine Mcl-1 est nécessaire à l'initiation de l'apoptose induite par des irradiations UV (Nijhawan et al., 2003). Cette élimination est aussi nécessaire pour la translocation de Bcl-x_L à la membrane mitochondriale ainsi qu'à d'autres événements de l'apoptose tels que la translocation de la protéine Bax, le relargage du cytochrome c et à l'activation des caspases.

4. Régulation

Différents facteurs de survie sont impliqués dans la régulation de la protéine Mcl-1 : Le GM-CSF dans les cellules myéloïdes (Klampfer et al., 1999), l'EGF dans les cellules du carcinome de l'œsophage (Leu et al., 2000) et l'IL-6 dans les hépatocytes (Kuo et al., 2001). Cependant, plusieurs voies de transduction du signal semblent impliquées dans cette régulation (Figures 5).

5. Interactions avec d'autres protéines

Mcl-1 interagit avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme par exemple Bad, Bax, Bok, Bik, et Bim (Leo et al., 1999). Mcl-1 se lie aussi à DAD-1 (defender of apoptotic cell death-1), sous-unité du complexe oligosaccaryl-transférase et dont la perte des fonctions induirait l'apoptose. Le complexe Mcl-1/DAD-1 pourrait jouer un rôle dans la N-Glycosylation (Makishima et al., 2000). Mcl-1 semble aussi interagir avec PCNA (proliferation cell nuclear antigen), protéine régulatrice de la phase S du cycle cellulaire. Ainsi, la surexpression de Mcl-1 inhiberait la progression en phase S du cycle cellulaire (Fujise et al., 2000).

6. Mcl-1 et MM

Dans la littérature, peu d'études ont été consacrées à la protéine Mcl-1 dans le MM. Cette protéine est décrite comme impliquée dans la survie des lymphocytes B et plus particulièrement dans les stades tardifs de la différenciation B (Lomo et al., 1996) (Altmeyer et al., 1997). Elle est, en effet, davantage exprimée dans les lymphocytes B du centre germinatif que dans les lymphocytes B naïfs ou « mémoires ».

Dans le MM, de plus en plus de données suggèrent l'importance de Mcl-1 dans la survie des cellules myélomateuses. Puthier et coll. ont comparé l'expression de la protéine Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 dans 13 lignées de MM. Une expression assez variable des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 a été observée alors que l'expression de la protéine Bcl-2 est forte et homogène dans les 13 lignées étudiées. Il a aussi été observé une forte corrélation entre l'expression des molécules Bcl-x_L et Mcl-1. En effet une forte expression de la protéine Mcl-1 est associée à une forte expression de Bcl-x_L tandis qu'une faible expression de Mcl-1 est associée à une faible expression de Bcl-x_L. Ceci a été confirmé sur des plasmocytes purifiés provenant de prélèvements de patients (6 échantillons de moelle osseuse et 3 leucémies à plasmocytes) (Puthier et al., 1999b). Parallèlement à la corrélation étroite entre les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, une étude de l'effet de l'IL-6, cytokine majeure dans la croissance et la survie du MM, sur ces protéines a été réalisée. Il a été observé, qu'en présence d'IL-6, l'expression de Bcl-x_L et de Mcl-1 augmente alors que l'expression de la protéine Bcl-2 reste stable. Ces résultats suggèrent que la régulation des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L d'une part et de Bcl-2 d'autre part est indépendante et que l'effet anti-apoptotique observé en présence d'IL-6 passe probablement par la régulation positive de Mcl-1 et de Bcl-x_L. Cette étude a donc montré que l'IL-6 est un puissant inducteur de la protéine Mcl-1 mais aussi de Bcl-x_L. Pour Mcl-1, ces résultats ont été confirmés par Jourdan et coll. (Jourdan et al., 2003). La co-régulation des

protéines Bcl-x_L et de Mcl-1 est déjà décrite dans les lymphocytes B (Lomo et al., 1997). Jourdan et coll. a confirmé, par la suite, la régulation de Mcl-1 par l'IL-6 et par IFN- α , autre facteur de croissance des cellules myélomateuses ((Jourdan et al., 2000); (Puthier et al., 2001). La régulation positive de Mcl-1 par l'IL-6 ou l'IFN- α fait intervenir de préférence la voie de transduction du signal JAK/STAT3 plutôt que la voie ERK/MAP Kinase (Puthier et al., 1999a) ; (Puthier et al., 2001). Toutes ces données montrent que l'expression de Bcl-2 d'une part et de Mcl-1 et Bcl-x_L d'autre part est antinomique. En ce qui concerne Bcl-2 et Bcl-x_L, ces résultats sont aussi retrouvés dans la lignée lymphocytaire. En effet, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 ont probablement des rôles différents dans les cellules de MM : la protéine Bcl-2 joue un rôle anti-apoptotique et anti-prolifératif , les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 assureraient la survie des cellules en réponse à des facteurs de croissance.

D'autres travaux ont confirmé par la suite le rôle essentiel et critique de la protéine Mcl-1 dans la survie des cellules de MM (Zhang et al., 2002); (Derenne et al., 2002). En effet, en présence d'oligonucléotides antisens (ASOs) dirigés spécifiquement contre Mcl-1, il a été observé que la diminution rapide de Mcl-1 s'accompagne d'une diminution de la viabilité des cellules de MM associée à une apoptose massive de ces cellules. L'association des ASOs Mcl-1 aux ASOs Bcl-x_L ou Bcl-2 n'apporte pas une plus grande efficacité (Derenne et al., 2002).

Mcl-1 est une protéine de survie dans le MM. Elle peut donc être proposée comme cible thérapeutique. Récemment, Gojo et coll. ont observé en présence de flavopiridol, inhibiteur de kinase cycline dépendante, une induction d'apoptose des cellules de MM et ceci par la répression transcriptionnelle et la régulation négative de Mcl-1 (Gojo et al., 2002).

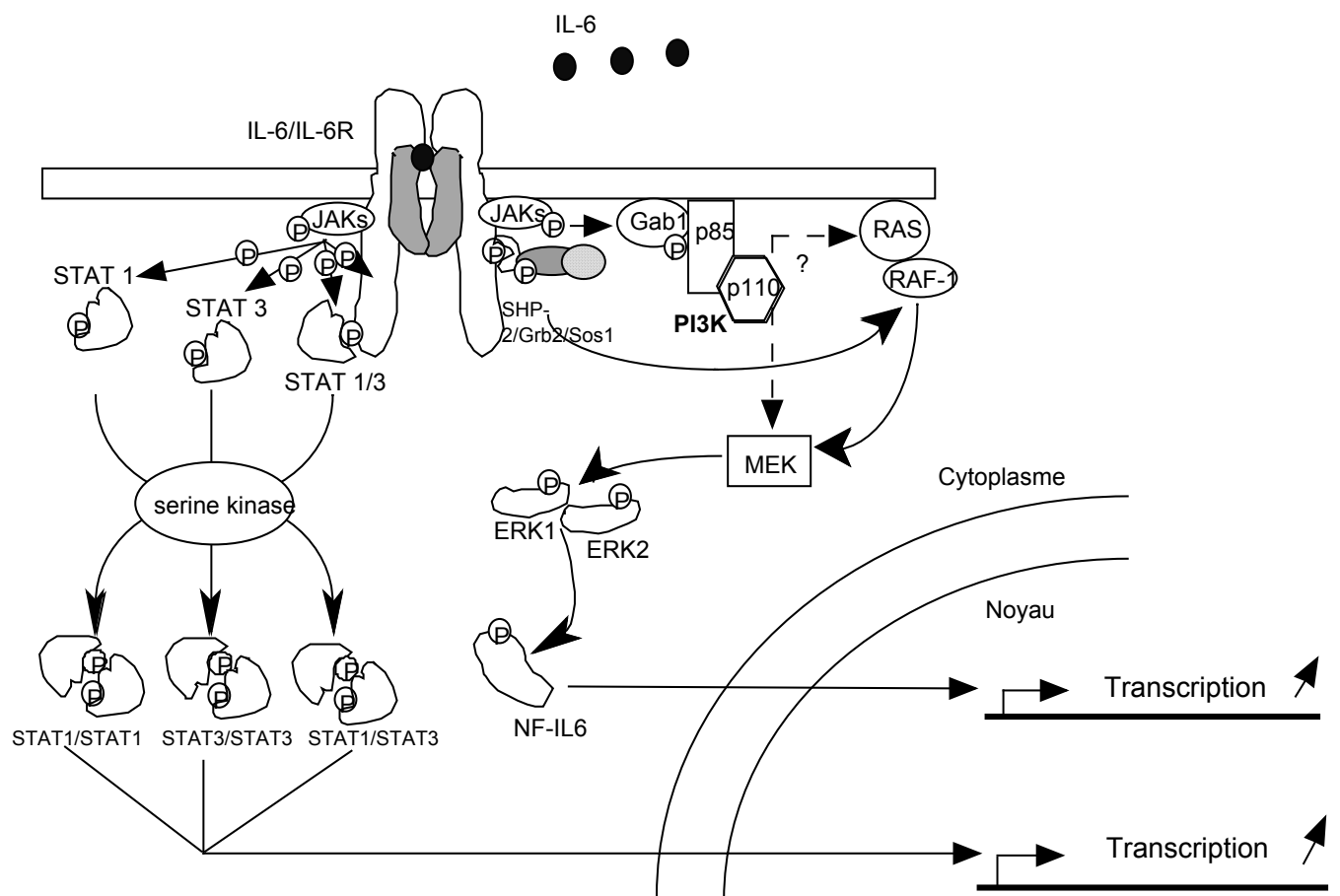


Figure 5 : Les voies de signalisation possibles pour induire l'expression de la protéine Mcl-1

OBJECTIFS

Dans cette étude nous avons tout d'abord réalisé l'immunophénotypage de plasmocytes normaux et tumoraux. Cet immunophénotypage est important dans la mesure où il nous permet de s'assurer de la malignité des plasmocytes présents dans nos prélèvements de MM. Nous avons aussi étudié la prolifération (index de phase S) dans les plasmocytes normaux et tumoraux. Cette étude a été réalisée en fonction des sous-populations CD45.

Les objectifs de ce travail sont essentiellement d'étudier en parallèle l'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2, d'une part dans les plasmocytes normaux de moelles osseuses normales et d'amygdales et d'autre part dans les plasmocytes de MM.

Dans les plasmocytes normaux nous avons : i) étudié et comparé l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes d'amygdales et de la moelle osseuse normales. ii) étudié l'expression de ces protéines dans les sous-populations CD45. iii) étudier les corrélations de l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 et la prolifération plasmocytaire.

Dans les plasmocytes tumoraux de MM, toutes les études ont été réalisées en comparaison avec les résultats obtenus dans les plasmocytes de la moelle osseuse normale. Nous avons : i) étudié l'expression des deux protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les prélèvements de moelle osseuse de MM. ii) défini une valeur limite au-delà de laquelle des valeurs de Mcl-1 et de Bcl-2 sont considérées comme anormalement élevées. iii) comparé l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans 25 prélèvements de MM au diagnostic et 20 prélèvements de MM en rechute. iiiii) étudié l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les sous populations CD45. iiiiii) étudié les corrélations entre l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 et la prolifération plasmocytaire.

MATERIEL et METHODES

I. Prélèvements de moelles normales

Un phénotypage des plasmocytes normaux a été réalisé sur des prélèvements de 8 moelles osseuses normales. Ces moelles osseuses proviennent de donneurs sains en vue d'allogreffe.

II. Prélèvements d'amygdales

Un phénotypage de plasmocytes amygdaliens a aussi été réalisé sur des prélèvements de 8 amygdales. Sept de ces amygdales proviennent d'amygdalectomie d'enfant et une d'amygdalectomie d'adulte.

Un petit morceau d'amygdale est sectionné à plusieurs reprises afin de libérer les cellules. Après une filtration puis un lavage en tampon PBS, la séparation des cellules mononucléées est réalisée sur un gradient de densité (ficoll).

III. Prélèvements de patients atteints de MM

Dans cette étude, 45 patients atteints de MM ont été inclus : 25 patients au diagnostic et 20 patients en rechute. Les prélèvements de ces patients sont dans la majorité des cas des prélèvements de moelle osseuse. Ces moelles osseuses sont prélevées sur un anticoagulant (EDTA). Un minimum de cinq millions de cellules est nécessaire pour réaliser le marquage immunophénotypique.

Le pourcentage des plasmocytes dans les différents prélèvements a été d'une part déterminé lors de l'étude de la morphologie grâce à la coloration de May-Grunwald-Giemsa (MGG) et d'autre part lors de l'analyse en cytométrie en flux.

IV. Préparation des échantillons

Les prélèvements de moelle osseuse, de moelles normales ou de patients (complétés à 6 ml avec du tampon PBS) sont déposés soigneusement sur 3 ml de milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll). Le tout est centrifugé à 1800 tours/minutes pendant 20 minutes. Les cellules mononucléées forment un anneau dans le gradient de densité.

Après avoir récupéré les cellules mononucléées, deux lavages en tampon PBS sont réalisés. Une numération des cellules est effectuée afin de définir le nombre exact de cellules par tube lors du marquage immunophénotypique.

V. Cytométrie en flux

A. Réactifs

Différents anticorps monoclonaux ont été utilisés pour marquer les plasmocytes. Pour le marquage de surface l'anticorps anti-CD38 (HB7), anti-CD28 (L293), anti-CD56 (NCAM16.2) et les isotypes contrôle proviennent de chez BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Les anticorps anti-CD138 (B-B4), anti-CD45 (J33) et l'anti-CD19 (J4.119) proviennent de chez Beckman Coulter (Miami, F, USA).

Pour le marquage intra-cellulaire, l'anticorps anti-Bcl2-FITC provient de chez DAKO (Glostrup, Denmark), l'anticorps anti-Mcl-1-PE et anti-BrdU-FITC (3D4) proviennent de chez BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

Le kit de perméabilisation (Intraprep : réactif 1 et réactif 2) provient de chez Beckman Coulter (Miami, F, USA).

B. Marquage de surface

Pour le quadruple marquage, 0,5 à 1 million de cellules mononucléées sont marquées avec une concentration optimale de quatre anticorps par test. Les cellules sont incubées en présence des anticorps pendant 20 minutes à température ambiante en présence de sérum AB 10%, qui permet de réduire le marquage non spécifique. Les cellules sont ensuite lavées deux fois en PBS et fixées en formaldéhyde 1%.

Le marquage de surface consiste en une incubation avec l'anti-CD45-FITC, l'anti-CD138-PECy5, l'anti-CD38-APC. A ces 3 anticorps présents dans tous les tubes, un de ces anticorps suivants est rajouté : contrôle PE, l'anti-CD19-PE, l'anti-CD28-PE ou l'anti-CD56-PE (Tableau III).

Afin de déterminer le niveau de fluorescence du CD45-FITC des plasmocytes et de distinguer les sous-populations plasmocytaires en fonction de l'expression du CD45, les cellules mononucléées sont incubées en présence du contrôle-FITC, l'anti-CD38-APC, l'anti-CD45-PECy5 et l'anti-CD138-PE (Tableau III).

C. Marquage intracellulaire

Dans un premier temps, 0,5 à 1 million de cellules mononucléées sont marquées en surface pendant 20 minutes en présence d'anti-CD38-APC, anti-CD138-PE, anti-CD45-PC5 pour Bcl-2 et anti-CD38-APC, anti-CD138-PC5, anti-CD45-FITC pour Mcl-1 (Tableau IV).

Dans un deuxième temps, après un lavage en tampon PBS, les cellules sont fixées en présence de 100 µl de réactif 1 pendant 15 minutes puis perméabilisées en présence de 100 µl de réactif 2. Enfin, un marquage par l'anticorps anti-Bcl-2 et anti-Mcl-1 est réalisé (20 minutes à température ambiante).

D. Marquage de la phase S du cycle cellulaire

Un million de cellules mononucléées sont incubées pendant une nuit, à 37°C dans du milieu de culture RPMI, avec ou sans (pour le contrôle) 50 µmole/litre de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine, Sigma). Les cellules sont ensuite lavées en PBS et un marquage membranaire, avec de l'anti-CD45-APC, anti-CD138-PECy5 et CD38-PE, est réalisé dans les conditions décrites précédemment (Tableau IV). Après deux lavages en PBS, les cellules sont perméabilisées pendant au moins une nuit dans du PBS contenant 0,01 % de Tween et 1% de paraformaldéhyde à raison de 500 µl par million de cellules. Les cellules sont ensuite incubées, après deux lavages, pendant 30 minutes à 37°C en présence de 50 Kunitz de Dnase (Sigma). Après digestion par la DNase, les cellules sont lavées dans 0,5 % de PBS Tween 20 et marquées par l'anticorps anti-BrdU-FITC pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, après un lavage en PBS 0,5 % tween 20, l'analyse est réalisée.

<i>PE</i>	<i>APC</i>	<i>PC5</i>	<i>FITC</i>
contrôle	CD 38	CD 138	CD 45
CD 19	"	"	"
CD 56	"	"	"
CD 28	"	"	"
APO2.7	"	"	"
CD 138	CD 38	CD 45	contrôle

Tableau III : Combinaison d'anticorps monoclonaux pour un phénotypage membranaire des plasmocytes normaux (moelles osseuses normales et amygdales) et de MM.

Le marquage se fait en quatre couleurs : FITC (FL1), PE (FL2), PC5 (FL3), APC (FL4). L'anti-CD38, anti-CD138 et anti-CD45 sont présents dans chaque tube.

	<i>APC</i>	<i>PC5</i>	<i>PE</i>	<i>FITC</i>
intracellulaire Bcl-2	CD 38	CD 45	CD 138	Bcl-2
intracellulaire Bcl-2	"	"	"	contrôle
intracellulaire Mcl-1	CD 38	CD 138	Mcl-1	CD 45
intracellulaire Mcl-1	"	"	contrôle	"
BrdU	CD45	CD138	CD38	BrdU

Tableau IV: Combinaison d'anticorps monoclonaux pour un phénotypage intracellulaire des plasmocytes normaux (moelle osseuse et d'amygdales) et de MM.

Le marquage membranaire est réalisé avant le marquage intra-cellulaire. Pour chaque marquage, un contrôle isotypique marqué à la PE ou à la FITC est réalisé afin de pouvoir calculer le ratio de moyenne d'intensité de fluorescence.

E. Analyse en cytométrie en flux

1. Principe de la cytométrie en flux (CMF) :

La cytométrie en flux est une technique d'analyse et/ou de tri basée sur la mesure de signaux lumineux émis par des cellules ou des organites isolés en solution aqueuse.

2. L'appareillage :

Le système analytique comporte le système fluidique et le système optique (Figure 6). Les cellules en suspension dans une gaine liquide, arrivent dans une chambre d'analyse où elles sont interceptées par deux lasers (diode laser 635 nm, puis laser 488 nm), choisis en fonction de la longueur d'onde d'excitation du ou des fluorochromes utilisés. La lumière, diffusée aux grands angles (Side Scatter, SSC), est fonction de la structure interne des cellules tel que la granulosité, ou aux petits angles (Forward Scatter, FSC), est fonction de la taille

des cellules. Cette lumière est récupérée soit sur une photodiode (FSC) soit par un photomultiplicateur (SSC).

Pour les lumières de fluorescence émises, un jeu de miroirs dichroïques (DM) permet de réfléchir et/ou de transmettre jusqu'à quatre fluorescences de longueurs d'onde différentes sur quatre photomultiplicateurs différents : FL1 : isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; FL2 : phycoérythrine (PE) ; FL3 : PE-Cy5 (PC5) ; FL4 : allophycocyanine (APC). Enfin, le signal électrique est amplifié, converti en signal numérique et traité par le système informatique.

3. Analyse des résultats :

Dans ce travail, l'acquisition des résultats se fait sur le FACS-Calibur (Becton Dickinson) équipé du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences ; San Jose, CA, USA). Afin d'augmenter la sensibilité et la précision de l'analyse, l'acquisition des résultats se fait en deux étapes : dans la première étape, une acquisition sur un total de 7000 événements/tube est réalisée. Dans la deuxième étape, l'acquisition se fait uniquement sur les plasmocytes sélectionnés en fonction de leur SSC et de la positivité de l'antigène CD38. Un minimum de 1000 plasmocytes est nécessaire pour l'analyse.

Les plasmocytes sont identifiés grâce à une stratégie de sélection par différentes régions (Figure 7). La région R1 est définie selon l'expression positive de l'antigène CD38 associé à un SSC typique des plasmocytes. La région R2 cible les cellules exprimant fortement l'antigène CD38 contre l'antigène CD138 en excluant les événements contaminants. Etant donnée la faible expression de l'antigène CD138 dans les plasmocytes amygdaliens, l'identification des plasmocytes ne s'est pas toujours faite sur cet antigène. La troisième région R3 est définie sur le cytogramme FSC/SSC afin d'éliminer les débris cellulaires ainsi que les plasmocytes en apoptose dont l'expression de l'antigène CD138 est moindre.

Nous avons aussi sélectionné deux sous-populations de plasmocytes en fonction du CD45. En effet, la région R4 permet de définir une population de plasmocytes à faible SSC et un faible ou une perte d'expression du CD45 alors que la région R5 permet de définir une population de plasmocytes à fort SSC et une forte expression du CD45.

L'analyse du phénotype et de l'index de phase S est réalisée sur les deux sous-populations CD45. On définit le niveau de positivité de chaque marqueur en calculant le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence (RMIF). Ce ratio est obtenu en divisant la moyenne d'intensité de fluorescence des différents antigènes étudiés avec la moyenne d'intensité de fluorescence du contrôle approprié. Nous avons distingué trois niveaux de positivité : (+/-) : $\text{ratio de fluorescence} < 1.4$, positif faible (+) : $1.4 < \text{ratio de fluorescence} \leq 10$; positif (++) : $10 < \text{ratio de fluorescence} \leq 50$; positif fort (+++) : $\text{ratio de fluorescence} > 50$.

F. Difficultés techniques du phénotypage des plasmocytes

L'immunophénotypage des plasmocytes a un intérêt majeur pour distinguer les plasmocytes normaux des plasmocytes myélomateux. Ceci nous permet de confirmer le diagnostic des MGUS, faire le diagnostic différentiel entre leucémie à plasmocytes et plasmocytose réactionnelle et d'évaluer la maladie résiduelle après greffe.

Néanmoins, des difficultés techniques peuvent apparaître lors d'un phénotypage des plasmocytes. Ces difficultés sont en partie dues à l'impossibilité de congélation-décongélation des plasmocytes, vue leur sensibilité au froid, ce qui limite le nombre de test possible. La faible plasmocytose dans certains échantillons de moelle osseuse ou d'amygdale ou de sang peut rendre difficile le réglage des compensations en quadruple marquage.

Le Tableau V résume le nombre maximal de plasmocytes analysés en fonction du pourcentage des plasmocytes dans les cellules mononucléées, de la moelle osseuse de MM,

d'amygdale et de moelle osseuse normale, et le nombre de cellules mononucléées nécessaire par tube de marquage.

	% CP des CMN	Nombre CMN/tube	Nombre max CP / analyse
Amygdale	0,48%	500 000	2400
MO normale	0,25%	1 000 000	1500
Sang	0,05%	3 000 000	1500
MM	1 à 90 %	500 000	15 000

Tableau V : nombre de plasmocytes analysés en fonction du % de plasmocytes parmi les CMN.

CP : cellules plasmocytaires, CMN : cellules mononucléées, MO : moelle osseuse.

G. Etude statistique

Différents tests statistiques ont essentiellement été utilisés dans cette étude afin d'évaluer les résultats. Le test de Willcoxon est utilisé pour comparer les valeurs médianes. Le test de FISHER est utilisé pour comparer les pourcentages. Le test de Spearman pour étudier la corrélation entre différents paramètres d'une même population. Le seuil de signification a été fixé à $p < 0.05$. L'analyse des résultats statistiques a été effectuée grâce au logiciel STAT-VIEW.

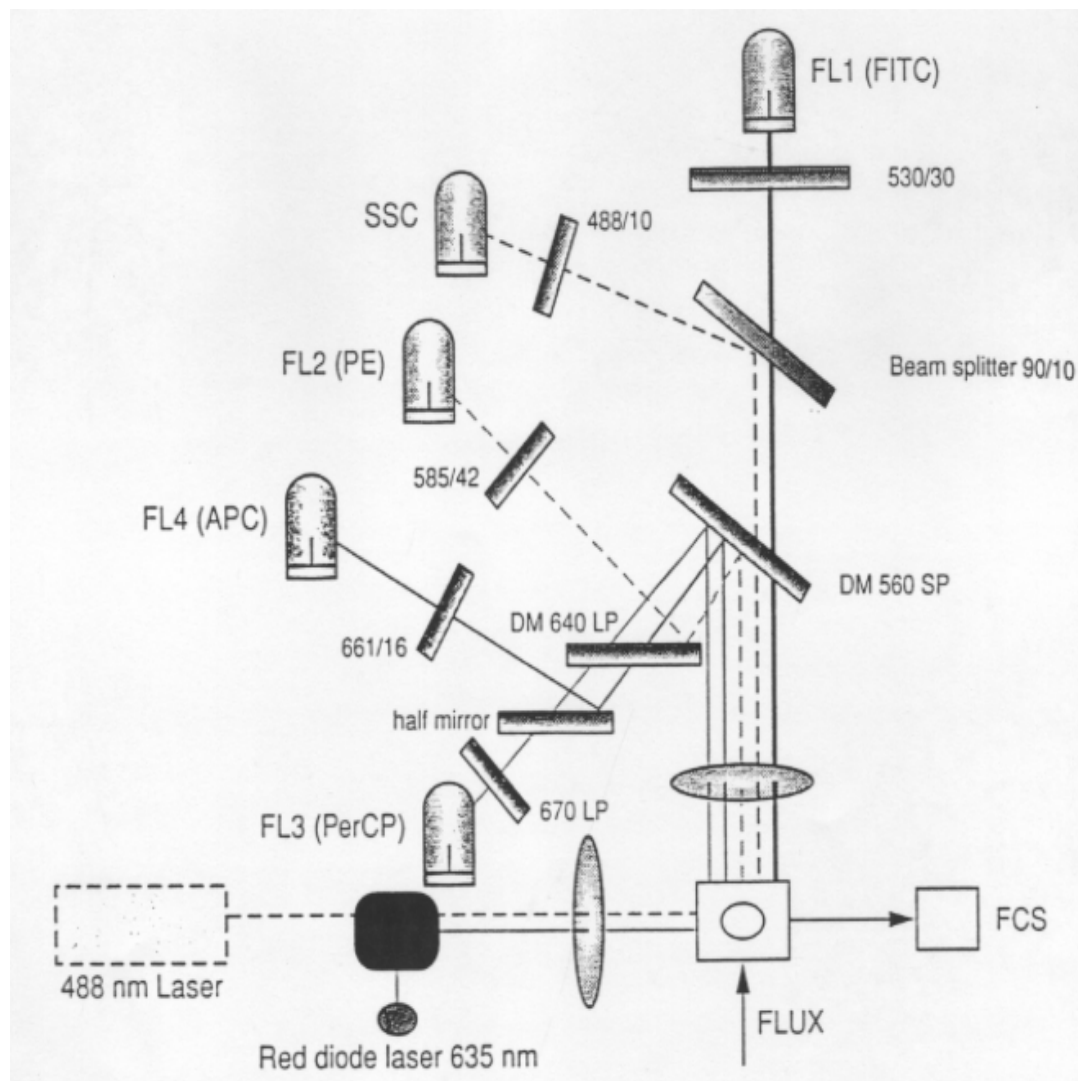


Figure 6 : Système optique d'un cytomètre analyseur (BECTON DICKINSON France)

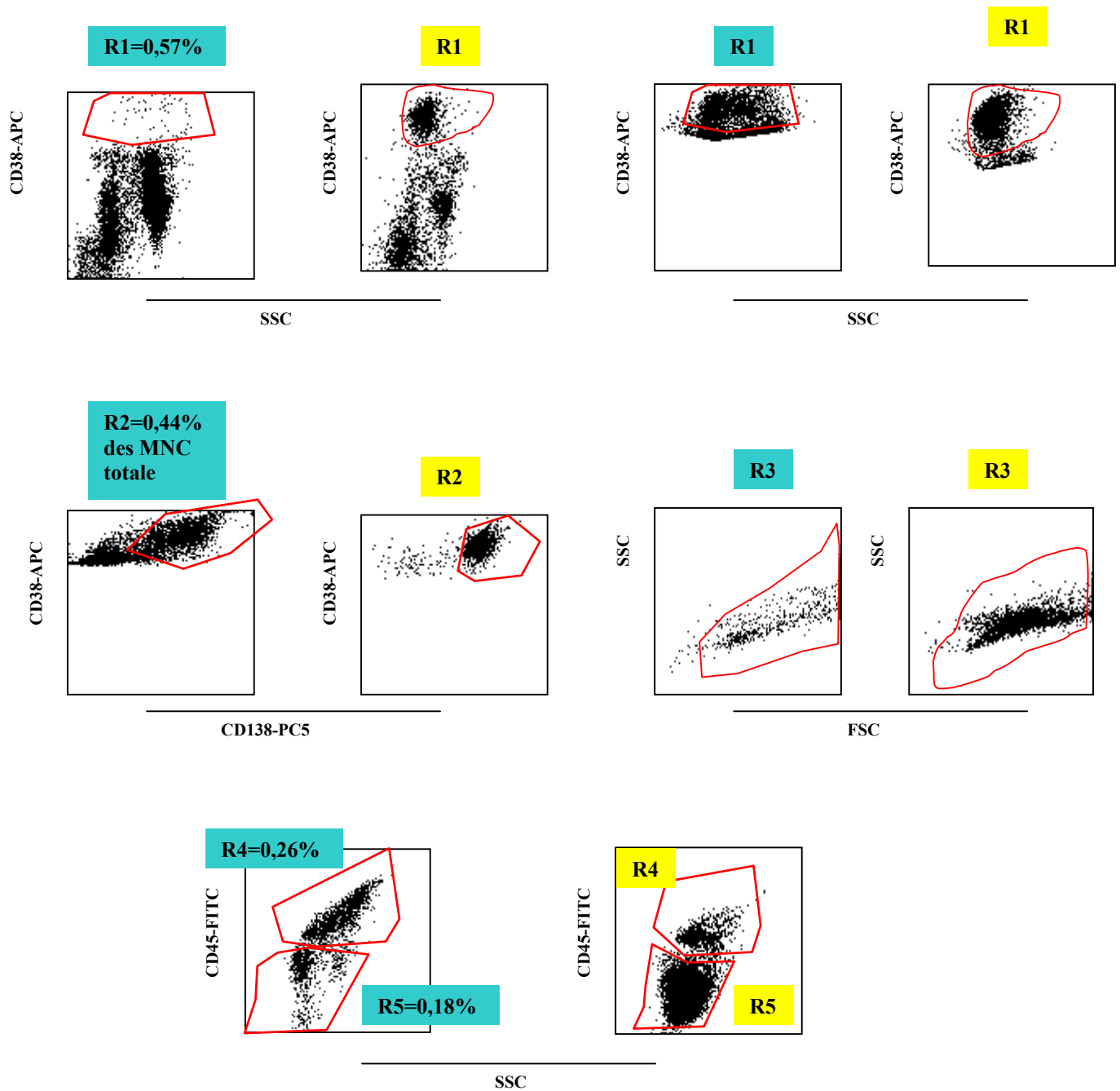


Figure 7 : Stratégie d'identification des plasmocytes : exemple de plasmocytes de la moelle normale (en bleu) et de plasmocytes de MM (en jaune).

Les plasmocytes sont identifiés grâce à une stratégie de sélection par différentes régions. R1 : CD38 +/SSC fort. R2 : CD38+/CD138+. R3 : FSC/SSC. R4 : CD45 Fort/ SSC Fort. R5 : CD45 faible/SSC faible.

RESULTATS

I. Phénotypage des plasmocytes d'amygdales, de moelles osseuses normales et de myélome multiple (MM)

Lors de cette étude, afin de bien distinguer et de différencier les plasmocytes normaux et malins, nous avons tout d'abord réalisé un phénotype des plasmocytes normaux (amygdales, moelles osseuses normales) et de myélome multiple (MM).

Différents antigènes membranaires d'intérêt nous ont permis de cibler d'une manière spécifique les plasmocytes de la moelle normale, les plasmocytes amygdaliens ou de MM. Parmi ces antigènes d'intérêt, nous avons retenu le CD38, le CD138, CD19 et le CD56. Un marquage par Apo 2.7 nous a aussi permis d'évaluer le pourcentage de plasmocytes en apoptose et d'éliminer ces plasmocytes de notre analyse.

L'expression d'un antigène membranaire est variable selon qu'il s'agit de moelles normales, d'amygdales ou de plasmocytes tumoraux (Harada et al., 1993). Du fait de cette variabilité, il est nécessaire de tenir compte de l'expression d'un antigène plutôt qu'un autre en fonction de la nature et du type de prélèvement (amygdales, moelles normales, MM)

A). Phénotype des plasmocytes normaux.

Dans cette étude, 8 échantillons de moelle osseuse provenant de sujets normaux et 9 amygdales provenant essentiellement de pièces d'amygdalectomie d'enfants ont été phénotypées (Tableau VI). La médiane du pourcentage des plasmocytes normaux, dans les amygdales étudiées, est de **1,3 % (extrême 0,48-2,5)** des cellules mononucléées. Sur les 9 amygdales étudiées, le phénotype de ces plasmocytes est homogène pour certains marqueurs et hétérogène pour d'autres. En effet, l'expression de l'antigène CD19 est constante, ainsi que celle du CD38 et du CD45. L'expression du CD56 est nulle. Par contre, l'expression du CD138 est faible.

La médiane du pourcentage des plasmocytes dans les moelles normales étudiées est de **0,35%** (**extrême 0,15-0,54**) des cellules mononucléées. Le CD38 et le CD138 sont fortement exprimés. Le CD19 est positif dans 80% des cas et le CD56 est négatif dans la majorité des cas. Néanmoins une sous-population plasmocytaire inférieure à 20% peut l'exprimer avec une faible densité antigénique.

L'étude de l'expression du CD45 concorde avec la littérature (Bataille et al, 2003) où il est décrit une forte expression de cet antigène dans les plasmocytes normaux. Dans la moelle osseuse, on distingue deux compartiments CD45 : un compartiment majoritaire CD45 fort (65% des plasmocytes) et un compartiment minoritaire CD45 faible à négatif (35% des plasmocytes). Dans les amygdales, le compartiment CD45 fort est prédominant (95 à 100%).

Donneurs sains	% CP	Phénotype des plasmocytes			
		CD138	CD19	CD56	CD45
Moelles osseuses					
MO1	0.13	++	+	-	+++ (65)
MO2	0.15	++	+	-	+++ (60)
MO3	0.3	+++	+	-	+++ (61)
MO4	0.54	+++	+	-	+++ (64)
MO5	0.27	++	+	-	+++ (41)
MO6	0.49	++	+	-	+++ (56)
MO7	0.35	++	+	-	+++ (59)
MO8	0.49	+++	+	-	+++ (55)
Amygdales					
A1	2.5	+/-	++	-	+++ (100)
A2	0.9	+/-	++	-	+++ (100)
A3	1.5	-	++	-	+++ (100)
A4	1.4	+/-	++	-	+++ (100)
A5	1.3	-	++	-	+++ (95)
A6	0.49	+/-	+	-	+++ (100)
A7	0.48	+	++	-	+++ (100)
A8	1.4	+/-	++	-	+++ (100)
A9	1.1	+	++	-	+++ (100)

Tableau VI : Phénotypage des plasmocytes normaux

L'intensité de fluorescence est définie : (+/-) : positive très faible ; (+) : positive faible ; (++) : positive ; (+++) : positive fort. CP : cellule plasmocytaire ; MO : moelle osseuse ; A : amygdale. Pour l'antigène CD45, le % de la population positive est indiqué.

B). Phénotype des plasmocytes myélomateux.

Dans cette étude, nous avons eu l'occasion de phénotyper des plasmocytes de quarante- cinq prélèvements provenant de patients atteints de MM (Tableau VII).

Nous avons étudié en premier lieu l'expression des antigènes connus comme exprimés ou pas dans le MM, ceci dans le but de s'assurer de la malignité des plasmocytes étudiés. Nous nous sommes, donc, intéressés plus particulièrement à l'expression du CD138, CD38, CD19 et du CD56.

Les résultats du phénotypage concorde avec ceux décrits dans la littérature (Harada et al., 1993). Tous les MM expriment fortement les antigènes CD138 et CD38.

L'avantage d'associer le marquage CD138 et CD38 pour l'étude des autres antigènes, en quadruple marquage, nous permet d'une part d'identifier les plasmocytes dans les différents prélèvements de MM et d'autre part d'étudier l'expression d'un antigène d'intérêt en fonction, éventuellement, des compartiments CD45.

En ce qui concerne l'expression du CD19, nos résultats montrent que cet antigène n'est pas exprimé. Cependant, dans 36 % des cas, une petite sous-population CD19 positive, inférieure à 11% des plasmocytes, est observée. Quant au CD56, 74 % des patients ont une expression élevée. Ces deux antigènes, CD19 et CD56 nous permettent de distinguer les plasmocytes normaux des plasmocytes malins.

Un marquage par Apo 2.7, réalisé sur la majorité des prélèvements, nous a permis d'étudier le % d'apoptose dans nos prélèvements et d'éliminer, éventuellement, ces plasmocytes apoptotiques de notre analyse.

MM	Diagnostic ou		%Apo2.7	Phénotype des plasmocytes				
	Rechute	%CP		CD138	CD38	CD19	CD56	CD45f/CD45F
1	D	6	4	+++	+++	-	++	66/34
2	D	45	7	+++	+++	-	-	94/6
3	D	19	7	+++	+++	-	+++	91/9
4	D	66	28	+++	+++	-	-	97/3
5	D	2.5	nd	+++	+++	-	+	85/15
6	D	1	3	+++	+++	+ (9)	-	57/43
7	D	26	2	+++	+++	-	++	82/18
8	D	1.2	9	+++	+++	-	-	58/42
9	D	12	4	+++	+++	-	++	70/30
10	D	0.4	11	+++	+++	+ (11)	+ (83)	82/18
11	D	17	60	+++	+++	-	++	90/10
12	D	26	nd	+++	+++	-	++	93/7
13	D	34	1	+++	+++	-	++	98/2
14	D	37	37	+++	+++	-	++	84/16
15	D	37	0	+++	+++	-	+	75/25
16	D	4	2	+++	+++	-	++ (20)	71/29
17	D	2	5	+++	+++	+ (10)	+ (10)	55/45
18	D	9	nd	+++	+++	-	++	81/19
19	D	44	80	+++	+++	-	-	87/13
20	D	32	1	+++	+++	-	+	76/24
21	D	10	nd	+++	+++	nd	nd	98/2
22	D	9	nd	+++	+++	nd	nd	nd
23	D	40	nd	+++	+++	nd	nd	nd
24	D	85	7	+++	+++	-	++	100
25	D	12	6	+++	+++	-	++	100
26	R	14	2	+++	+++	-	-	83/17
27	R	1.8	9	+++	+++	+ (11)	++	69/31
28	R	76	nd	+++	+++	-	++	60/30
29	R	12	5	+++	+++	-	-	78/22
30	R	83	5	+++	+++	-	-	99/1
31	R	0.1	4	+++	+++	-	+	72/28
32	R	70	nd	+++	+++	-	++	96/4
33	R	4.5	4	+++	+++	-	+++	91/9
34	R	17	nd	+++	+++	-	++	66/33
35	R	14	nd	+++	+++	-	++	91/9
36	R	18	nd	+++	+++	-	nd	80/20
37	R	78	nd	+++	+++	-	++ (6,4)	98/2
38	R	8	nd	+++	+++	-	-	67/33
39	R	38	nd	+++	+++	-	+	91/9
40	R	88	3	+++	+++	-	++	100
41	R	10	3	+++	+++	-	-	95/5
42	R	23	8	+++	+++	-	-	92/8
43	R	16	6	+++	+++	-	++	92/8
44	R	38	1,5	+++	+++	-	+++	99/1
45	R	87	2	+++	+++	-	nd	72/28

Tableau VII : Phénotypage des plasmocytes de 45 MM

D : diagnostic ; R : rechute. L'intensité de fluorescence est définie : + : positive faible ; ++ : positive ; +++ : positive fort. CP : cellule plasmocytaire ; MO : moelle osseuse ; A : amygdale ; nd : non déterminé. Lorsque des sous-populations positives et négatives sont trouvées, le % de la population positive est indiqué. L'intensité de fluorescence est définie : (+/-) : positive très faible ; (+) : positive faible ; (++) : positive ; (+++) : positive fort.

En ce qui concerne l'expression de l'antigène CD45, nous avons observé une répartition opposée à celle observée dans la moelle normale. En effet, nous avons distingué deux sous-populations : une sous-population majoritaire à faible expression ou ne l'exprimant pas (CD45f) (83% des plasmocytes) et une sous-population minoritaire à forte expression (CD45F) (17% des plasmocytes).

Le Tableau VII résume les résultats de l'immunophénotypage obtenus chez les patients.

II. Etude de la prolifération plasmocytaire dans les compartiments CD45.

A. Etude de la prolifération dans les plasmocytes normaux en fonction des sous-populations CD45.

Afin de pouvoir aborder, par la suite dans cette étude, l'éventuelle implication des protéines anti-apoptotique Mcl-1 et Bcl-2 dans la prolifération plasmocytaire, nous avons commencé par étudier la prolifération dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse et des amygdales en fonction des compartiments CD45.

L'index de phase S (labeling index : LI) correspond au pourcentage des plasmocytes présents en phase S du cycle cellulaire. Ces plasmocytes sont donc proliférants.

L'index de phase S a été étudié en fonction des deux compartiments CD45F et CD45f (Tableau VIII, Figure 8).

Donneurs sains	% CD45f/CD45F	LI % CD45f/CD45F
Moelle osseuse		
MO1	35/65	3.2/39
MO2	58/41	4.0/31
MO3	36/61	12/22
MO4	33/64	3.0/18
MO5	56/41	8.0/22
MO6	49/51	4.1/19
MO7	40/59	8.0/38
MO8	44/55	1.5/18
Amygdale		
A1	100	ND
A2	100	5.3
A3	100	10.5
A4	100	15.2
A5	95	8.9
A6	100	11.5
A7	100	4.43
A8	100	ND
A9	100	ND

Tableau VIII : Pourcentage des plasmocytes normaux en phase S dans les deux compartiments CD45 (faible et Fort).

LI (Labeling index) : index de phase S. MO : moelle osseuse ; A : amygdale

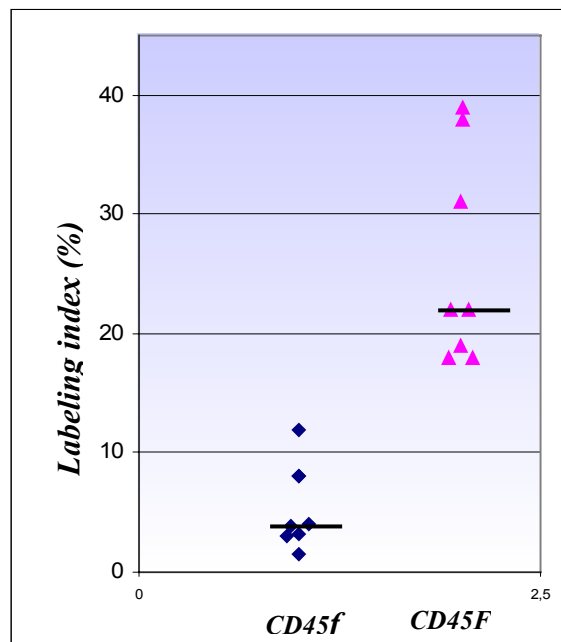


Figure 8 : Etude de la prolifération des plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses dans les compartiments CD45.

Illustration de la répartition autour de la médiane des plasmocytes en phase S dans les compartiments CD45 (CD45 faible et CD45 fort). Labeling index : index de phase S.

Les résultats du tableau VIII et de la figure 8 montrent que dans la moelle osseuse le compartiment CD45 Fort (65% des plasmocytes) est très proliférant (**LI : médiane=22, extrême 18-39**) comparé au compartiment CD45 faible (35% des plasmocytes) qui est beaucoup moins proliférant (**LI : médiane=4, extrême 1,5-12**). Etant donné que, dans les amygdales, le compartiment CD45 Fort est prédominant (95 à 100% des plasmocytes), la prolifération reste élevée (**LI : médiane=10, extrême 4,4-15,2**).

Aux vues de ces résultats, il est évident que dans les plasmocytes normaux, la prolifération est associée à l'expression du CD45. En effet, le compartiment CD45 Fort est significativement plus proliférant que le compartiment CD45 faible ($p=0,024$).

2). Etude de la prolifération cellulaire dans les plasmocytes de MM en fonction des compartiments CD45.

Nous avons étudié, comme dans les plasmocytes normaux, la prolifération dans les compartiments CD45 de 16 MM. L'index de phase S a donc été déterminé dans les plasmocytes CD45 faible et CD45 Fort.

Dans le MM, il est aussi décrit deux sous-populations CD45. Contrairement à la moelle normale, la sous-population CD45 faible est majoritaire.

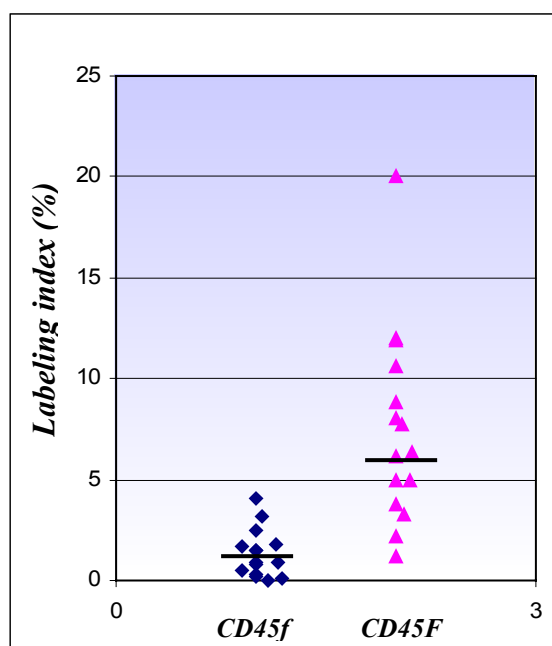


Illustration de la répartition autour de la médiane des plasmocytes en phase S dans les compartiments CD45 (CD45 faible et CD45 fort). Labeling index : index de phase S.

Les résultats du Tableau IX et de la Figure 9 montrent, comme pour les plasmocytes normaux, que dans le MM le compartiment CD45 Fort, population minoritaire (20% des plasmocytes), est significativement plus proliférant (**LI : médiane=6,3 ; extrême 1,2-20**) que le compartiment CD45 faible, majoritaire (80% des plasmocytes) (**LI : médiane=0,9 ; extrême 0-4,1**) ($p<0,0001$).

	LI (MO normale)	LI (Amygdale)	LI (MM)
CD45 faible	4 (1,5-12)		0,9 (0-4,1)
		$p=0,024$	$p<0,0001$
CD45 Fort	22 (18-39)	10 (4,4-15,2)	6,3 (1,2-20)

Tableau IX: Etude de la prolifération dans les compartiments CD45.

Comparaison des médianes de l'index de phase S (LI: labeling index) dans les plasmocyte normaux (moelle osseuse normale et amygdale) et de MM en fonction des compartiments CD45 (faible et Fort).

III. Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2

Dans ce travail nous avons étudié en parallèle l'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes normaux et tumoraux ainsi que leurs corrélations avec d'autres paramètres.

A. PLASMOCYTES NORMAUX

Notre démarche a été : i) d'étudier et de comparer les résultats de l'expression des deux protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2, ii) d'étudier cette expression dans les compartiments CD45, et enfin, iii) d'étudier leur implication dans la prolifération en fonction des compartiments CD45.

1. Expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2.

Nous avons étudié en cytométrie en flux, en quadruple marquage, l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2. La valeur de Mcl-1 et de Bcl-2 est exprimée en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence (RMIF). Ce ratio correspond à la moyenne de fluorescence de chaque protéine divisée par la moyenne de fluorescence du contrôle. Tous les plasmocytes de la moelle osseuse et d'amygdales expriment ces deux protéines à différents degrés (Tableau XI).

La médiane commune du ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence (RMIF) de Mcl-1 d'amygdale et de moelle normale est de **9,8 (extrême 5,2 - 34)** et celle de Bcl-2 est de **3,6 (extrême 1,2 - 10)**. Lorsque l'on compare le RMIF des protéines Mcl-1 et de Bcl-2, dans les plasmocytes normaux (moelle osseuse et amygdale), à la valeur médiane on constate que pour la protéine Mcl-1 les valeurs amygdaliennes sont significativement supérieures aux valeurs de la moelle osseuse : **(médiane 18,2 ; extrême 8,9-34) contre (8,9 ; extrême 5,2-13) ($p = 0,015$)**.

Pour la protéine Bcl-2 l'inverse est observé c'est-à-dire que les valeurs amygdaliennes sont significativement inférieures à celles de la moelle osseuse normale : (**médiane 2,9 ; extrême 1,2-3,6**) contre (**médiane 5,2 ; extrême 3,1-13**) ($p < 0,0001$) (Tableau X).

	Mcl-1		Bcl-2	
MO normale	8,9 (5,2-13)	$p = 0,015$	5,2 (3,1-13)	$p < 0,0001$
Amygdale	18,2 (8,9-34)		2,9 (1,2-3,6)	

Tableau X : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes de moelles osseuses normales et des amygdales.

Comparaison des médianes des RMIF des valeurs amygdaliennes et les valeurs de la moelle osseuse.

		RMIF	
Donneurs sains	% PC	Mcl-1	Bcl-2
Moelle osseuse			
MO1	0.15	13	6.2
MO2	0.28	5.2	7.2
MO3	0.30	6.8	4
MO4	0.54	8.8	5.3
MO5	0.27	8.9	4.9
MO6	0.49	9.8	5.8
MO7	0.35	8.6	5.1
MO8	0.49	9.8	10
Amygdale			
A1	2.5	34	3.4
A2	0.9	16.9	2.9
A3	1.5	11.3	2.1
A4	1.4	19.6	2.4
A5	1.3	9.7	1.2
A6	0.49	8.9	3.6
A7	0.48	28	2.8
A8	1.4	16	3
A9	1.1	26	2.9

Tableau XI : Expression des protéines Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux.

MO : moelle osseuse ; A : amygdale ; RMIF : ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence. PC : plasmocytes.

Lors d'un processus normal de différenciation plasmocytaire, le plasmocyte de l'amygdale est plus immature que le plasmocyte de la moelle osseuse. On peut donc conclure que la maturation des plasmocytes normaux (d'amygdales vers la moelle osseuse) s'accompagne d'une augmentation significative de l'expression de Bcl-2 et d'une diminution significative de Mcl-1.

2). Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45.

Nous avons étudié l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 en fonction du CD45. En effet, nous avons distingué deux sous-populations de plasmocytes dans la moelle osseuse : une sous-population CD45 faible, voire négatif (CD45f), et une sous-population CD45 Fort (CD45F). Dans les amygdales, seule une sous-population CD45 Fort est majoritairement observée (Tableau XIII).

L'étude du RMIF de Mcl-1 dans les sous-populations CD45 de plasmocytes normaux de la moelle osseuse, montre une expression identique de cette protéine dans les deux compartiments CD45 Fort et CD45 faible (la valeur **médiane : 9,2 ; extrême 5,8-14** contre la valeur **médiane : 8,9 ; extrême 4,6-12**) mais les valeurs les plus élevées sont significativement observées dans le compartiment CD45 Fort ($p=0,05$) (Figure 10 ; Tableau XII).

Quant au RMIF de Bcl-2 dans les sous-populations CD45, il est significativement élevé dans le compartiment CD45 faible et bas dans le compartiment CD45 Fort (la valeur **médiane : 7,1 ; extrême 4,9-13** contre la valeur **médiane : 4 ; extrême 3,1-7**) ($p<0,008$) (Figure 11 ; Tableau XII). L'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 est donc antinomique.

	Mcl-1		Bcl-2	
CD45 faible	8,9 (4,9-12)	$p = 0,05$	7,1 (4,9-13)	$p < 0,008$
CD45 Fort	9,2 (5,8-14)		4 (3,1-7)	

Tableau XII : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45 de plasmocytes normaux de la moelle osseuse.

Comparaison des médianes des RMIF des valeurs de Mcl-1 et Bcl - 2 dans les compartiments CD45 faible et CD45 Fort.

Donneurs sains	% CD45f/CD45F	Mcl-1 CD45f/CD45F	Bcl-2 CD45f/CD45F
Moelle osseuse			
MO1	35/65	12/14	8,3/4,2
MO2	58/41	4,6/5,8	9,5/4,2
MO3	36/61	6,9/6,8	4,9/3,1
MO4	33/64	8/9,6	6,8/3,9
MO5	56/41	8,9/8,9	5,9/3,9
MO6	49/51	10/9,5	7,4/4,3
MO7	40/59	8,9/8,4	6,4/3,9
MO8	44/55	10,1/9,6	13/7
Amygdale			
A1	100	34,1	3,44
A2	100	16,9	2,9
A3	100	11,3	2,1
A4	100	19,6	2,4
A5	95	9,7	1,2
A6	100	8,9	3,6
A7	100	28	2,8
A8	100	16	3
A9	100	28	2,9

Tableau XIII : Expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux en fonction du CD45.

MO : moelle osseuse normale ; A : amygdale. Le pourcentage des deux populations CD45 faible (CD45f) et CD45 Fort (CD45F) est exprimé. L'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les deux populations CD45 est exprimée en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence.

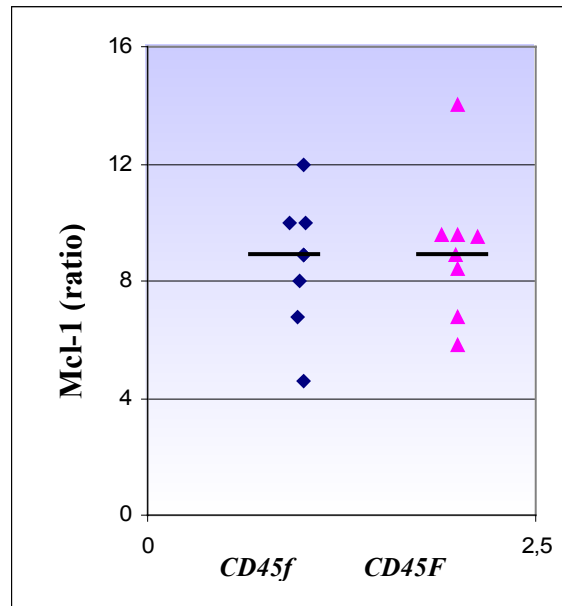


Figure 10 : Etude de l'expression de la protéine Mcl-1 en fonction des compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses normales.

Illustration de la répartition autour de la médiane des valeurs du RMIF de Mcl -1 dans les compartiments CD45 (CD45 faible et CD45 fort).

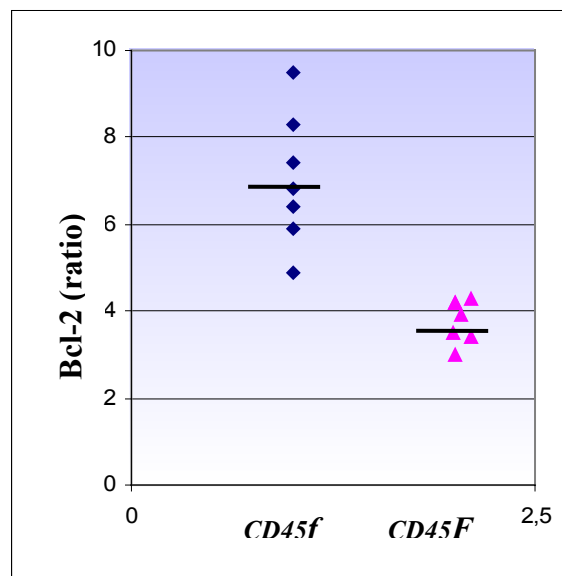


Figure 11 : Etude de l'expression de la protéine Bcl-2 en fonction des compartiments CD45 dans les plasmocytes normaux de 8 moelles osseuses normales.

Illustration de la répartition autour de la médiane des valeurs du RMIF de Bcl-2 dans les compartiments CD45 (CD45 faible et CD45 fort).

3). Etude des corrélations entre l'expression des protéines Mcl-1, Bcl-2 et la prolifération.

Nous nous sommes intéressés à l'implication des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 dans la prolifération des plasmocytes normaux de la moelle osseuse.

L'étude statistique des corrélations entre le RMIF de Mcl-1 dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse et de l'index de phase S (LI), montre une absence de corrélation significative entre ces deux paramètres ($r=0,12$; $p=0,64$; $n=16$) (Tableau XIV).

Cependant, la même étude statistique pour Bcl-2 montre une corrélation inverse significative entre la prolifération (LI) et le RMIF de Bcl-2. C'est-à-dire que plus le taux de Bcl-2 est bas plus le pourcentage de cellules en cycle est élevé ($r = -0,83$; $p = 0,001$; $n = 16$) (Tableau XIV ; Figure 12).

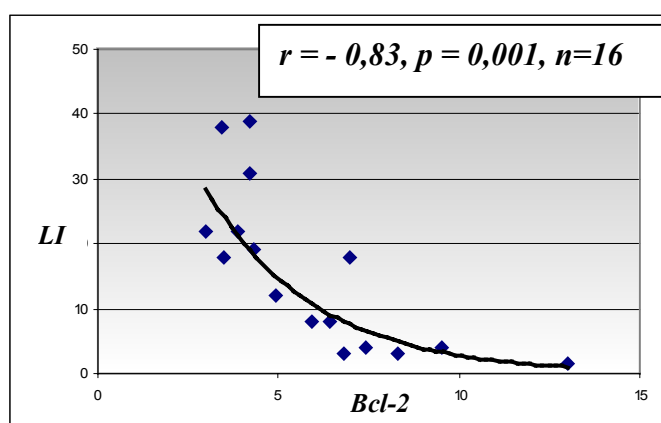


Figure 12 : Etude de la corrélation entre l'expression de la protéine Bcl-2 et l'index de phase S dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse.

r = coefficient de corrélation, n = nombre d'échantillons.

	r	(LI) p	n
Mcl-1	0,12	0,64	16
Bcl-2	-0,83	0,001	16

Tableau XIV : Etude des corrélations entre l'expression de Mcl-1 ou Bcl-2 et la prolifération (labelling index LI) dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse. r = coefficient de corrélation, n = nombre d'échantillons.

B. PLASMOCYTES DE MYELOME MULTIPLE (MM)

1. Expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2.

Les résultats obtenus dans les plasmocytes normaux montrent que l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2, dans la moelle osseuse normale et les amygdales, est antinomique. En effet, Mcl-1 est plus exprimé dans les amygdales que dans la moelle osseuse alors que Bcl-2 est plus élevé dans la moelle osseuse.

L'étude des corrélations entre l'expression de Bcl-2 et Mcl-1 et la prolifération, n'a pas montré de corrélation significative entre Mcl-1 et l'index de phase S dans les plasmocytes normaux contrairement à Bcl-2 où une corrélation inverse significative a été démontrée. Cependant, la protéine Mcl-1 est plus exprimée dans les compartiments les plus proliférants, CD45 Fort dans la moelle osseuse et les plasmocytes amygdaliens qui sont tous CD45 Fort, à l'inverse, la protéine Bcl-2 est plus exprimée dans les compartiments les moins proliférants, CD45 faible.

Afin d'évaluer l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans le MM, nous avons exploré quarante cinq prélèvements de patients atteints de MM et distingué deux groupes majeurs : le groupe de 25 patients au diagnostic et le groupe de 20 patients en rechute. Chez ces patients, nous avons : i) étudié l'expression des deux protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 ii) comparé cette expression dans les rechutes et les diagnostics iii) étudié les corrélations éventuelles entre ces deux protéines et d'autres paramètres tels que la prolifération et l'expression du CD45 (Figure 13).

Nos résultats montrent que l'expression des protéines Mcl-1 dans les plasmocytes de MM est significativement supérieure à celle retrouvée dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse. En effet, la médiane est de **14,1 (extrême 5,2-27)** dans les MM contre une médiane de **8,8 (extrême 5,2-13)** dans les plasmocytes normaux ($p = 0,024$) (Tableau XV).

En revanche, l'expression de la protéine Bcl-2 est identique dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse et de MM. En effet, la médiane des valeurs de Bcl-2 dans les plasmocytes de MM est de **7,3 (extrême 2,7-21)** contre une médiane de **5,5 (extrême 4-10)** dans les plasmocytes de la moelle osseuse normale ($p=0,25$) (Tableau XV).

	Mcl-1		Bcl-2	
Plasmocytes normaux de MO	8,8 (5,2-13)	p=0,024	5,5 (4-10)	p=0,25
Plasmocytes de MM	14,1 (5,2-27)		7,3 (2,7-21)	

Tableau XV : Comparaison des médianes du RMIF des valeurs de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux de 8 moelle osseuse (MO) et de 45 MM.

Afin de pouvoir comparer l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes de MM, nous avons défini, à partir des valeurs de la moelle normale, des valeurs anormalement élevées. Ces valeurs élevées de Mcl-1 et Bcl-2 sont calculées à deux écarts-types au-dessus de la moyenne.

La moyenne est calculée à partir des ratios de moyenne d'intensité de fluorescence de Mcl-1 ou de Bcl-2, dans les plasmocytes des moelles normales. Nous avons donc défini pour Mcl-1 une valeur anormalement élevée supérieure à **13,4 (8,86+4,54)** et celle de Bcl-2 supérieure à **9,7 (6+3,7)**.

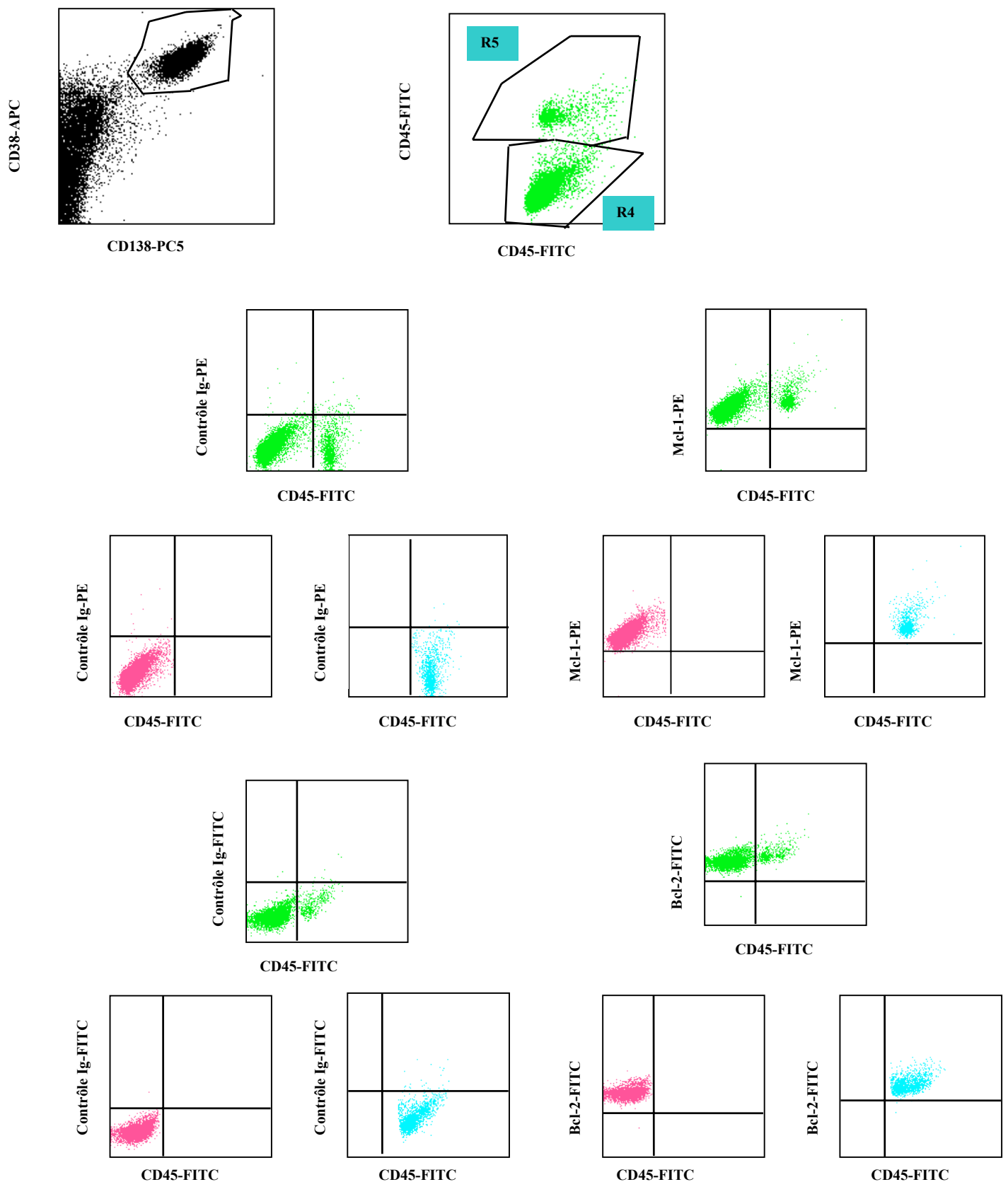


Figure 13 : Cytogrammes de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl2 dans les compartiments CD45.

Deux populations, en fonction de l'expression du CD45, ont été sélectionnées. R4 : plasmocytes à faible SSC et à CD45 faible, R5 : plasmocytes à fort SSC et à CD45 Fort. Les cytogrammes d'expression de Mcl-1 et Bcl-2 sont en fonction de R4 et R5.

a. Mcl-1

La limite supérieure aux valeurs normales de Mcl-1 a été définie à **13,4**. Tout RMIF supérieur à 13,4 est considéré comme anormalement élevé par rapport à la moelle normale.

Nos résultats montrent que le pourcentage d'expression anormale de Mcl-1 dans les plasmocytes de MM est variable selon le stade de la maladie et augmente avec la progression de la maladie (Tableau XVI et XVII). En effet, le RMIF de Mcl-1 dans les plasmocytes de patients en rechute montre que **70% (14 /20)** des patients ont des valeurs anormalement élevées de Mcl-1 par rapport à la moelle osseuse normale contre **36% (9/25)** des patients au diagnostic (**p=0,032**) (Figure 14).

b. Bcl-2

Parallèlement à Mcl-1, nous avons étudié l'expression de la protéine Bcl-2 dans les MM. Une limite supérieure aux valeurs normales de Bcl-2, égale à **9,7** a été définie. Toute valeur de RMIF supérieure à 9,7 est considérée comme élevée.

Contrairement à Mcl-1, nos résultats ne donnent pas de différence significative entre les RMIF de patients au diagnostic et les RMIF de patients en rechute : **28% (7/25)** au diagnostic contre **39% (7/18)** en rechute (**p=0,52**) (Figure 14).

	Mcl-1 > 13,4			Bcl-2 > 9,7	
MM au diagnostic (n=25)	36%	(9/25)	p=0,03	28%	(7/25)
MM en rechute (n=20)	70%	(14/20)		39%	(7/18)
					p=0,52

Tableau XVI : Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 au diagnostic et en rechute dans 45 MM.

Comparaison du pourcentage des valeurs de Mcl-1 ou de Bcl-2 anormales au diagnostic et en rechute. Mcl-1>13,4 : valeur limite de Mcl-1 anormalement élevée ; Bcl-2> 9,7 : valeur limite de Bcl-2 anormalement élevés. n= nombre d'échantillons.

Il est évident, aux vues des résultats obtenus précédemment, que l'expression de Mcl-1 augmente avec la progression de la maladie. La rechute, après échec de traitement, s'accompagne de l'augmentation de cette protéine, alors que la protéine Bcl-2 ne semble pas augmentée.

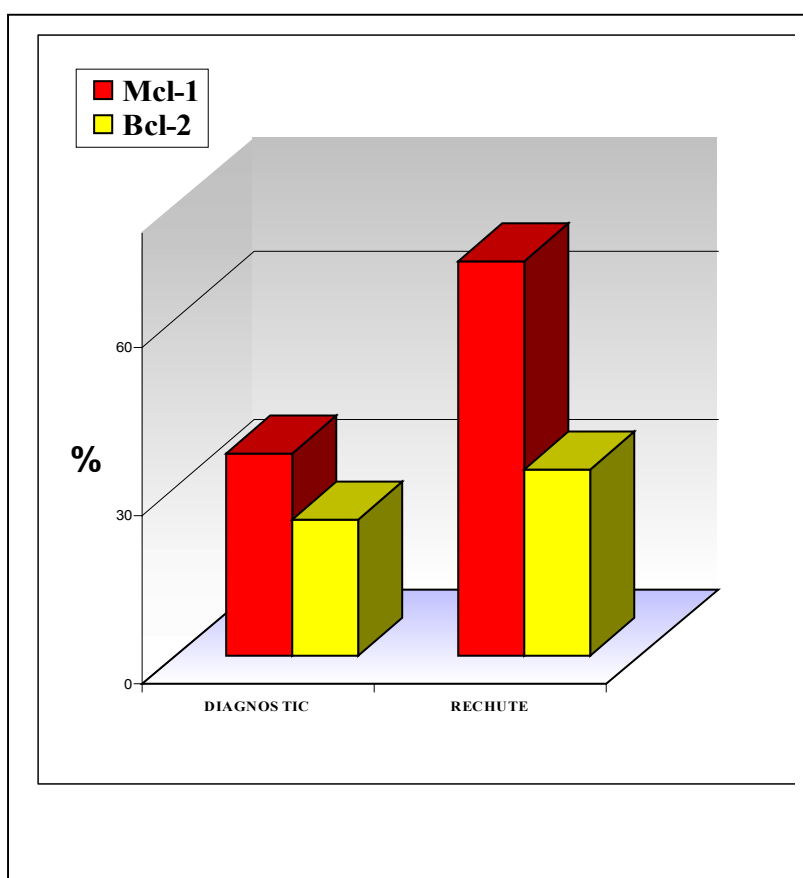


Figure 14 : Histogramme de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les MM au diagnostic et en rechute.

Le RMIF de Mcl-1 $> 13,4$: 36% au diagnostic contre 70% en rechute (en jaune). Le RMIF de Bcl-2 $> 9,7$: 28% au diagnostic contre 39% en rechute (en vert).

MM	Diagnostic ou Rechute	%PC	%Apo2.7	RMIF	
				Mcl-1	Bcl-2
1	D	6	4	22.4	3.1
2	D	45	7	8.2	3.5
3	D	19	7	13	16
4	D	66	28	14.5	7.2
5	D	2.5	ND	10.9	10
6	D	1	3	11.9	12
7	D	26	2	11.7	6.8
8	D	1.2	9	11.1	12.5
9	D	12	4	18.6	6.1
10	D	0.4	11	10.8	11.5
11	D	17	60	12.4	4.4
12	D	26	ND	8.2	2.7
13	D	34	1	5.8	4
14	D	37	37	15.2	6.4
15	D	37	0	9.8	8.8
16	D	4	2	15.6	8.8
17	D	2	5	17.6	7.3
18	D	9	ND	7.9	2.9
19	D	44	80	16.1	14.7
20	D	32	1	19.3	9.7
21	D	10	ND	22	8.8
22	D	9	ND	5.2	7.4
23	D	40	ND	9.2	11.6
24	D	85	7	9.7	3.6
25	D	12	6	13.2	6.2
26	R	14	2	19.1	21
27	R	1.8	9	27	4.7
28	R	76	ND	14.1	5.7
29	R	12	5	7.3	9
30	R	83	5	16.3	13.4
31	R	0.1	4	10	15
32	R	70	ND	14.5	20
33	R	4.5	ND	21	3.5
34	R	17	ND	14.7	9
35	R	14	ND	20.6	ND
36	R	18	ND	18.3	12.3
37	R	78	ND	23.5	13
38	R	8	ND	15	10.4
39	R	38	ND	14.2	9
40	R	88	3	12.8	3.1
41	R	10	3	12.4	6
42	R	23	8	7.5	2.8
43	R	16	6	16	6,5
44	R	38	1,5	16.4	6.6
45	R	87	2	7	5.8

Tableau XVII : Expression de Mcl-1 et de Bcl-2 chez 45 MM.

Les résultats sont exprimés en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. D : diagnostic ; R : rechute ; PC : plasmocytes ; RMIF : ratio de moyenne d'intensité de fluorescence, ND : non déterminé.

2). Etude de l'expression de Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45.

Nous nous sommes intéressés, comme dans les plasmocytes normaux, à l'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2, dans les compartiments CD45 Fort et CD45 faible de 25 prélèvements de MM (Tableau XX).

Le RMIF de Mcl-1 dans les sous-populations CD45 de plasmocytes de MM, montre une expression significativement plus élevée de cette protéine dans le compartiment CD45 Fort ($p=0,05$) (Figure15). En effet, la médiane du ratio de moyenne d'intensité de fluorescence de Mcl-1 dans le compartiment CD45F est de **18,9** ; (extrême **4,6-44**) contre **12,2** ; (extrême **5,2-28**) dans le compartiment CD45f (Tableau XVIII).

Quant à l'étude de l'expression de Bcl-2 dans les sous-populations CD45, elle montre une expression identique dans les deux compartiments, CD45 Fort et CD45 faible : **médiane 6,1 ; extrême 2,7-20** contre **médiane : 7,1 ; extrême 2,4-11,8** ($p= 0,08$) (Figure 16) (Tableau XVIII).

Lorsque nous avons comparé l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes CD45 faible de la moelle osseuse normale, nous n'avons pas observé de différence significative de l'expression de ces deux protéines dans les plasmocytes normaux et tumoraux ($p=0,11$ pour Mcl-1 et $p=1$ pour Bcl-2). En revanche, dans le compartiment CD45 Fort, la même comparaison montre une différence significative de l'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux et tumoraux (Tableau XVIII).

En effet, l'expression de Mcl-1 dans le compartiment CD45 Fort des plasmocytes myélomateux est significativement supérieure à celle des plasmocytes normaux (**médiane 18,9 (4,6-44)** contre une **médiane de 9,2 (5,8-14)**) ($p=0,017$). L'expression de Bcl-2 est aussi significativement augmentée dans le compartiment CD45 Fort tumoral (**médiane 6,1 (2,7-20)**) dans les plasmocytes tumoraux contre une **médiane de 4 (3,1-7)** dans les plasmocytes normaux ($p= 0,017$).

Aux vues de ces derniers résultats, on constate une forte expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans le compartiment CD45 Fort des plasmocytes tumoraux. L'expression de ces deux protéines anti-apoptotiques dans les MM semble aberrante dans le compartiment le plus proliférant.

	Mcl-1		Bcl-2	
	PC MO normale	PC MM	PC MO normale	PC MM
CD45 f	8,9 (4,6-12) <i>p= 0,11</i>	12,2 (5,2-28)	7,1 (4,9-13) <i>p=1</i>	7,1(2,7-20)
	<i>p= 0,06</i>	<u>p=0,05</u>	<u>p<0,008</u>	<i>p=0,08</i>
CD45 F	9,2 (5,8-14) <u>p=0,017</u>	18,9 (4,6-44)	4 (3,1-7) <u>p=0,017</u>	6,1(2,3-11,8)

Tableau XVIII : Etude de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les compartiments CD45.

Comparaison des médianes d'expression de Mcl-1 et de Bcl-2 en fonction des compartiments CD45 des plasmocytes de moelle osseuse normale (n=8) et de MM (n=25). PC : plasmocytes, MO : moelle osseuse.

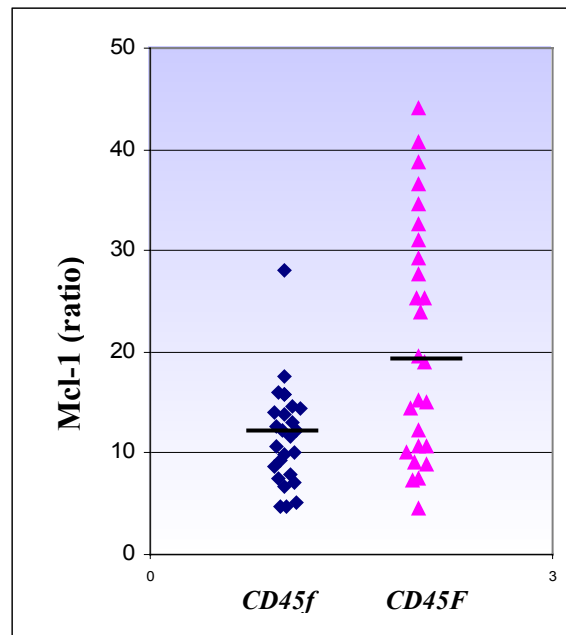


Figure 15 : Etude de l'expression de Mcl-1 dans les compartiments CD45 de 25 MM.

Illustration de la répartition autour de la médiane des RMIF de la protéine Mcl-1 dans les MM dans les compartiments CD45 faible et CD45 Fort.

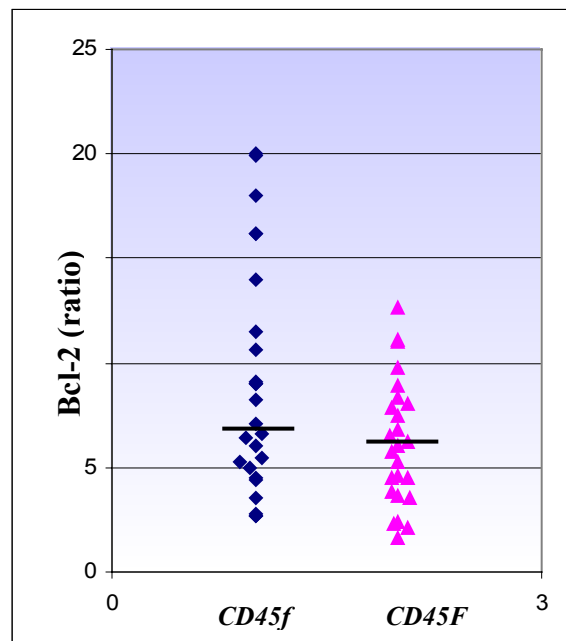


Figure 16 : Etude de l'expression de Bcl-2 dans les compartiments CD45 de 25 MM.

Illustration de la répartition autour de la médiane des RMIF de la protéine Mcl-1 dans les MM dans les compartiments CD45 faible et CD45 Fort.

3). Etude de la corrélation entre la prolifération et les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2.

Nous avons abordé cette étude en deux étapes. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'implication des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans la prolifération cellulaire des plasmocytes de MM, diagnostic et rechute confondus.

En ce qui concerne la protéine Mcl-1, l'étude statistique comparant les RMIF de Mcl-1 dans le MM et l'index de phase S (LI), montre une absence de corrélation significative entre ces deux paramètres ($r=0,16$, $p=0,36$, $n=32$). Cette observation est semblable à celle décrite dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse ($r=-0,12$, $p=0,64$, $n=16$).

En revanche, la même étude statistique, comparant les RMIF de Bcl-2 dans le MM et l'index de phase S (LI), montre une corrélation inverse significative entre l'expression de Bcl-2 et la prolifération ($r=-0,50$, $p=0,05$, $n=32$), semblable à celle décrite dans les plasmocytes normaux ($r=-0,83$, $p=0,001$, $n=16$).

Comparé à la protéine Mcl-1, la protéine Bcl-2 semble impliquée dans la prolifération des plasmocytes. Plus l'expression de Bcl-2 est augmentée, plus le pourcentage des plasmocytes en phase S est diminué et vice versa (Tableau XIX et XX).

	LI (MO normale)			LI (PC MM)		
	r	p	n	r	p	n
Mcl-1	0,12	0,64	16	0,16	0,36	32
Bcl-2	-0,83	0,001	16	-0,50	0,05	32

Tableau XIX : Etude de la corrélation entre la prolifération et l'expression de Mcl-1 et Bcl-2.

Comparaison des corrélations entre la prolifération et l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-2 dans les plasmocytes de moelle osseuse (MO) normale et de MM. LI : labeling index, PC : plasmocyte.

MM	Diagnostic Où Rechute	%	LI%	RMIF	
				Mcl-1 45f/45F	Bcl-2 45f/45F
1	D	66/34	ND	17,5/31	3,2/2,4
2	D	94/6	5,5/24	6,4/11,1	3,5/3,3
3	D	91/9	0,9/8,8	12,2/44	18/7,5
4	D	97/3	0,8/3,8	13,8/25	7,1/6,2
5	D	70/30	0,2/6,2	10,7/12,3	5,3/5,3
6	D	82/18	1,5/1,2	12,8/36,6	11,5/8,3
7	D	90/10	ND	8,7/10,7	4,5/3,6
8	D	93/7	ND	8/9,1	2,7/2,7
9	D	98/2	ND	5,9/4,6	6,6/6,1
10	D	84/16	1,5/12	9,8/15,3	9,1/6,8
11	D	74/25	0,31/5,5	10/38,8	11/7
12	D	71/29	2,7/11,9	15,8/31,6	6,6/5,2
13	D	55/45	1,8/20	8,33/7,8	2,7/2,9
14	D	81/19	ND	14,2/29,3	16,2/4,8
15	D	87/13	ND	14,4/19,6	14/7,9
16	R	58/42	2,5/8	14,1/18,9	5,5/6,2
17	R	99/1	1,7/3,6	15,9/36	16,2/11
18	R	72/28	0/5,7	10/10	20/11,5
19	R	96/4	0,13/1,8	14,6/27,7	19,9 /11,8
20	R	91/9	0,47/6,3	13/15,4	9/8
21	R	95/5	16,6/40	12,2/15	9/4,5
22	R	92/8	0,6/8,2	7,2/8,9	2,8/2,3
23	R	92/8	ND	16,1/25,2	6,6/4,5
24	R	99/1	ND	28/40,8	8,25/6,48
25	R	72/28	ND	5,2/10,7	4,4/3,8

Tableau XX : Valeurs des ratio de moyenne d'intensité de fluorescence de Mcl-1 et Bcl-2 et le pourcentage de l'index de phase S dans 25 (MM).

Expression des résultats en fonction des sous populations CD45 faible et CD45 Fort (CD45F).

DISCUSSION - CONCLUSION

Dans la littérature, peu d'études ont été consacrées à la protéine Mcl-1 dans le MM. Cette protéine est décrite comme impliquée dans la survie des lymphocytes B et plus particulièrement dans les stades tardifs de la différenciation B (Lomo et al., 1996) (Altmeyer et al., 1997). Elle est, en effet, davantage exprimée dans les lymphocytes B du centre germinatif que dans les lymphocytes B naïfs ou « mémoire ».

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'étude publiée sur l'expression in vivo de Mcl-1. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression de cette protéine dans des plasmocytes normaux (de la moelle osseuse normale et de l'amygdale) et dans des plasmocytes de MM. Nous avons par ailleurs étudié, en parallèle à Mcl-1, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, protéine éponyme de la famille Bcl-2.

Dans cette étude, nous avons quantifié en CMF, pour la première fois, la protéine Mcl-1 dans les plasmocytes normaux. Quant à la protéine Bcl-2, la quantification a déjà été réalisée (Puthier et al., 1999c).

Nos résultats montrent que les valeurs amygdaliennes de Mcl-1 sont supérieures aux valeurs de la moelle osseuse normale. Alors que pour la protéine Bcl-2 l'inverse est observé. Aux vues de ces résultats, nous avons suggéré que la maturation plasmocytaire (de l'amygdale vers la moelle osseuse) s'accompagne d'une diminution de l'expression de Mcl-1 et de l'augmentation de l'expression de Bcl-2. Aussi, ces deux protéines ont une expression antinomique. Il semblerait donc que l'environnement médullaire joue un rôle positif sur Bcl-2 et favorise son hyperexpression et l'environnement amygdalien favorise plutôt l'hyperexpression de Mcl-1. En se basant sur les résultats de cette étude et ceux du laboratoire (données non publiées), il est probable que dans la maturation lymphocytaire et plasmocytaire, le message est différent entre Mcl-1 et Bcl-2. En effet, lors de la maturation lymphocytaire, l'expression de Mcl-1 diminue : du lymphocyte B naïf vers le lymphocyte B « mémoire » en passant par le stade du centroblaste et du centrocyte. Lors de la maturation

plasmocytaire, une diminution de l'expression de Mcl-1 est aussi observée : du lymphocyte B « mémoire » vers les plasmocytes matures de la moelle osseuse en passant par le stade de plasmocytes immatures amygdaliens.

En terme de prolifération, nos résultats ne montrent pas de corrélation significative entre l'expression de Mcl-1 et le pourcentage des plasmocytes normaux en phase S, alors que l'expression de Bcl-2 est inversement corrélée à la prolifération.

Dans la littérature il est en effet décrit que la protéine Bcl-2 bloque l'entrée en phase S des plasmocytes. Cette protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 est décrite comme impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en inhibant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. L'influence de Bcl-2 sur le cycle cellulaire est un argument en faveur de son rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B. En effet, lors de cette différenciation le stade du lymphocyte B précoce prolifératif exprime un niveau faible de Bcl-2 alors que les stades plus matures expriment un niveau plus élevé de Bcl-2. Dans le centre germinatif, les lymphocytes B les plus proliférants (centroblastes) expriment très faiblement Bcl-2 comparés aux centrocytes où le taux de Bcl-2 est élevé.

Dans le MM, peu d'études ont été consacrées à l'expression in vivo de la protéine Mcl-1. Aussi, une grande partie de ce travail a été consacrée à étudier l'expression de cette protéine dans les MM et de comparer cette expression aux plasmocytes normaux. Parallèlement à Mcl-1, la protéine Bcl-2 a aussi été expertisée et comparée à Mcl-1.

Nos résultats montrent une hyperexpression de Mcl-1 dans les MM par rapport aux plasmocytes normaux. De ce fait, on peut suggérer que les MM ont une expression de Mcl-1 de type amygdalien.

Nous avons aussi observé qu'un tiers des MM au diagnostic contre deux tiers en rechute ont des valeurs de Mcl-1 anormalement élevées à deux écarts-type au-dessus de la moyenne.

Aussi, l'hyperexpression de Mcl-1 est vraisemblablement liée directement à l'activité de la maladie. On devrait, de ce fait, s'attendre à une valeur pronostic de Mcl-1 dans la progression de la maladie (travail en cours). Cette protéine a déjà été décrite comme un facteur pronostic dans les lymphomes non Hodgkiniens. L'étude de Kuramoto et coll. a montré, lors de la quantification de Mcl-1 par RT-PCR, que son expression chez les patients en rémission complète est significativement inférieure à ceux des patients en rechute. La survie sans rechute est significativement plus élevée chez les patients qui expriment des niveaux bas de Mcl-1. Cette même étude a montré que l'expression élevée de Mcl-1 dans les cellules tumorales induit la survie de ces cellules en inhibant l'apoptose induite par le stress d'agent de chimiothérapie ou de radiation et favorise la progression de la maladie (Kuramoto et al., 2002). Dans une autre étude, la protéine Mcl-1 a été impliquée dans la chimiorésistance. En effet l'hyperexpression de cette protéine inhibe l'apoptose induite par l'exposition des cellules hématopoïétiques à l'étoposide (Katoh et al., 1998).

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'expression de Mcl-1 et la résistance au traitement. Ce résultat n'est en aucun cas surprenant car les patients de cette étude ont un suivi de moins de deux ans. Il serait par ailleurs intéressant de refaire cette étude de corrélation dans un an, où l'on disposera de plus d'information sur la progression de la maladie chez nos patients.

Cependant, hyperexpression de Mcl-1 dans le MM est spécifique de cette protéine car ces observations ne sont pas retrouvées pour Bcl-2, ceci est d'autant plus vrai que nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de ces deux protéines anti-apoptotiques.

Le rôle anti-apoptotique de Mcl-1 est bien établi. Ce rôle a été démontré en premier dans les cellules ovariennes d'hamster chinois puis établi dans différents modèles cellulaires. Moulding et coll. ont montré que la protéine Mcl-1 est importante pour prévenir l'apoptose lors de la différenciation de cellules U937 (Moulding et al., 2000). L'étude de Kitada et coll. a

montré l'importance de Mcl-1 dans la survie des lymphocytes B de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). En effet, en présence d'inhibiteurs de protéine kinase, une sous-expression de Mcl-1 induit l'apoptose (Kitada et al., 2000). Enfin, l'hyperexpression de Mcl-1 prévient l'apoptose dans les cellules hépatiques en présence d'IL-6 (Kuo et al., 2001).

Dans le MM, de plus en plus de données suggèrent l'importance de Mcl-1 dans la survie des cellules myélomateuses. Derenne et coll. ont observé une apoptose dans les lignées de MM et dans les plasmocytes de prélèvements de patients, en présence d'oligonucléotides antisens anti-Mcl-1 (Derenne et al., 2002). Ces données sont en accord avec celles de Zhang et coll où il a été observé, en présence d'actinomycine D, que la diminution de l'expression de Mcl-1 induit de l'apoptose (Zhang et al., 2002). La survie de ces plasmocytes est essentiellement liée à l'IL-6, cytokine majeure dans la survie et la croissance du MM. L'implication de l'IL-6 dans la survie des MM est en partie liée à son rôle d'induire une hyperexpression de Mcl-1. En effet, en présence de cette cytokine, il a été observé une augmentation de Mcl-1 alors que l'expression de la protéine Bcl-2 reste stable. Ces résultats, et d'autres par la suite, suggèrent que la régulation de la protéine Mcl-1 d'une part et de Bcl-2 d'autre part, est indépendante et que l'effet anti-apoptotique observé en présence d'IL-6 passe probablement par la régulation positive de Mcl-1 (Jourdan et al., 2003).

Aussi, l'environnement dans lequel se trouvent les plasmocytes est probablement déterminant dans la production de Mcl-1. L'environnement de l'amygdale et de la moelle osseuse de MM semblerait être plus favorable à la production de Mcl-1 que l'environnement de la moelle osseuse normale. Ce lien entre l'environnement et l'expression de Mcl-1 est peut être dû aux propriétés intrinsèques de cette protéine ou à la production de cytokines, et plus particulièrement de l'IL-6.

En ce qui concerne la protéine Bcl-2, nos résultats ne montrent pas de différence d'expression entre les plasmocytes normaux et de MM. Il n'y a pas non plus de différence d'expression de

Bcl-2 dans les MM au diagnostic et en rechute. L'expression de Bcl-2 dans les plasmocytes normaux et tumoraux a déjà été étudiée (Pettersson et al., 1992; Puthier et al., 1999c). Les plasmocytes malins expriment un taux normal de Bcl-2 semblable à celui observé dans les plasmocytes normaux. Ces observations suggèrent que cette protéine n'est pas responsable de l'émergence du clone malin mais que l'hyperexpression de Bcl-2 concorde avec le fait que les plasmocytes normaux sont des cellules bien différenciées, à longue demi-vie, qui ne se divisent pas (Barlogie et al., 1989) et que les plasmocytes de MM acquièrent des anomalies chromosomiques secondaires leur permettant de proliférer.

L'implication de la protéine Mcl-1 dans la prolifération plasmocytaire est peu étudiée. Nous nous sommes intéressés à cette corrélation et comme dans les plasmocytes normaux, nos résultats ne montrent pas de corrélation directe entre l'expression de Mcl-1 et le pourcentage de plasmocytes en phase S. Aussi, une hyperexpression constitutive de Mcl-1 n'est probablement pas due à une anomalie de la prolifération mais plutôt liée directement à la malignité intrinsèque de la tumeur. On peut donc suggérer que, dans le MM, l'augmentation de Mcl-1 est une conséquence de la dérégulation de gènes liés au statut génique de Mcl-1.

L'étude de Fujise et coll., dans la lignée HeLa, a montré l'implication négative de Mcl-1 dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la protéine Mcl-1 est liée physiquement et fonctionnellement avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Cette protéine a un rôle critique dans la réplication de l'ADN. Elle lie l'ADN polymérase δ et forme un complexe avec RF-C (complexe nucléaire). Le complexe RF-C-PCNA se lie à l'ADN et initie sa réplication. L'étude de Fujise a montré qu'une hyperexpression de Mcl-1 induit une diminution du pourcentage des cellules en phase S. Ceci peut être expliqué par l'interaction physique de Mcl-1 et de PCNA qui inhibe l'interaction de cette protéine avec le complexe

RF-C ou avec la polymérase δ , et par conséquent inhibe la progression dans le cycle cellulaire (Fujise et al., 2000).

La protéine p21^{waf1/cip1}, inhibiteur de cycline dépendante kinase, inhibe l'interaction de PCNA avec la polymérase δ et bloque ainsi la progression du cycle de G1 à S. Nous nous sommes donc demandé s'il existe un lien entre la protéine p21^{waf1/cip1} et Mcl-1.

Il serait donc intéressant : i) de reproduire les résultats de Fujise dans le MM et de comprendre le mécanisme d'action de Mcl-1 dans la régulation du cycle cellulaire. ii) d'étudier l'interface entre Mcl-1 et la protéine p21^{waf1/cip1} et son éventuelle implication dans l'inhibition des cyclines kinases dépendantes.

En ce qui concerne Bcl-2, une corrélation inverse entre Bcl-2 et la prolifération, comme dans les plasmocytes normaux, est retrouvée. En effet, l'expression de Bcl-2 dans les MM est similaire à celle observée dans les plasmocytes normaux de la moelle osseuse. Nos résultats concordent avec ceux de l'étude de Puthier et coll. concernant la corrélation inverse entre la prolifération et l'expression de Bcl-2. En effet, plus le taux de Bcl-2 est bas, plus la prolifération est élevée et vice versa.

Différentes études ont montré l'implication de la protéine Bcl-2 dans la prolifération des MM. Dans une étude menée sur 49 patients, il a été observé que l'expression de Bcl-2 est fonction de la localisation de la tumeur (moelle osseuse, sang périphérique, sites extra-médullaires). En effet, les plasmocytes tumoraux de la moelle osseuse et du sang périphérique expriment fortement la protéine Bcl-2 et prolifèrent peu. Les plasmocytes normaux de la moelle osseuse ont le même profil d'expression. En effet, l'hyperexpression de Bcl-2 est associée à une lente prolifération des plasmocytes normaux ou de MM. Sa sousexpression dans les plasmocytes de plasmocytose réactionnelle et dans les plasmocytes malins extra-médullaires est associée à une forte prolifération. Ces derniers plasmocytes sont très proliférants et peu résistants à

l'apoptose. Ogata et coll. suggèrent que les plasmocytes malins extra-médullaires sont différents des plasmocytes de moelle osseuse et du sang périphérique par leur capacité à proliférer en présence d'IL-6, leur expression faible de Bcl-2 et de leur forte résistance à l'apoptose (Ogata et al., 1997; Puthier et al., 1999c).

D'après nos résultats, on distingue deux types de plasmocytes : les plasmocytes à faible prolifération et à forte expression de Bcl-2, correspondant essentiellement aux plasmocytes de la moelle osseuse normale et de MM, et des plasmocytes à forte prolifération et à faible expression de Bcl-2, correspondant aux plasmocytes d'amygdales.

Nos résultats montrent aussi une évolution inverse entre l'expression de la protéine Bcl-2 et le statut prolifératif des plasmocytes normaux et tumoraux. Ces résultats MM ont déjà été observés dans les lymphomes non Hodgkinien (Winter et al., 1998). Dans cette dernière étude la relation inverse entre l'expression de Bcl-2 et l'activité proliférative, dans les lymphomes de grade intermédiaire ou élevé, suggère que Bcl-2 retarde l'entrée dans le cycle cellulaire et inhibe l'apoptose.

Lorsque nous avons corrélié les valeurs de Mcl-1 et de Bcl-2, nos résultats ne montrent pas de corrélation significative entre l'expression de ces deux protéines. En revanche nous avons observé que la majorité des patients qui expriment des valeurs anormalement élevées de Mcl-1, expriment une valeurs normale de Bcl-2 (inférieure à deux écart type de la moyenne) et la majorité des patients qui expriment des valeurs anormalement élevées de Bcl-2 ont des valeurs normales de Mcl-1 (inférieure à deux écart-types de la moyenne). Plus Mcl-1 est fortement exprimé, plus les valeurs de Bcl-2 sont basses et vice versa.

La protéine Mcl-1 n'est pas corrélée à la prolifération (index de phase S) mais elle semblerait corrélée à la progression de la maladie et à la survie des plasmocytes malins. L'index de phase S est un puissant facteur pronostic dans le MM (Rajkumar and Greipp, 1999). Cet index n'est pas corrélié à l'expression de la protéine Mcl-1. Ceci rend l'expression de cette protéine Mcl-1

très intéressante dans le suivi de l'activité de la maladie indépendamment de la prolifération. Aussi on pourrait s'attendre à ce que les MM à forte expression de Mcl-1 soient plus agressifs que les MM à faible expression de Mcl-1.

Quant à l'expression de la protéine Bcl-2, elle est inversement liée à l'agressivité de la maladie. En effet, moins elle est exprimée, plus l'index de phase S est augmenté et plus elle est exprimée, moins les plasmocytes prolifèrent.

On est donc en mesure de définir un profil d'expression de patients sur l'expression de ces deux protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2. Les valeurs élevées de Mcl-1 annonceraient un mauvais pronostic et les fortes valeurs de Bcl-2 définiraient un meilleur pronostic.

Dans le MM on est en mesure de compartimenter la tumeur en fonction de la prolifération CD45. Nous avons donc étudié l'expression de Mcl-1 dans le compartiment CD45 Fort par rapport au reste du compartiment. Contrairement aux plasmocytes normaux, dans le MM la sous-population CD45 faible est majoritaire.

Nos résultats montrent que, contrairement aux plasmocytes normaux, l'expression de Mcl-1 est anormalement élevée dans le compartiment CD45 Fort le plus proliférant. Dans les plasmocytes d'amygdale, où 98% des plasmocytes sont CD45 Fort, nous avons observé des valeurs élevées de Mcl-1. Nous pouvons suggérer que les plasmocytes de MM CD45 Fort suivent une expression de Mcl-1 semblable aux plasmocytes amygdaliens.

Nous nous sommes demandé si l'hyperexpression de Mcl-1 est cantonnée à un seul compartiment ou homogène dans les deux compartiments CD45.

Lorsqu'on compare, dans le compartiment CD45 Fort de plasmocytes normaux et malins, l'expression de Mcl-1, nos résultats montrent que non seulement il existe une expression plus forte de cette protéine dans les MM mais que cette expression est surtout majeure dans le

compartiment proliférant. Une hyperexpression de la protéine Bcl-2 a aussi été observée dans le compartiment CD45 Fort.

En terme d'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2, le compartiment CD45 Fort est donc aberrant. Cette aberration est probablement due à la malignité intrinsèque à la tumeur liée à des anomalies du cycle cellulaire ou à des altérations chromosomiques complexes.

Les données du laboratoire montrent que le compartiment CD45 Fort proliférant dans les plasmocytes normaux est plus sensible à l'apoptose que le compartiment CD45 faible le moins proliférant. Dans le MM, on est en mesure de se demander comment les plasmocytes du compartiment le plus proliférant CD45 Fort continuent à proliférer et résister à l'apoptose. On peut suggérer que l'hyperexpression aberrante de protéine anti-apoptotiques telles que Mcl-1 et Bcl-2 confère à ces plasmocytes une résistance à l'apoptose et une survie considérable tout en restant proliférant.

CONCLUSION

Dans ce travail nous avons expertisé in vivo dans le MM, en CMF (en quadruple marquage), l'expression des protéines anti-apoptotique Mcl-1 et Bcl-2. Nous avons montré que ces deux protéines ont une expression antinomique et contrairement à Bcl-2, la protéine Mcl-1 n'est pas corrélée à la prolifération. Néanmoins, il est décrit, dans un modèle cellulaire autre que le MM, une inhibition du cycle cellulaire par Mcl-1.

Nous avons comparé l'expression de ces deux protéines dans les plasmocytes normaux et tumoraux. Nos résultats montrent que Mcl-1 semble augmenter avec la progression de la maladie alors que l'expression de Bcl-2 est identique au diagnostic et en rechute. En effet, une hyperexpression de Mcl-1 est observée dans les deux tiers des MM en rechute contre un tiers au diagnostic. Cette protéine est peut être un nouveau facteur pronostic lié à l'agressivité de la maladie. Auquel cas nous serons en mesure de déterminer le pronostic des patients atteints de MM à partir du profil d'expression de Mcl-1 et de Bcl-2.

Ces résultats peuvent être intéressants dans la mesure où ils nous permettent de comprendre certains mécanismes de la pathogénie du MM et la résistance du MM à l'apoptose.

Nos perspectives seraient donc : i) D'étudier l'impact pronostic de Mcl-1 sur la survie des patients en comparaison à d'autres marqueurs d'activité tel que la $\beta 2$ microglobuline et la délétion du chromosome 13. ii) De corrélérer l'expression parallèle de Mcl-1 et Bcl-2 avec la progression de la maladie, iii) Etudier l'implication de Mcl-1 dans le cycle cellulaire et de comprendre son mécanisme d'action dans le but de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Altmeyer, A., Simmons, R.C., Krajewski, S., Reed, J.C., Bornkamm, G.W. and Chen-Kiang, S. (1997) Reversal of EBV immortalization precedes apoptosis in IL-6-induced human B cell terminal differentiation. *Immunity* 7(5), 667-77.
- Arpin, C., Banchereau, J. and Liu, Y.J. (1997) Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J Exp Med* 186(6), 931-40.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C. and Bataille, R. (1996) A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335(2), 91-7.
- Avet-Loiseau, H., Daviet, A., Brigaudeau, C., Callet-Bauchu, E., Terre, C., Lafage-Pochitaloff, M., Desangles, F., Ramond, S., Talmant, P. and Bataille, R. (2001) Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 97(3), 822-5.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Grosbois, B. and Bataille, R. (1999a) 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res* 59(18), 4546-50.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Minvielle, S. and Bataille, R. (2002) Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 99(6), 2185-91.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M.J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., Harousseau, J.L. and Bataille, R. (1998) High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 58(24), 5640-5.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, C., Harousseau, J.L., Grosbois, B. and Bataille, R. (1999b) Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 94(8), 2583-9.
- Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y. and Hsueh, A.J. (2000) MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275(33), 25255-61.
- Barlogie, B., Epstein, J., Selvanayagam, P. and Alexanian, R. (1989) Plasma cell myeloma--new biological insights and advances in therapy. *Blood* 73(4), 865-79.
- Bataille, R. and Harousseau, J.L. (1997) Multiple myeloma. *N Engl J Med* 336(23), 1657-64.
- Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X.G. and Klein, B. (1989) Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* 84(6), 2008-11.
- Bataille, R., Robillard, N., Pellat-Deceunynck, C. and Amiot, M. (2003) A cellular model for myeloma cell growth and maturation based on an intracлонаl CD45 hierarchy. *Immunol Rev* 194, 105-11.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P. and Whyte, M.K. (2000) Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275(29), 22136-46.

- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. and Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10(1), 105-15.
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. and Fischer, E.H. (1988) The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19), 7182-6.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278(5345), 1966-8.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9), 647-56.
- Dalton, W.S. and Jove, R. (1999) Drug resistance in multiple myeloma: approaches to circumvention. *Semin Oncol* 26(5 Suppl 13), 23-7.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R. and Amiot, M. (2002) Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100(1), 194-9.
- Facon, T., Avet-Loiseau, H., Guillermin, G., Moreau, P., Genevieve, F., Zandecki, M., Lai, J.L., Leleu, X., Jouet, J.P., Bauters, F., Harousseau, J.L., Bataille, R. and Mary, J.Y. (2001) Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97(6), 1566-71.
- Ferlin, M., Noraz, N., Hertogh, C., Brochier, J., Taylor, N. and Klein, B. (2000) Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol* 111(2), 626-34.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J. and Yeh, E.T. (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275(50), 39458-65.
- Fukuchi, Y., Kizaki, M., Yamato, K., Kawamura, C., Umezawa, A., Hata, J., Nishihara, T. and Ikeda, Y. (2001) Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* 20(6), 704-13.
- Gahrton, G., Tura, S., Ljungman, P., Blade, J., Brandt, L., Cavo, M., Facon, T., Gratwohl, A., Hagenbeek, A., Jacobs, P. and et al. (1995) Prognostic factors in allogeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 13(6), 1312-22.
- Garand, R., Avet-Loiseau, H., Accard, F., Moreau, P., Harousseau, J.L. and Bataille, R. (2003) t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia* 17(10), 2032-5.
- Ge, N.L. and Rudikoff, S. (2000) Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 96(8), 2856-61.
- Georgii-Hemming, P., Wiklund, H.J., Ljunggren, O. and Nilsson, K. (1996) Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 88(6), 2250-8.
- Gojo, I., Zhang, B. and Fenton, R.G. (2002) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* 8(11), 3527-38.
- Hallek, M., Bergsagel, P.L. and Anderson, K.C. (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91(1), 3-21.

- Hamilton, M.S., Barker, H.F., Ball, J., Drew, M., Abbot, S.D. and Franklin, I.M. (1991) Normal and neoplastic human plasma cells express bcl-2 antigen. *Leukemia* 5(9), 768-71.
- Harada, H., Kawano, M.M., Huang, N., Harada, Y., Iwato, K., Tanabe, O., Tanaka, H., Sakai, A., Asaoku, H. and Kuramoto, A. (1993) Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81(10), 2658-63.
- Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I., Chang, R., Barlogie, B., Xiao, H. and Epstein, J. (1994) Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 84(9), 3063-70.
- Hermiston, M.L., Xu, Z. and Weiss, A. (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21, 107-37.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D. and Anderson, K.C. (2001) Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20(42), 5991-6000.
- Jego, G., Bataille, R. and Pellat-Deceunynck, C. (2001) Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 97(6), 1817-22.
- Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J.L., Bataille, R. and Pellat-Deceunynck, C. (1999) Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94(2), 701-12.
- Joshua, D., Petersen, A., Brown, R., Pope, B., Snowden, L. and Gibson, J. (1996) The labelling index of primitive plasma cells determines the clinical behaviour of patients with myelomatosis. *Br J Haematol* 94(1), 76-81.
- Jourdan, M., De Vos, J., Mechti, N. and Klein, B. (2000) Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ* 7(12), 1244-52.
- Jourdan, M., Veyrune, J.L., Vos, J.D., Redal, N., Couderc, G. and Klein, B. (2003) A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* 22(19), 2950-9.
- Katoh, O., Takahashi, T., Oguri, T., Kuramoto, K., Mihara, K., Kobayashi, M., Hirata, S. and Watanabe, H. (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 58(23), 5565-9.
- Kawano, M., Kuramoto, A., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) Cytokines as autocrine growth factors in malignancies. *Cancer Surv* 8(4), 905-19.
- Kawano, M.M. (1995) [Myeloma precursor cells and their differentiation]. *Nippon Rinsho* 53(3), 552-6.
- Kawauchi, K., Lazarus, A.H., Rapoport, M.J., Harwood, A., Cambier, J.C. and Delovitch, T.L. (1994) Tyrosine kinase and CD45 tyrosine phosphatase activity mediate p21ras activation in B cells stimulated through the antigen receptor. *J Immunol* 152(7), 3306-16.
- Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M. and Reed, J.C. (2000) Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96(2), 393-7.
- Klampfer, L., Zhang, J. and Nimer, S.D. (1999) GM-CSF rescues TF-1 cells from growth factor withdrawal-induced, but not differentiation-induced apoptosis: the role of BCL-2 and MCL-1. *Cytokine* 11(11), 849-55.
- Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M. and Bataille, R. (1989) Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 73(2), 517-26.

- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. and Craig, R.W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8), 3516-20.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K. and Reed, J.C. (1995) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 146(6), 1309-19.
- Kuo, M.L., Chuang, S.E., Lin, M.T. and Yang, S.Y. (2001) The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene* 20(6), 677-85.
- Kuramoto, K., Sakai, A., Shigemasa, K., Takimoto, Y., Asaoku, H., Tsujimoto, T., Oda, K., Kimura, A., Uesaka, T., Watanabe, H. and Katoh, O. (2002) High expression of MCL1 gene related to vascular endothelial growth factor is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 116(1), 158-61.
- Kyle, R.A. (1994) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood Rev* 8(3), 135-41.
- Kyle, R.A. (1995) Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells* 13 Suppl 2, 56-63.
- Leo, C.P., Hsu, S.Y., Chun, S.Y., Bae, H.W. and Hsueh, A.J. (1999) Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. *Endocrinology* 140(12), 5469-77.
- Leu, C.M., Chang, C. and Hu, C. (2000) Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 19(13), 1665-75.
- Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A. and Simms, H.H. (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* 68(1), 158-66.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501.
- Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. and Berenson, J. (1995) Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 162(2), 248-55.
- Lokhorst, H.M., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R.A., van Oers, R. and Bloem, A.C. (1994) Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 84(7), 2269-77.
- Lomo, J., Blomhoff, H.K., Jacobsen, S.E., Krajewski, S., Reed, J.C. and Smeland, E.B. (1997) Interleukin-13 in combination with CD40 ligand potently inhibits apoptosis in human B lymphocytes: upregulation of Bcl-xL and Mcl-1. *Blood* 89(12), 4415-24.
- Lomo, J., Smeland, E.B., Krajewski, S., Reed, J.C. and Blomhoff, H.K. (1996) Expression of the Bcl-2 homologue Mcl-1 correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Res* 56(1), 40-3.
- Lotem, J. and Sachs, L. (1995) Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ* 6(6), 647-53.
- Makishima, T., Yoshimi, M., Komiyama, S., Hara, N. and Nishimoto, T. (2000) A subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase, DAD1, interacts with Mcl-1, one of the bcl-2 protein family. *J Biochem (Tokyo)* 128(3), 399-405.
- Manz, R.A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A.E., Hiepe, F. and Radbruch, A. (2002) Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14(4), 517-21.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I. and Brieva, J.A. (2002) The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow

- reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99(6), 2154-61.
- Miguel-Garcia, A., Orero, T., Matutes, E., Carbonell, F., Miguel-Sosa, A., Linares, M., Tarin, F., Herrera, M., Garcia-Talavera, J. and Carbonell-Ramon, F. (1998) bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study. *Haematologica* 83(4), 298-304.
- Moulding, D.A., Akgul, C., Derouet, M., White, M.R. and Edwards, S.W. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol* 70(5), 783-92.
- Moulding, D.A., Giles, R.V., Spiller, D.G., White, M.R., Tidd, D.M. and Edwards, S.W. (2000) Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 96(5), 1756-63.
- Myklebust, J.H., Josefsen, D., Blomhoff, H.K., Levy, F.O., Naderi, S., Reed, J.C. and Smeland, E.B. (1999) Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *J Cell Physiol* 180(1), 71-80.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F. and Wang, X. (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17(12), 1475-86.
- Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S.P., Urashima, M., Schlossman, R.L. and Anderson, K.C. (1997) IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159(5), 2212-21.
- Ogawa, M., Nishiura, T., Oritani, K., Yoshida, H., Yoshimura, M., Okajima, Y., Ishikawa, J., Hashimoto, K., Matsumura, I., Tomiyama, Y. and Matsuzawa, Y. (2000) Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 60(15), 4262-9.
- Pettersson, M., Jernberg-Wiklund, H., Larsson, L.G., Sundstrom, C., Givol, I., Tsujimoto, Y. and Nilsson, K. (1992) Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 79(2), 495-502.
- Puthier, D., Bataille, R. and Amiot, M. (1999a) IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 29(12), 3945-50.
- Puthier, D., Derenne, S., Barille, S., Moreau, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. and Amiot, M. (1999b) Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br J Haematol* 107(2), 392-5.
- Puthier, D., Pellat-Deceunynck, C., Barille, S., Robillard, N., Rapp, M.J., Juge-Morineau, N., Harousseau, J.L., Bataille, R. and Amiot, M. (1999c) Differential expression of Bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia* 13(2), 289-94.
- Puthier, D., Thabard, W., Rapp, M., Etrillard, M., Harousseau, J., Bataille, R. and Amiot, M. (2001) Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 anti-apoptotic molecule. *Br J Haematol* 112(2), 358-63.
- Rajkumar, S.V. and Greipp, P.R. (1999) Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 13(6), 1295-314, xi.
- Reed, J.C. (1995) Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 7(6), 541-6.
- Renner, S., Weisz, J., Krajewski, S., Krajewska, M., Reed, J.C. and Lichtenstein, A. (2000) Expression of BAX in plasma cell dyscrasias. *Clin Cancer Res* 6(6), 2371-80.

- Roldan, E., Garcia-Pardo, A. and Brieva, J.A. (1992) VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med* 175(6), 1739-47.
- Schwarze, M.M. and Hawley, R.G. (1995) Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* 55(11), 2262-5.
- Tsujimoto, Y. and Croce, C.M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14), 5214-8.
- Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., Reed, J.C. and Lichtenstein, A. (1998) BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* 58(2), 256-62.
- Tu, Y., Xu, F.H., Liu, J., Vescio, R., Berenson, J., Fady, C. and Lichtenstein, A. (1996) Upregulated expression of BCL-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide. *Blood* 88(5), 1805-12.
- Uchiyama, H., Barut, B.A., Mohrbacher, A.F., Chauhan, D. and Anderson, K.C. (1993) Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82(12), 3712-20.
- Van Camp, B., Durie, B.G., Spier, C., De Waele, M., Van Riet, I., Vela, E., Frutiger, Y., Richter, L. and Grogan, T.M. (1990) Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 76(2), 377-82.
- Winter, J.N., Andersen, J., Reed, J.C., Krajewski, S., Variakojis, D., Bauer, K.D., Fisher, R.I., Gordon, L.I., Oken, M.M., Jiang, S., Jeffries, D. and Damer, P. (1998) BCL-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: an Eastern Cooperative Oncology Group and Southwest Oncology Group cooperative laboratory study. *Blood* 91(4), 1391-8.
- Yang, T., Buchan, H.L., Townsend, K.J. and Craig, R.W. (1996) MCL-1, a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J Cell Physiol* 166(3), 523-36.
- Zhang, B., Gojo, I. and Fenton, R.G. (2002) Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* 99(6), 1885-93.