

Thèse de Doctorat

Charlotte KERVOËLEN

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Biologie-Santé Nantes Angers*

Discipline : *Biologie cellulaire*

Spécialité : *Hémato-oncologie*

Unité de recherche : *Inserm U892 / CNRS UMR6299*

Soutenue le 14 Octobre 2015

La Dexaméthasone dans le Myélome Multiple : Etude des mécanismes de sensibilité et impact de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie sur la réponse.

JURY

Rapporteurs : **Xavier LELEU**, Professeur d'université - Praticien hospitalier, CHRU de Lille
Jérôme MOREAUX, Maître de conférences, CHU de Montpellier

Examineurs : **François-Régis BATAILLE**, Professeur d'université – Praticien hospitalier, Institut de Cancérologie de l'Ouest
Frédéric LUCIANO, Chargé de recherche, C3M Inserm U1065

Directeur de Thèse : **Martine AMIOT**, Directeur de recherche, CNRS, Inserm U892 / CNRS UMR6299

Co-directeur de Thèse : **Emmanuelle MENORET**, Docteur, Myelomax

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Xavier Leleu, le Dr Jérôme Moreaux, le Pr François-Régis Bataille et le Dr Frédéric Luciano pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Un grand merci au Dr Martine Amiot. Merci Martine de m'avoir accueillie au sein de ton équipe et d'avoir encadré mon travail durant ces trois années. Je te remercie pour tes qualités scientifiques et ta disponibilité. Je te suis très reconnaissante d'avoir cru en moi et de m'avoir conduit jusque là.

Je tiens également à remercier le Dr Emmanuelle Ménoret pour la confiance qu'elle m'a accordée. Manu, merci de m'avoir permis de bénéficier d'un financement CIFRE en m'ouvrant les portes de Myelomax. Merci de m'avoir fait découvrir l'univers du « Privé » et surtout d'avoir trouvé le temps pour discuter des résultats. Merci aussi de m'offrir l'opportunité de continuer à évoluer au sein de Myelomax.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe 10 pour ces trois années passées dans cette ambiance très familiale. Catherine, merci pour ton soutien et tes conseils. Patricia, merci de m'avoir accueillie et « élevée » dans cet univers des protéines. Sophie, merci de m'avoir initiée à la PCR, mais surtout merci pour tous ces bons moments à échanger au travers de nos « volets » de bureau. Christelle, Géraldine et Sylvanie, merci de ne pas m'avoir laissé seule avec mon côté psychorigide et le besoin d'avoir une paillasse toujours propre. C'est toujours très agréable de « râler » accompagnée. Merci également à Agnès, David, Pierre-Sam, Céline, Carole et Yevgeniya. Merci à tous pour vos conseils, vos encouragements et tous ces bons moments qui m'ont permis de passer trois superbes années au sein de l'équipe.

Merci à Steven, Cyrille, Benoit, Maxime, Marion et Anne. Merci de rendre notre travail concret en nous rappelant que non loin de notre paillasse, il y a des patients qui attendent. Je vous remercie de votre disponibilité pour toujours répondre à mes questions.

Je souhaite adresser mes remerciements au groupe de soutien des « Thésards Anonymes ». Leslie, Maëva, Jessie, Carole, Sophie, Romain, Pierre, Cassie et Kristell (oups, ce n'est plus très anonyme tout ça !), merci pour ces moments de doutes et de réconforts partagés autour d'un verre (ou dans les couloirs quand il y avait urgence !). C'est toujours bon de ne pas naviguer seule sur cette grande « galère » qu'est la thèse.

Un Merci particulier à Cassie et Kristell. Merci d'avoir toujours été là pendant ces 3 années. Merci pour tous ces bons moments que nous avons pu passer ensemble au labo et en dehors. J'espère que notre amitié fera « de longs os » ! Choisissez bien votre après-thèse, car où que vous irez, je compte bien venir vous voir !

Je voudrais remercier mes parents, Antoine et Jeanne, Marie et Sam, ainsi que ma belle-famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Un grand merci à Enora, Maëlys, Adèle et Timothé pour m'avoir permis de me ressourcer quand j'en avais besoin.

Une pensée particulière pour Fanou. C'est ton étoile qui m'a guidée jusque-là.

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur la personne qui a su m'accompagner et me soutenir durant ces trois années. Kévin, merci pour ta patience et pour m'avoir supportée pendant les bons et les moments plus difficiles. Cette thèse est aussi un peu la tienne.

Sommaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS :	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. LE MYELOME MULTIPLE	6
1) <i>Généralités</i>	6
2) <i>La biologie du MM</i>	6
A. La cellule d'origine : le plasmocyte	6
B. Oncogénèse.....	8
C. Le concept de sous-clonalité	13
D. Interactions avec le microenvironnement	14
3) <i>La classification moléculaire et la stratification des risques du MM</i>	15
A. La classification moléculaire du MM	15
B. Pronostic et stratification des risques au sein du MM	15
4) <i>Le traitement du MM</i>	18
A. Traitement de première ligne	18
B. Traitement de la rechute.....	19
5) <i>La Dexaméthasone et le Myélome Multiple</i>	19
A. L'origine des traitements à base de Glucocorticoïdes.....	19
B. La Dexaméthasone dans le traitement du MM.....	20
C. La toxicité de la Dexaméthasone	21
6) <i>Le modèle d'étude</i>	22
A. Les lignées cellulaires humaines de MM	22
B. Représentativité de la diversité du MM.....	24
II. LES GLUCOCORTICOIDES	25
1) <i>Généralités</i>	25
2) <i>Mécanismes d'action des GCs</i>	26
A. Génomique.....	26
B. Non-génomique	28
C. Transrépression / Transactivation.....	29
D. Les effets secondaires	29
3) <i>Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)</i>	30
A. Généralités	30
B. Structure	30
C. Isoformes	31
D. Modifications post-traductionnelles	35

E.	Polymorphismes.....	36
4)	<i>Apoptose induite par les GCs dans les cellules lymphoïdes.....</i>	37
A.	Dans les thymocytes.....	37
B.	Dans le développement des lymphocytes T.....	38
C.	Dans les hémopathies malignes.....	39
5)	<i>Mécanismes induisant l'apoptose par les GCs.....</i>	39
6)	<i>Le Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ).....</i>	40
A.	Structure et localisation.....	40
B.	Régulation de l'expression de GILZ.....	41
C.	Cibles moléculaires de GILZ.....	41
D.	Rôle de GILZ dans la réponse aux GCs.....	42
7)	<i>La résistance aux GCs.....</i>	44
A.	L'altération de l'expression des isoformes du GR.....	44
B.	L'altération de l'expression du GR.....	45
C.	Les mutations du GR.....	45
D.	Expression aberrante de molécules de la famille Bcl-2.....	46
E.	Défaut de l'induction de Bim.....	46
III.	L'APOPTOSE.....	47
1)	<i>Les caractéristiques spécifiques de l'apoptose.....</i>	47
2)	<i>Les effecteurs de l'apoptose : les caspases.....</i>	49
3)	<i>Les différentes voies d'activation de l'apoptose.....</i>	52
A.	La voie extrinsèque.....	53
B.	La voie intrinsèque ou mitochondriale.....	53
4)	<i>Les inhibiteurs de l'apoptose.....</i>	55
IV.	LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2.....	56
1)	<i>Classification et structure des protéines de la famille Bcl-2.....</i>	56
2)	<i>Classification fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2.....</i>	57
3)	<i>Les protéines anti-apoptotiques.....</i>	59
A.	Structure des protéines anti-apoptotiques.....	59
B.	Bcl-2.....	60
C.	Mcl-1.....	62
D.	Bcl-x _L	64
E.	Bcl-w.....	66
F.	Bfl-1/A1.....	66
4)	<i>Les protéines pro-apoptotiques à multidomaines : Bax et Bak.....</i>	67
A.	Structure.....	67
B.	Activation de Bax et Bak.....	67
5)	<i>Les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3.....</i>	68
A.	Structure et fonction des protéines BH3-only.....	68
B.	Les BH3-only activatrices.....	69
C.	Les BH3-only sensibilisatrices.....	71

V.	LE MECANISME D’ACTION DE LA DEXAMETHASONE DANS LE MYELOME	74
VI.	LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL.....	75
	RESULTATS.....	76
I.	MECANISMES DE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LA DEX ET IMPACT DE L’HETEROGENEITE MOLECULAIRE DU MM SUR LA REPONSE.	77
	Article 1 : La mort cellulaire induite par la Dexamethasone est restreinte à des sous-groupes moléculaires du myélome multiple spécifiques.....	77
II.	LIGNEES RESISTANTES A LA DEX	79
	1) <i>Etablissement et authentification des lignées résistantes</i>	79
	Article 2 : Un algorithme simple, basé sur la cytométrie de flux, pour l'authentification de routine des lignées cellulaires de myélome multiple et de lymphome à cellules du manteau.....	79
	2) <i>Caractérisation de la résistance des lignées</i>	80
	A. La résistance à la Dex est persistante dans le temps.	80
	B. La diminution irréversible de l’expression du GR inhibe le mécanisme de mort induit par la Dex.	80
	3) <i>Les lignées résistantes à la Dex : Conclusion</i>	82
III.	LA DEPENDANCE A L’IL-6 DES LIGNEES N’A PAS D’IMPACT SUR LA REPONSE A LA DEX.....	83
IV.	EFFET PARADOXAL DE LA DEX DANS DES CELLULES DU SOUS-GROUPE CCND1	84
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	88
	CONCLUSION	97
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

Table des illustrations :

Figures

Figure 1 : Modèle de l'oncogénèse du MM.	9
Figure 2 : Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.	25
Figure 3 : Mécanisme d'action du GR, transactivation / transrépression.	27
Figure 4 : Structure du récepteur aux glucocorticoïdes et sites de modifications post-traductionnelles.	31
Figure 5 : Variants d'épissage du récepteur aux glucocorticoïdes.	32
Figure 6 : Isoformes traductionnelles du récepteur aux glucocorticoïdes.	34
Figure 7 : Structure et sites d'interaction de GILZ.	41
Figure 8 : Illustration des caractéristiques morphologiques de l'apoptose.	48
Figure 9 : Structure et classification des caspases.	50
Figure 10 : Mécanisme d'activation d'une caspase.	51
Figure 11 : Voies d'activation de l'apoptose.	52
Figure 12 : Apoptose par la voie mitochondriale.	54
Figure 13 : Classification et structure des membres de la famille Bcl-2.	57
Figure 14 : Fonctions et interactions des protéines de la famille Bcl-2.	58
Figure 15 : Structure des protéines anti-apoptotiques.	59
Figure 16 : Activation et oligomérisation de Bax et Bak.	68
Figure 17 : Les lignées résistantes après une longue exposition à la Dex le sont toujours après 4 mois de culture sans Dex.	80
Figure 18 : L'expression de <i>NR3C1</i> est fortement et durablement diminuée dans les lignées résistantes.	81
Figure 19 : L'induction de l'expression de GILZ et de l'expression de Bim est inhibée dans le temps.	82
Figure 20 : La dépendance à l'IL-6 des lignées cellulaires de MM n'influence pas la mort cellulaire induite par la Dex.	83
Figure 21 : L'indépendance à l'IL-6 ne modifie pas la réponse à la Dex de lignées initialement dépendantes à l'IL-6.	84
Figure 22 : L'arrêt du cycle en phase G0/G1 est transitoire dans la lignée KMS12-PE.	85
Figure 23 : La Dex inhibe l'induction modérée de la mort cellulaire par d'autres traitements dans la lignée résistante KMS12-PE.	86
Figure 24 : La Dex augmente le pourcentage de cellules CD138 positives du prélèvement d'un patient CCND1.	86

Tableaux

Tableau 1 : Translocations récurrentes impliquées dans le MM.....	11
Tableau 2 : Evènements génétiques secondaires (en % de tumeur).....	12
Tableau 3 : Comparaison de différentes classifications moléculaires du MM.	16
Tableau 4 : Stratification des risques dans le MM.	17
Tableau 5 : Principales combinaisons de traitements dans le MM.	21
Tableau 6 : Caractéristiques des lignées cellulaires humaines de MM.....	23
Tableau 7 : Mutations du récepteur aux glucocorticoïdes.....	45

Liste des abréviations

A

ACTH : Adrénocorticotrophine
AF : Domaine à fonction d'activation transcriptionnelle
Ag : Antigène
AP-1 : Activator Protein-1
ARNm : ARN messenger

B

BCR : Récepteur des cellules B
BH : Bcl-2 homologie

C

CCND : Cycline
CI : Commutation isotypique

D

DBD : Domaine de liaison à l'ADN
Dex : Dexaméthasone

E

ERK : Extracellular-signal-regulated kinase

F

FGFR3 : Fibroblast growth factor receptor 3
FoxO : Forkhead box O
FRE : Element de réponse aux Forkhead

G

GC : Glucocorticoïde
GEP : Profile d'expression génique
GILZ : Glucocorticoid-induced leucine zipper
GR : Récepteur aux glucocorticoïdes
GRE : Elément de réponse aux glucocorticoïdes

H

HMS : Hypermutation somatique
HY : Hyperdiploïde
HSP90 : Heat shock protein 90

I

Ig : Immunoglobuline
IGH : Locus des chaînes lourdes des immunoglobulines
IGL : Locus des chaînes légères des immunoglobulines
IκB : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IL : Interleukine
ITK : Inhibiteurs des Tyrosine Kinases

J

JAK : Janus Kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinases

L

LAL : Leucémie aigue lymphoblastique
LB : Low Bone disease
LBD : Domaine de fixation du ligand
LLC : Léucémie lymphoïde chronique
LMC : Leucémie myéloïde chronique

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MGUS : Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
miRNA : micro-ARN
MM : Myélome multiple
MF : MAF : Musculoaponeurotic fibrosarcoma
MS : MMSET : Multiple myeloma SET

N

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

nGRE : Elément de réponse négative aux glucocorticoïdes

NTD : Domaine N-terminal

P

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PPAR- γ 2 : Peroxisome-proliferator-activated receptor- γ 2

PR : Proliférative

PTMs : Modifications post-traductionnelles

S

SMM : Smoldering Multiple Myeloma

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

T

TC : Translocation / Cycline D

TCR : Récepteur de l'antigène des cellules

T

TNF : Tumor necrosis factor

Introduction Bibliographique

I. LE MYELOME MULTIPLE

1) Généralités

Le myélome multiple (MM) est un cancer hématopoïétique caractérisé par une expansion monoclonale de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Les plasmocytes sont les cellules terminales de la différenciation lymphocytaire B, leur accumulation génère l'hypersécrétion d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale, des lésions osseuses accompagnées parfois d'une hypercalcémie, une insuffisance médullaire (anémie) et rénale, ainsi qu'une susceptibilité aux infections (Bataille and Harousseau 1997, Hideshima, *et al* 2004).

Le MM représente environ 1% de tous les cancers et 10% des hémopathies malignes. Dans les pays occidentaux, son incidence est d'environ 5 cas pour 100 000 habitants par an et l'âge moyen lors du diagnostic est de 68 ans (Mahindra, *et al* 2010, Moreau, *et al* 2013). L'incidence du MM est dépendante du vieillissement, significativement supérieure chez les hommes et deux fois plus élevée chez les noirs américains que chez les caucasiens. Grâce à des progrès indéniables sur la compréhension de la biologie du myélome et au développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces, la médiane de survie des patients est passée de 3 à 6 ans ces 20 dernières années, cependant, le MM reste une pathologie incurable (Hideshima, *et al* 2004, Kumar, *et al* 2014, Rollig, *et al* 2015).

Enfin, il existe une diversité dans le MM aussi bien au niveau biologique que génétique, signifiant que le myélome n'est pas UNE mais de MULTIPLES maladies.

2) La biologie du MM

A. La cellule d'origine : le plasmocyte

Dans le MM, l'équivalent physiologique de la cellule cancéreuse est le plasmocyte dont la fonction de sécrétion des Ig représente un pilier de l'immunité humorale. Le plasmocyte correspond à la forme la plus mature et la plus différenciée de la cellule lymphoïde B.

Après les réarrangements VDJ du gène codant pour la chaîne lourde des Ig (IGH) et les réarrangements des gènes codant pour les chaînes légères (IGL κ et IGL λ), la cellule B

mature naïve, présentant un BCR (Récepteur des cellules B, IgM+ IgD+) fonctionnel, quitte la moelle osseuse pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires et poursuivre sa maturation. Lors de ce passage dans la voie sanguine ou la lymphe, les cellules B matures naïves seront en contact avec des antigènes. Ces cellules ont une durée de vie courte de 2 à 3 jours, mais si elles rencontrent l'antigène reconnu par leur Ig membranaire, les cellules B activées gagnent le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires où elles recevront des signaux de costimulation par les cellules présentatrices d'antigène, notamment la liaison CD40/CD40 ligand, les engageant dans le processus de différenciation. Les cellules B activées gagnent alors la zone sombre des follicules lymphoïdes et entrent en prolifération et maturation. A ce niveau de la différenciation, un second type de réarrangement moléculaire se déroule, il s'agit de l'hypermutation somatique (HMS). Seules les cellules B dont les mutations vont améliorer la spécificité de l'anticorps pour l'antigène vont survivre, les autres meurent par apoptose. Ensuite, un dernier processus de réarrangement se déroule dans ces organes lymphoïdes secondaires, c'est la commutation isotypique (CI). Durant cette étape, des segments spécifiques de l'ADN connus pour être des régions instables sont recombinaisonnés, conduisant à l'expression par la cellule B mature de différentes Ig, soit IgG, IgA ou IgE. Ces deux processus HMS et CI nécessitent l'expression de l'enzyme AID (activation-induced deaminase) et impliquent la génération de cassures double-brin de l'ADN au niveau des loci des Ig. Enfin, ces cellules B matures vont, soit se différencier en cellules B mémoires, ou en plasmablastes (plasmocytes immatures). Les plasmablastes vont poursuivre leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie qui vont migrer dans la moelle osseuse où ils vont recevoir des signaux de survie, tel que l'interleukine 6 (IL-6), sécrétées par les cellules stromales (Boyle, *et al* 2014, Corre, *et al* 2015).

La différenciation cellulaire en plasmocytes normaux est contrôlée par la régulation coordonnée de différents facteurs de transcriptions. Ainsi, l'expression d'IRF4 (interferon regulatory factor 4), de BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) et de XBP1 (X box binding protein 1) sont nécessaires à la survie des plasmocytes. Aussi, ce phénomène s'accompagne de la diminution de l'expression de pax5 (paired box gene 5) et de BCL-6 (B-cell lymphoma-6) (Boyle, *et al* 2014).

L'équivalent normal du plasmocyte tumoral est le plasmablaste post centre germinatif à longue durée de vie (c'est-à-dire après une HMS et une CI). Ceci est notamment supporté par la présence d'hypermutations somatiques du gène des Ig au niveau des cellules de MM (Bakkus, *et al* 1992). Les erreurs survenues durant le processus de différenciation

plasmocytaire vont constituer les évènements oncogéniques aboutissant à l'initiation de la cellule myélomateuse.

B. Oncogénèse

L'oncogénèse du MM est décrite comme étant un processus multi-étape. Il est actuellement démontré que tous les cas de MM sont précédés par une expansion asymptomatique de plasmocytes, connue sous le nom de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) et de MM indolent (SMM pour « smoldering MM »). Une fraction de ces individus avec un MGUS ou un SMM évolueront vers un MM symptomatique qui à terme progresse vers une forme plus agressive, dont les cellules deviennent indépendantes du microenvironnement et quittent l'environnement médullaire conduisant à une leucémie à plasmocytes. Cette oncogénèse multi-étape a pour origine des évènements oncogéniques primaires, initiant le passage de cellule saine à cellule tumorale via l'immortalisation du plasmocyte, puis des évènements oncogéniques secondaires apportant au plasmocyte tumoral les avantages sélectifs nécessaires à sa survie et impliqués dans la progression de la maladie (Figure 1) (Corre, *et al* 2015, Morgan, *et al* 2012, Prideaux, *et al* 2014).

1. Les évènements oncogéniques primaires

L'étude de Smadja *et al.* en 1998, a suggéré l'idée que le myélome représente deux maladies étroitement liées, les myélomes nonhyperdiploïdes et les myélomes hyperdiploïdes (Smadja, *et al* 1998). Actuellement, le modèle d'oncogénèse décrit est constitué de 2 voies différentes d'évènements primaires : i. l'hyperdiploïdie, et ii. les translocations chromosomiques impliquant le gène des Ig (translocations IGH). L'une des conséquences de ces évènements, de manière directe ou indirecte, est la dérégulation du point de transition du cycle cellulaire G1/S, une anomalie moléculaire clé du stade précoce du myélome (Prideaux, *et al* 2014).

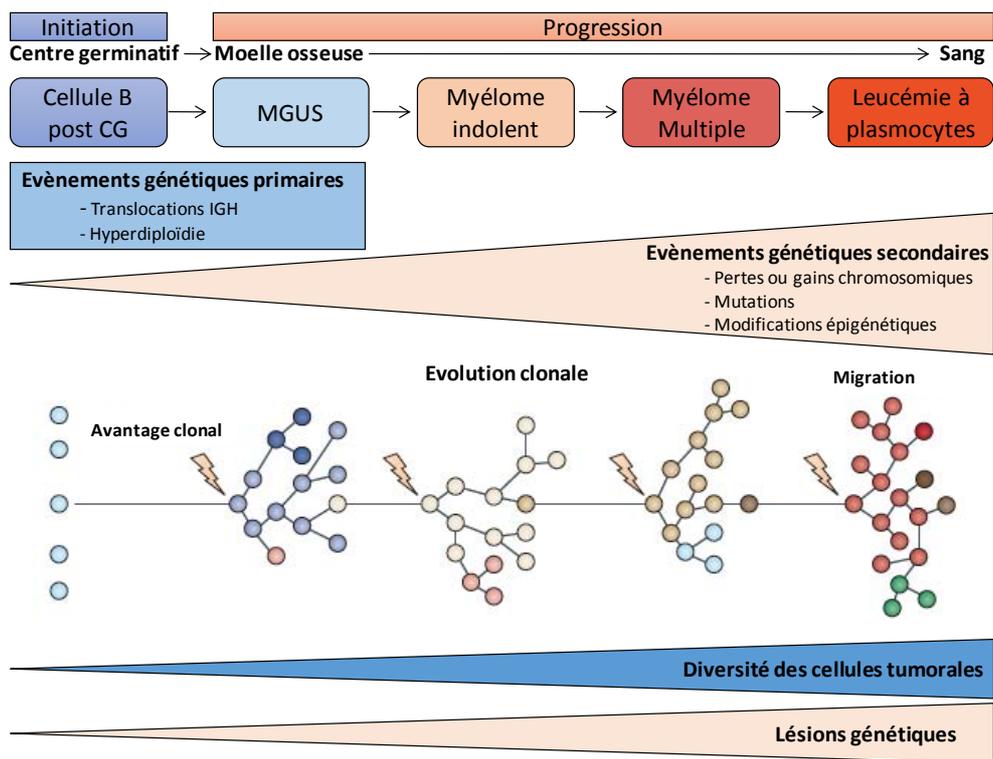


Figure 1 : Modèle de l'oncogénèse du MM.

(d'après (Morgan, et al 2012)). Le MGUS (gammopathie monoclonale de signification indéterminée) et le myélome indolent correspondent à des stades asymptomatiques contrairement au myélome qui présente diverses caractéristiques cliniques. La cellule initialement dérégulée provient du stade MGUS, cependant, suite à l'apparition d'anomalies génétiques primaires, elle acquiert un avantage clonal, prolifère et évolue. Cette évolution clonale se déroule suivant un schéma d'évolution darwinienne par embranchement.

i. L'hyperdiploïdie

L'hyperdiploïdie est observée chez environ 55% des patients qui présentent un nombre de chromosomes compris entre 48 et 75, habituellement avec des copies surnuméraires de 3 chromosomes ou plus. De manière intéressante, les chromosomes gagnés ne sont pas aléatoires, mais au contraire impliquent spécifiquement les chromosomes impairs 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21. Le mécanisme aboutissant à ce gain de chromosome est encore inconnu, cependant il est suggéré que l'hyperdiploïdie est probablement due à une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Chesi and Bergsagel 2013, Corre, *et al* 2015). La majorité des tumeurs hyperdiploïdes expriment le gène CCND1 de manière bi-allélique, peut être dû à une trisomie du chromosome 11, alors que la plupart des autres tumeurs hyperdiploïdes expriment un niveau élevé du gène CCND2 par un mécanisme inconnu (Chesi and Bergsagel 2013).

ii. Les translocations chromosomiques impliquant le gène des Ig

Une translocation IGH est observée chez environ 50% des patients. De larges études provenant de différents groupes ont montré que la prévalence des translocations IGH augmente avec le stade de la maladie. En effet, elle est d'environ 50% dans les MGUS et SMM, de 55 à 70% dans les MM intramédullaires, de 85% dans les leucémies à plasmocytes, et est retrouvée dans la quasi-totalité des lignées cellulaires de MM (dont la plupart est dérivée de leucémies à plasmocytes) (Avet-Loiseau, *et al* 1999, Chesi and Bergsagel 2013, Fonseca, *et al* 2009). Certaines des translocations 14q32 sont récurrentes, tandis que d'autres semblent être aléatoires (Tableau 1). Suite à la translocation, les gènes partenaires se retrouvent sous la dépendance de la forte région « activatrice » de l'IGH, conduisant ainsi à la surexpression des protéines cibles. Ces translocations semblent provenir d'erreurs lors des processus à haut risque d'erreur génétique que sont la HMS et la CI. L'hypothèse majeure pour la sélection des partenaires de la translocation 14q32 est la proximité de domaines des chromosomes 14, 11 et 4 à certains moments des étapes de HMS et de CI (Bergsagel and Kuehl 2001, Corre, *et al* 2015).

La translocation la plus fréquente est la t(11 ;14)(q13 ;32) observée chez 15 à 20% des patients et 25% des lignées cellulaires de MM. Cette translocation t(11 ;14) dérégule l'expression du gène CCND1 conduisant à la surexpression de la cycline D1. De manière intéressante, cette translocation t(11 ;14) est présente dans environ 40% des leucémies à plasmocytes primaires (entre 20 et 71% selon les études) (Fernandez de Larrea, *et al* 2013). Il existe également d'autres translocations plus rares dérégulant d'autres gènes codant pour une cycline, la t(6 ;14)(p21 ;q32) qui ne représente que 2% des patients et augmente l'expression du gène CCND3, et la t(12 ;14)(p13 ;q32) qui représente moins de 1% des patients et augmente l'expression du gène CCND2.

La deuxième translocation par sa fréquence est la t(4 ;14)(p16 ;q32) observée chez 12 à 15% des patients et 25% des lignées cellulaires de MM. Cette translocation conduit à la surexpression de 2 gènes, FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), un oncogène connu pour être activé par mutations dans plusieurs types de tumeurs solides, et MMSET (Multiple Myeloma SET), une protéine méthyl-transférase dont la surexpression aboutit à la méthylation de nombreuses protéines du génome. Cependant, environ 20% des tumeurs t(4 ;14) n'expriment pas FGFR3, du fait de la perte de la partie télomérique du chromosome 4 portant FGFR3 lors de certaines translocations. Malgré son rôle indispensable dans les MM t(4 ;14), il n'est pas encore déterminé comment MMSET contribue à la pathogénèse du MM.

Certaines études suggèrent que la surexpression de MMSET conduit à l'augmentation globale de la méthylation des H3K36me2, et la diminution de la méthylation des H3K27me3, ce qui serait responsable des modifications d'expression de nombreux gènes dans les tumeurs t(4 ;14) (Martinez-Garcia, *et al* 2011). Aussi, les tumeurs t(4 ;14) expriment de haut niveau du gène CCND2, cependant, les raisons de cette surexpression restent inconnues (Chesi and Bergsagel 2013).

D'autres translocations récurrentes sont plus rarement observées comme la t(14 ;16)(q32 ; q23) qui dérégule l'expression de l'oncogène MAF (5% des patients), la t(14 ;20)(q32 ;q11) qui dérégule l'oncogène MAFB (2% des patients) et la t(8 ;14)(q24 ;q32) qui dérégule l'oncogène MAFA (<1% des patients). Aussi, même si la translocation t(14 ;16) est peu fréquente chez les patients, elle est présente dans environ 25% des lignées cellulaires de MM, ce qui est possiblement dû à sa forte propension dans les leucémies à plasmocytes chez les patients. Ces translocations dérégulent l'expression des oncogènes c-maf et mafB qui sont des facteurs de transcription, conduisant à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes cibles, dont le gène CCND2 et des molécules d'adhésion. Ceci va augmenter la capacité des cellules tumorales à interagir avec le microenvironnement de la moelle osseuse (Corre, *et al* 2015).

Translocations	Gènes dérégulés	Fréquence
t(4 ;14) (p16 ;q32)	MMSET/FGFR3	15%
t(11 ;14) (q13 ;q32)	CCND1	20%
t(6 ;14) (p21 ;q32)	CCND3	2%
t(12 ;14) (p13 ;q32)	CCND2	<1%
t(14 ;16) (q32 ;q23)	MAF	5%
t(14 ;20) (q32 ;q11)	MAFB	2%
t(8 ;14) (q24 ;q32)	MAFA	<1%

Tableau 1 : Translocations récurrentes impliquées dans le MM.
(d'après (Corre, et al 2015, de Mel, et al 2014)).

2. Les évènements oncogéniques secondaires

En plus de ces évènements oncogéniques primaires, de nombreux autres réarrangements chromosomiques sont présents dans les plasmocytes tumoraux au moment du

diagnostic. Ces évènements secondaires coopèrent avec les évènements primaires pour produire le phénotype malin du myélome et ainsi conduire à la progression de la maladie. Ils incluent des translocations secondaires, des variations du nombre de copies, la perte de l'hétérozygotie, l'acquisition de mutations et des modifications épigénétiques (Prideaux, *et al* 2014).

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

Tableau 2 : Evènements génétiques secondaires (en % de tumeur).

(d'après (Morgan, et al 2012)).

Le tableau 2 montre que les évènements génétiques secondaires les plus fréquents sont la monosomie 13 retrouvée chez environ 45% des patients, la duplication du bras long du

chromosome 1 chez 30 à 35% des patients, et différentes délétions impliquant les régions chromosomiques 1p, 6q, 8p, 12p, 14q, 16q, 17p, ou 20p. Plusieurs délétions sont homozygotes et ciblent des inhibiteurs de la voie NF- κ B, comme BIRC2/3 sur le chromosome 11, TRAF3 sur le chromosome 14 ou CYLD sur le chromosome 16. Des changements chromosomiques récurrents (translocations, délétions, duplications, insertions et amplifications) ont été retrouvés dans la région 8q24 et impliquent l'oncogène MYC qui est un facteur clé dans la biologie du MM. Le tableau 2 résume les différents évènements oncogéniques secondaires. L'ensemble de ces réarrangements chromosomiques sont considérés comme secondaires dans l'oncogénèse du MM car la plupart d'entre eux ne sont retrouvés que dans des sous-clones, contrairement aux translocations IGH qui sont présentes dans la totalité des plasmocytes tumoraux (Corre, *et al* 2015).

C. Le concept de sous-clonalité

La sensibilité actuelle des techniques de séquençage du génome ou de l'exome ont confirmé que le MM est une maladie très complexe génétiquement. En effet, une étude montre qu'il y a en moyenne 35 mutations impliquant une modification de séquence d'acides aminés et 21 réarrangements chromosomiques dans un échantillon de patient par rapport en comparaison avec ses cellules saines (Chapman, *et al* 2011).

De plus, différentes études ont montré qu'il existe une certaine hétérogénéité au sein des clones tumoraux, après analyses comparatives des anomalies de l'ADN au diagnostic et à la rechute (Egan, *et al* 2012, Keats, *et al* 2012, Magrangeas, *et al* 2013). En effet, les clones observés à la rechute présentent de légères différences par rapport à ceux au diagnostic. Dans certains cas, le clone à la rechute présente plus de changements chromosomiques mais en ayant le même fond génétique qu'au diagnostic, représentant une évolution clonale classique. Cependant, chez certains patients, le clone à la rechute présente des séquences d'ADN qui étaient délétées au diagnostic, indiquant qu'il s'agirait d'un clone mineur non détecté au diagnostic et responsable de la rechute. Le développement des sous-clones se ferait tôt dans les étapes de l'oncogénèse, probablement directement après la transformation cellulaire. Une question reste encore irrésolue, il s'agit de savoir quels mécanismes sont impliqués dans la sélection clonale. Cela se fait-il sous pression thérapeutique ou est-ce l'histoire naturelle de la maladie ? Un modèle proposé par Morgan *et al.*, est basé sur l'évolution darwinienne, indiquant que l'évolution clonale s'effectuerait par embranchement et le sous-clone le plus adapté à la pression de sélection deviendrait majoritaire (Morgan, *et al* 2012) (Figure 1).

D. Interactions avec le microenvironnement

Le microenvironnement de la moelle osseuse présente un rôle important dans la différenciation, la migration, la prolifération, la survie et la résistance aux traitements des plasmocytes tumoraux. Ce microenvironnement médullaire est composé d'une part d'un compartiment cellulaire constitué de cellules stromales, d'ostéoblastes, d'ostéoclastes, de cellules endothéliales et de cellules immunes. D'autre part, ce microenvironnement est composé d'un compartiment non-cellulaire constitué de la matrice extracellulaire et du milieu liquide (comprenant les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance). Ainsi, les interactions directes entre les molécules d'adhésion des plasmocytes (CD138 ou Syndecan-1, et VLA-4 (very late antigen 4)) et le tissu conjonctif (via le collagène de type I et la fibronectine) ou les cellules stromales (via VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)) activent des voies de signalisation promouvant le cycle cellulaire (voie NF- κ B, interleukine 6 (IL-6)) et la survie tumorale (protéines anti-apoptotiques) (Manier, *et al* 2012).

L'interleukine 6 (IL-6) est reconnue comme le facteur de croissance et de survie clé dans la progression du MM (Klein, *et al* 1989, Klein, *et al* 1995). En effet, l'IL-6 principalement produite par les cellules stromales de la moelle osseuse et les ostéoblastes, induit la croissance cellulaire des cellules de myélome via une voie paracrine. L'IL-6 peut également être produite et sécrétée par les cellules de myélome et ainsi agir de manière autocrine sur celles-ci. La voie NF- κ B joue un rôle central dans l'augmentation de l'IL-6, qu'elle soit due à la stimulation par des cytokines ou par des adhésions cellulaires (Chauhan, *et al* 1997). Après fixation sur son récepteur, l'IL-6 conduit à l'activation des voies MAPK/ERK, JAK/STAT3 et PI3K/Akt, qui, respectivement, permettent la prolifération, la survie via l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1, et l'inhibition des effets antiprolifératifs des inhibiteurs CDK p21 et p27 (Manier, *et al* 2012).

D'autres facteurs de croissance sont impliqués dans la progression du MM, notamment l'Insulin-like Growth Factor de type I (IGF-1) sécrété par les cellules stromales et les ostéoblastes, qui induit la croissance, la survie et la migration des cellules de MM, ou le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) produit par les cellules de MM ou les cellules stromales de la moelle osseuse, qui augmente l'angiogénèse dans la moelle osseuse.

3) La classification moléculaire et la stratification des risques du MM

A. La classification moléculaire du MM

Fondé sur le fait que l'expression des Cyclines de type D est augmentée ou dérégulée dans virtuellement toutes les tumeurs de MM, Bergsagel *et al.*, en 2005 ont proposé une classification moléculaire des myélomes basées sur une analyse de profil d'expression génique (GEP). Cette classification divise les tumeurs de MM en 8 groupes TC (Translocation / Cycline D) : ceux avec une translocation primaire (désignés 11q13, 6p21, 4q16, MAF), ceux qui sur-expriment les gènes CCND1 et CCND2 seul ou ensemble (D1, D1+D2, D2), et les rares cas qui ne sur-expriment aucun gène CCND (aucun) (Bergsagel, *et al* 2005) (Tableau 3).

En 2006, Zhan *et al.*, également en s'appuyant sur la GEP de 414 patients au diagnostic ont proposé une classification moléculaire en 7 groupes. Ces groupes sont caractérisés par une surexpression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération (groupe PR pour « proliférative »), une faible expression de gènes impliqués dans les maladies osseuses (groupe LB pour « Low Bone disease »), une expression aberrante des gènes FGFR3 et MMSET (groupe MS pour MMSET), une signature hyperdiploïde (groupe HY), une surexpression des gènes codant la Cycline D1 ou la Cycline D3 (groupes CD-1 et CD-2), ou une surexpression des gènes MAF et MAFB (groupe MF). Cette classification est nommée la classification UAMS du nom de l'Université d'Arkansas pour les Sciences Médicales (Zhan, *et al* 2006) (Tableau 3).

B. Pronostic et stratification des risques au sein du MM

Le pronostic du myélome dépend de facteurs concernant le patient (âge, état général, comorbidités), du stade et de l'agressivité de la maladie, et de la réponse aux traitements (Russell and Rajkumar 2011).

La translocation chromosomique t(4 ;14) est l'évènement génétique du MM avec la plus haute importance clinique. En effet, la t(4 ;14) est associée avec un pronostic défavorable dans différents contextes cliniques comme lorsque les patients sont traités par des agents alkylants, des agents immunomodulateurs, mais également lorsque les patients reçoivent une thérapie à hautes doses avec une greffe de cellules souches autologues (Chang, *et al* 2004, Fonseca, *et al* 2003, Keats, *et al* 2003).

Groupe	TC	UAMS	Gène	Fréquence
Translocation Cycline D	11q13	CD-1	CCND1	15%
	6p21		CCND3	2%
	(12p13)	CD-2	CCND2	<1%
Translocation MMSET	4p16	MS	MMSET	15%
Translocation MAF	MAF (16q23, 20q12, 8q24)	MF	c-maf	5%
			mafB	2%
			mafA	<1%
Hyperdiploïde	D1	HY	CCND1	33%
	D1+D2	PR	CCND1+CCND2	7%
Autre	Aucun	PR	Pas de CCND	2%
	D2	LB	CCND2	18%

Tableau 3 : Comparaison de différentes classifications moléculaires du MM.

(d'après (Chesi and Bergsagel 2011)). TC : Translocation/Cycline D ; UAMS : Université d'Arkansas pour les Sciences Médicales.

Les groupes moléculaires MAF, t(14 ;16) et t(14 ;20), ont chacun été associés avec un pronostic défavorable dans différentes études (Fonseca, *et al* 2003, Ross, *et al* 2010), cependant, l'étude rétrospective avec une analyse multivariante sur 1003 patients au diagnostic n'a pas montré de rôle pronostic de la translocation t(14 ;16) (Avet-Loiseau, *et al* 2011).

Bien que la translocation t(11 ;14) soit dans certains cas associée avec un phénotype agressif comme la leucémie à plasmocytes, l'impact pronostic globale des translocations t(11 ;14) et t(6 ;14) est neutre (Avet-Loiseau, *et al* 2007).

Enfin, plus souvent retrouvée chez des patients âgés, l'hyperdiploïdie confère un pronostic relativement favorable dans la majorité des cas (Smadja, *et al* 2001), ce qui est particulièrement vrai lorsque l'amplification 5q31.3 est présente (Avet-Loiseau, *et al* 2009). De plus, une étude récente a conclu que la présence de trisomies chez des patients présentant des anomalies comme les translocations t(4 ;14), t(14 ;16), t(14 ;20) ou la délétion du chromosome 17, améliore l'impact négatif habituellement associé avec ces marqueurs pronostics (Kumar, *et al* 2012b).

La classification moléculaire UAMS est pertinente sur un point de vue pronostic, en effet, associée à d'autres marqueurs cytogénétiques, comme la délétion 17p, elle aide à stratifier les patients en risque élevé ou faible. Aussi, dans cette classification, les groupes CD-1 et CD-2 représentent les sous-groupes de patients ayant une translocation t(11 ;14) ou t(6 ;14), cependant le groupe CD-1 est caractérisé par l'expression d'argininosuccinate synthetase 1 (ASS1) et le groupe CD-2 par l'expression d'antigènes de cellule B (CD20, VPREB, et CD79A). De manière intéressante, les patients classés dans ces deux groupes CD-1 et CD-2 ont des réponses cliniques différentes. En effet, parmi tous les groupes moléculaires, le groupe CD-1 présente l'apparition la plus rapide et la fréquence la plus élevée de rémission complète (90%), alors que le groupe CD-2 présente l'apparition la plus lente et la fréquence la plus faible de rémission complète (45%) lorsqu'ils sont traités par une « Total Thérapie 3 » (Bortezomib, Thalidomide, Dexaméthasone). Cependant, après le groupe MF, le groupe CD-1 a la durée de rémission complète la plus courte (77% à 2 ans), alors que le groupe CD-2 a la durée la plus longue (100% à 2 ans) (Chesi and Bergsagel 2013, Nair, *et al* 2010).

Risque Standard	Médiane de survie
-Trisomies (hyperdiploïdie)	
-t(11 ;14)	De 6 à 7 ans
-t(6 ;14)	
Risque Intermédiaire	
-t(4 ;14)	
Risque élevé	Médiane de survie
-Délétion 17q	
-t(14 ;16)	Inférieur à 2 ou 3 ans
-t(14 ;20)	
-Signature de GEP de haut risque	

Tableau 4 : Stratification des risques dans le MM.

(d'après (Rajkumar 2013b)).

Grâce à l'ensemble de ces observations, un modèle de stratification de risque est proposé et utilisé par la Mayo Clinic, dans lequel les patients nouvellement diagnostiqués sont

classés en risque standard, intermédiaire, ou élevé de la maladie, d'après la mSMART (Mayo stratification for myeloma and risk-adapted therapy classification) (Tableau 4) (Rajkumar 2013b). Ce modèle a permis de mettre en place une stratégie adaptée aux risques pour le traitement des patients qui ne peuvent pas être inclus dans un essai clinique (Bergsagel and Chesi 2013).

4) Le traitement du MM

A. Traitement de première ligne

A ce jour, les patients atteints de MGUS ou de myélome indolent sont suivis par une attitude d'abstention-surveillance. En effet, seul le myélome multiple symptomatique relève d'un traitement.

Grâce aux progrès thérapeutiques, la survie des patients a significativement augmenté au cours des dernières années. L'utilisation du Melphalan (agent alkylant) à fortes doses avant greffe de cellules souches autologues au cours des années 1990 correspond à la première augmentation significative de la survie des patients. Un deuxième bon significatif au niveau de la survie a eu lieu au début des années 2000, grâce à l'utilisation des « nouvelles molécules » : le Bortezomib (premier inhibiteur du protéasome), et le Thalidomide (agent immunomodulateur aux propriétés anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anti-tumorales). Le Lenalidomide a également été développé, il s'agit d'une molécule analogue du Thalidomide, mais présentant une plus grande efficacité anti-tumorale et une absence de neurotoxicité.

Le traitement actuel du MM repose sur trois piliers : inhibiteur du protéasome (Bortezomib), agent immunomodulateur (Thalidomide, Lenalidomide, Pomalidomide), agent alkylant (Cyclophosphamide, Melphalan), en association avec une molécule corticostéroïde (Prednisone, Dexaméthasone).

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

Chez les patients de moins de 65 ans, le traitement de première ligne repose actuellement sur un traitement d'induction à trois drogues (inhibiteur du protéasome, agent immunomodulateur ou Cyclophosphamide, Dexaméthasone) suivi d'une autogreffe

conditionnée par du Melphalan à fortes doses puis d'un traitement de consolidation calqué sur la phase d'induction (Moreau and Touzeau 2013).

Chez les patients de plus de 65 ans ou inéligibles à une autogreffe, plusieurs traitements peuvent être recommandés en première ligne : la combinaison Melphalan-Prednisone-Thalidomide (Facon, *et al* 2007), la combinaison Melphalan-Prednisone-Bortezomib (San Miguel, *et al* 2008), ou la combinaison Lenalidomide-Dexaméthasone jusqu'à progression (Benboubker, *et al* 2014).

B. Traitement de la rechute

Lors de la rechute, la reprise d'un traitement comprenant des molécules données en première ligne est une option en fonction de la durée et de la qualité de la réponse initiale, mais ce traitement peut être complété par de nouvelles molécules.

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

- Le Pomalidomide : un agent immunomodulateur de la famille du Thalidomide et du Lenalidomide ayant démontré un bénéfice de survie modéré mais significatif chez des malades en rechute (Benboubker, *et al* 2014). La prise de cette molécule se fait oralement.
- Le Carfilzomib : un inhibiteur du protéasome de nouvelle génération ayant l'avantage de ne pas avoir la toxicité neurologique du Bortezomib. Le Carfilzomib est approuvé aux États-Unis pour le traitement des patients en rechute (Moreau 2012).
- L'Ixazomib (ou MLN9708) : un inhibiteur du protéasome de nouvelle génération, disponible par voie orale, et ayant une faible neurotoxicité (Richardson, *et al* 2015).
- L'Elotuzumab (anti-CS-1) et le Daratumumab (anti-CD38) : deux anticorps monoclonaux très prometteurs et aux profils de tolérance excellents actuellement en cours d'essais cliniques de phase 3 (Moreau and Touzeau 2014).

5) La Dexaméthasone et le Myélome Multiple

A. L'origine des traitements à base de Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GCs), Dexaméthasone et Prednisone, forment les fondations de la plupart des traitements du MM. Ils peuvent être utilisés en agent seul, mais plus souvent ils

sont utilisés en combinaison avec d'autres traitements chimiothérapeutiques comme le Melphalan, le Thalidomide, le Lenalidomide ou le Bortezomib.

En effet, les GCs ont été testés dans le traitement du myélome pour la première fois par Mass en 1962, qui a déterminé que la Prednisone comme agent simple produisait des diminutions significatives des Ig dans le sérum et une augmentation de l'hématocrite, mais pas de différence sur la survie comparée au placebo (Mass 1962). D'autres études ont montré que la Prednisone, en agent seul, produisait un bénéfice chez les patients ayant un myélome de « faible » risque, et avec des réactions de toxicité minimales (McIntyre, *et al* 1985, Salmon, *et al* 1967).

En 1969, l'association classique Melphalan plus Prednisone a été établie par Alexanian *et al.*, qui grâce à une étude randomisée ont montré une survie globale supérieure de 6 mois de cette combinaison par rapport au Melphalan seul (Alexanian, *et al* 1969).

B. La Dexaméthasone dans le traitement du MM

La Dexaméthasone (Dex) est un GC synthétique, 25 fois plus puissant que le Cortisol et 4 à 5 fois plus puissant que la Prednisone. La Dex est utilisée dans le traitement de nombreuses pathologies inflammatoires et autoimmunes, mais également dans le traitement du myélome depuis les années 1980. En effet, donnée en combinaison avec la Vincristine-Doxorubicine (VAD) chez des patients résistants aux traitements standards (Melphalan-Prednisone) et chez des patients en rechute, la Dex induit des effets sur la masse tumorale dans environ 25% des patients dans le premier cas et 45% des patients dans le second (Alexanian, *et al* 1986, Barlogie, *et al* 1984). L'étude d'Alexanian *et al.*, en 1986 a montré que la Dex seule était efficace chez environ un quart des patients avec un myélome réfractaire et semblait être responsable de la plupart des effets de la combinaison VAD (Alexanian, *et al* 1986). Ceci a été confirmé par l'étude de la Dex en tant qu'agent seul chez des patients au diagnostic réalisée par Alexanian *et al.*, en 1992, qui montre également que la Dex à hautes doses fournit un traitement de première ligne simple, efficace et sûr pour quasiment la moitié des patients atteints de MM au diagnostic (Alexanian, *et al* 1992).

De nos jours, la Dex est utilisée dans toutes les phases du traitement de la maladie, aussi bien en traitement de première ligne qu'à la rechute. Même si elle est encore utilisée en agent simple, la Dex à hautes doses est le plus souvent associée à d'autres agents chimiothérapeutiques (Bortezomib, Thalidomide, Lenalidomide, Carfilzomib,

Pomalidomide). Le tableau 5 présente les principaux traitements actuellement utilisés dans le MM, on note que la quasi-totalité des protocoles inclus un GC et que la Dex est présente dans 9 traitements sur 13 (Tableau 5) (Rajkumar 2013a).

Traitement	Références
Melphalan-Prednisone (MP)	(Kyle and Rajkumar 2004)
Thalidomide-Dexamethasone (TD)	(Rajkumar, et al 2006, Rajkumar, et al 2008)
Lenalidomide-Dexamethasone (Rd)	(Rajkumar, et al 2010)
Bortezomib-Dexamethasone (VD)	(Harousseau, et al 2006)
Melphalan-Prednisone-Thalidomide (MPT)	(Facon, et al 2007, Hulin, et al 2009)
Bortezomib-Melphalan-Prednisone (VMP)	(Mateos, et al 2010, Palumbo, et al 2010, San Miguel, et al 2008)
Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone (VTD)	(Cavo, et al 2010)
Bortezomib-Cyclophosphamide-Dexamethasone (VCD)	(Kumar, et al 2012a, Reeder, et al 2009)
Bortezomib-Lenalidomide-Dexamethasone (VRD)	(Richardson, et al 2010)
Carfilzomib	(Siegel, et al 2012)
Carfilzomib-Cyclophosphamide-Dexamethasone (CCyD)	(Brinchen, et al 2014)
Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone (KRD)	(Jakubowiak, et al 2012)
Pomalidomide-Dexamethasone (Pom/Dex)	(Richardson, et al 2014)

Tableau 5 : Principales combinaisons de traitements dans le MM.

(d'après (Rajkumar 2013a)).

C. La toxicité de la Dexamethasone

Tout au long de la maladie, le patient va recevoir de multiples cures de glucocorticoïdes et notamment de Dex. Or, les effets secondaires associés aux hautes doses de Dex sont variés et peuvent parfois être difficilement tolérables par le patient. En effet, la Dex peut provoquer des douleurs d'estomac, du diabète, l'augmentation du risque d'infection, des changements d'humeur, de l'hyperactivité, des insomnies, des faiblesses musculaires, de la rétention d'eau et des troubles de la vision.

Ces effets indésirables dépendent des doses et de la durée du traitement comprenant de la Dex. En 1995, l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) a initié une large étude clinique sur des patients au diagnostic âgés entre 65 et 75 ans pour comparer les effets des traitements Melphalan-Prednisone, Melphalan-Dex, Dex seule et Dex-Interferon. Les résultats de cette étude ont conclu que les traitements à base de Dex à hautes doses sont associés à une toxicité accrue (Facon, *et al* 2006). Aussi, plus récemment, les études d'associations impliquant de hautes doses de Dex dont l'efficacité avait déjà été démontrée (Lenalidomide-Dex), ont montré que la réduction des doses de Dex pouvait diminuer la toxicité des traitements tout en préservant leur efficacité (Dimopoulos and Terpos 2010, Rajkumar, *et al* 2010).

6) Le modèle d'étude

Lors de cette étude, le modèle utilisé est basé sur une large collection de lignées cellulaires humaines de MM et sur des cellules primaires provenant de patients atteints du myélome.

A. Les lignées cellulaires humaines de MM

Au laboratoire nous disposons d'un panel de 46 lignées cellulaires de MM. 16 des lignées cellulaires de MM ont été dérivées en absence d'IL-6 et sont pour la plupart commercialisées, 30 ont été dérivées en présence d'IL-6 dont 29 dans notre laboratoire et celui de Bernard Klein (Montpellier). L'analyse cytogénétique a été réalisée sur la quasi-totalité des lignées cellulaires. 93% de celles-ci présentent une translocation IGH au niveau du locus 14q32, impliquant les gènes MAF dans 26%, CCND1 ou CCND3 dans 35% ou MMSET dans 24% (Tableau 6). Sur les 7 lignées restantes, 4 présentent une translocation n'engageant pas l'un des chromosomes partenaires récurrents dans le MM. Deux lignées ont une translocation impliquant le locus de la chaîne légère des Igs en 22q11, associée à l'un des gènes MAF sur les chromosomes 16 ou 20. Enfin, une lignée ne présente pas de translocation impliquant le locus des gènes des Igs (Moreaux, *et al* 2011).

L'analyse par séquençage du gène TP53 sur l'ensemble des lignées cellulaires de MM a permis de mettre en évidence une anomalie au niveau de ce gène dans 29 lignées (63%) (Tableau 6) (Moreaux, *et al* 2011, Surget, *et al* 2012).

Lignées de MM	Dérivées en IL-6	Anomalie primaire		Statut p53	
		Translocation IGH	Gène dérégulé		
ANBL-6	X	t(14 ;16)	MAF	abn	
BCN	X			WT	
JJN3				abn	
MM1.S				WT	
NAN1	X			abn	
RPMI8226				abn	
XG12	X			WT	
XG13	X			abn	
XG19	X			WT	
L363				t(20 ;22)	abn
NAN6	X			t(14 ;20)	abn
XG6	X			t(16 ;22)	WT
JIM3		t(4 ;14)	MMSET/FGFR3	abn	
KMS11				abn	
LP1				abn	
NAN3	X			abn/WT	
NAN8	X			abn	
NAN9	X			WT	
NCI-H929				WT	
OPM2				abn	
XG7	X			WT	
XG20	X			abn	
XG24	X			WT	
Karpas620				t(11 ;14)	CCND1
KMS12BM		abn			
KMS12PE		abn			
MDN	X	WT			
NAN7	X	abn			
NAN10	X	abn			
SKMM2		abn			
U266		abn			
XG1	X	abn			
XG5	X	abn			
XG11	X	abn			
XG14	X	abn			
XG21	X	WT			
XG23	X	WT			
KMM1		t(6 ;14)	CCND3		
XG22	X			WT	
AMO1		t(12 ;14)	inconnu	WT	
XG2	X			abn	
SBN	X	t(14 ;?)		WT	
XG3	X			WT	
XG4	X			abn/WT	
XG10	X			WT	
XG16	X			aucune	abn

Tableau 6 : Caractéristiques des lignées cellulaires humaines de MM.

B. Représentativité de la diversité du MM

Le travail sur des lignées cellulaires est très important pour améliorer la compréhension de la pathogénèse du myélome, des mécanismes de sensibilité et de résistance aux traitements et donc le développement de nouvelles thérapies. Cependant, de nombreuses études sont réalisées sur un nombre limité de lignées cellulaires ne prenant pas en compte la diversité du MM.

L'analyse de la cohorte dont nous disposons au laboratoire, présentée dans le tableau 6, a permis de mettre en évidence une prévalence des translocations IGH impliquant le locus 14q32 relativement proche de celle observée chez les patients faisant parti du groupe des non-hyperdiploïdes. Malgré la forte prévalence des translocations IGH, l'analyse du transcriptome de ces lignées de MM a pu mettre en évidence un sous-groupe de lignées (30%) portant une signature caractéristique des hyperdiploïdes, avec la surexpression de gènes tels que *CTA* (Cancer Testis Antigen) ou *FRZB* (code pour les « secreted frizzled related protein ») (Moreaux, *et al* 2011). De plus, ces travaux ont mis en évidence que la cohorte de lignées de MM présente une prévalence de mutations Ras proche de celle retrouvée chez les patients. Cependant, le pourcentage de mutations de TP53 est plus élevé dans les lignées que celui retrouvé chez les patients. Ceci, peut être expliqué par le stade avancé de la maladie chez les patients, souvent des leucémies à plasmocyte, dont les prélèvements ont permis d'établir les lignées cellulaires. En effet, ces stades avancés présentent une plus forte prévalence de mutations de *TP53*.

La cohorte de lignées de MM présente donc des variations aussi bien en termes d'anomalies cytogénétiques, en termes de dépendance à l'IL-6, qu'en termes de profil transcriptomique. Cette cohorte est donc représentative de l'hétérogénéité caractéristique du myélome

II. LES GLUCOCORTICOÏDES

1) Généralités

Les glucocorticoïdes (GCs) sont des hormones stéroïdiennes synthétisées et sécrétées sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en réponse à un stress. Ce stress, qui peut être de différentes natures, environnementale, de nociception ou d'émotion, stimule l'hypothalamus qui libère de la corticolibérine qui à son tour va stimuler la libération d'adrénocorticotrophine (ACTH) par l'hypophyse. L'ACTH va ensuite agir sur le cortex surrénalien pour induire la sécrétion de GCs qui exerceront divers effets tissu-spécifiques (Figure 2) (Cruz-Topete and Cidlowski 2015, Smith and Cidlowski 2010).

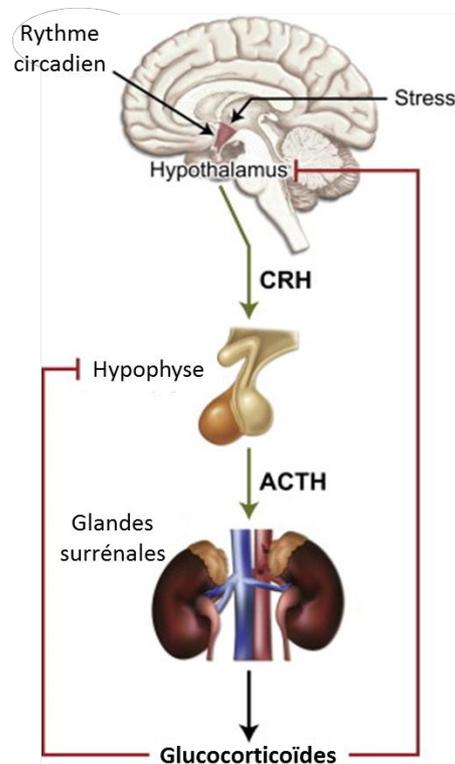


Figure 2 : Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

(d'après (Oakley and Cidlowski 2013)). CRH : corticolibérine, ACTH : adrénocorticotrophine

En effet, les GCs peuvent influencer les activités et fonctions de la plupart des cellules et tissus, comme le métabolisme intermédiaire (homéostasie du glucose, métabolisme des

protéines, lipides et glucides), le tonus vasculaire, le système nerveux central (humeur, cycle éveil/sommeil et cognition) et réguler le développement (des poumons par exemple) (Sionov, *et al* 2008). Les GCs présentent également une importante fonction homéostatique sur le système immunitaire, prévenant une réponse excessive et nocive à une blessure ou infection (Clark and Belvisi 2012). Ces propriétés anti-inflammatoire et immunomodulatrice des GCs ont conduit à leur utilisation comme outil thérapeutique dès les années 1940 par le Dr. Philip Hench dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, puis leur utilisation s'est rapidement étendue pour traiter tous les troubles d'inflammation chronique (asthme, rhinite allergique, maladies autoimmunes...) (Clark and Belvisi 2012, Cruz-Topete and Cidlowski 2015). De plus, les GCs sont co-administrés avec des traitements anti-cancéreux pour prévenir les effets secondaires provoqués par les traitements et pour soulager les douleurs, nausées et vomissements. Ils sont également utilisés dans les cancers solides pour réduire la toxicité aiguë qui suit la chimiothérapie. En effet, des études ont montré que les GCs protègent certains tissus normaux des effets à long terme des traitements cytotoxiques, comme par exemple la moelle osseuse en protégeant les cellules souches hématopoïétiques (Elmas, *et al* 2005, Kim, *et al* 2008, Kriegler, *et al* 1994). Enfin, les GCs ont un rôle essentiel dans le traitement des hémopathies malignes grâce à leur effet antiprolifératif et leur habilité à induire l'apoptose de ces cellules cancéreuses. Les GCs sont donc inclus et efficaces dans les protocoles de chimiothérapie des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), du myélome multiple (MM), des leucémies chroniques lymphocytiques (LCL) et des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH). En revanche, les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) sont résistantes à la thérapie par les GCs.

Les GCs sont de petites molécules lipophiles dérivées du cholestérol par une série de réaction enzymatiques. Le Cortisol est le principal GC chez l'homme. Les GCs les plus souvent utilisés en clinique sont des GCs de synthèse (Prednisone, Dexaméthasone, Paraméthasone...) dont le pouvoir anti-inflammatoire a été largement augmenté par rapport aux GCs naturels (Cortisol), notamment grâce à l'augmentation de leur demi-vie.

2) Mécanismes d'action des GCs

A. Génomique

Les GCs ont une nature lipophile qui leur permet d'être biodisponibles et de passer facilement la membrane plasmique par une diffusion passive. Une fois dans la cellule, les

GCs exercent leurs effets physiologiques en se liant sur le récepteur aux GCs (GR) qui est exprimé de façon ubiquitaire. En absence d'hormone, le GR réside principalement dans le cytoplasme de la cellule sous la forme d'un hétérocomplexe composé de protéines chaperonnes (hsp90, hsp70, et p23) ainsi que d'immunophilines de la famille FK506 (FKBP51 et FKBP52). Ces protéines maintiennent le GR sous une conformation inactive mais qui favorise l'affinité pour la fixation du ligand (Oakley and Cidlowski 2013). Après fixation du GC, le GR subit un changement de conformation résultant à la dissociation des protéines associées et à sa translocation rapide au noyau où il peut réguler la transcription de nombreux gènes positivement ou négativement (Figure 3).

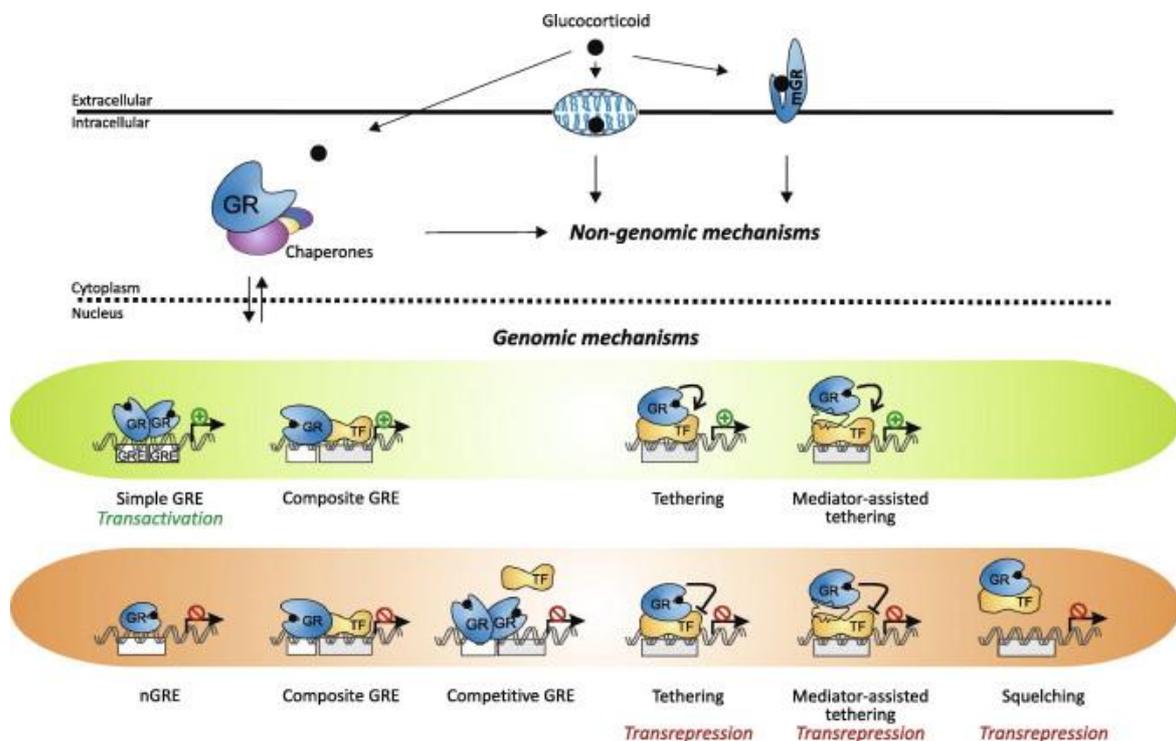


Figure 3 : Mécanisme d'action du GR, transactivation / transrépression.

(d'après (Ratman, et al 2013)). Le GR activé peut agir par de multiples mécanismes. Les glucocorticoïdes peuvent agir soit par la modulation de la membrane indépendamment du GR, par un GR membranaire (mGR) ou cytoplasmique pour induire des effets non génomiques. Le GR cytoplasmique activé par la fixation de son ligand change de conformation, perd une partie de son complexe de protéines chaperonnes et est dirigé vers le noyau. Ici, le GR activé peut avoir des effets positifs ou négatifs sur la transcription via différents mécanismes, dont des mécanismes variés impliquant des interactions avec l'ADN. GRE : Glucocorticoid Response Element, TF : Facteur de Transcription.

Les modulations transcriptionnelles induites par le GR sont décrites par différents mécanismes :

1. Direct :

L'homodimère de GR activé se lie directement à l'ADN via une séquence palindromique appelée Glucocorticoid-response element (GRE) dans le promoteur du gène cible, conduisant ainsi à sa transactivation. Cette induction de l'expression du gène cible est permise grâce à l'interaction de l'homodimère de GR avec la machinerie transcriptionnelle de base et au recrutement de co-activateurs et d'autres facteurs de transcription. Ces co-activateurs vont induire l'acétylation des histones et permettre la transactivation du gène cible.

Le GR homodimérisé peut également se fixer sur des séquences consensus d'élément de réponse négative (nGRE), également palindromique, ce qui peut induire soit le déplacement de co-activateurs ou le recrutement d'un complexe co-répresseur comprenant des histones déacétylases et ainsi conduire à la répression de l'expression du gène cible.

2. Tethering (attachement)

Le GR sous forme d'homodimère (ou de monomère) peut induire ou inhiber la transcription de gènes cibles par « attachement », c'est-à-dire, par interaction protéine-protéine avec un facteur de transcription fixé sur sa propre séquence consensus au niveau du promoteur du gène cible. Par exemple, le GR peut physiquement interagir avec le nuclear factor- κ B (NF- κ B) et l'activator protein-1 (AP-1), ce qui inhibe leur capacité à induire la transcription de gènes pro-inflammatoires.

3. GRE composite

Enfin, l'homodimère de GR activé peut se fixer sur sa séquence consensus GRE, interagir avec le facteur de transcription voisin fixé sur sa propre séquence, et ainsi moduler positivement ou négativement l'expression du gène cible.

B. Non-génomique

Même si les principaux effets des GCs sont médiés par des réponses transcriptionnelles allant de quelques minutes à des heures, il est également décrit que le GR peut exercer un effet non-génomique rapide par modulation direct des voies de signalisation en quelques secondes. En effet, le GR pourrait interagir directement avec des kinases comme les ERKs (extracellular signal-regulated kinases), les JNKs (c-Jun NH2-terminal kinases), les

isoformes p38 et ERK5 (Ayroldi et al, 2012). Par exemple, le non-récepteur thyrosine-kinase c-Src associé au complexe du GR cytoplasmique inactif, peut être libéré lors du changement de conformation du GR dû à la fixation de l'hormone, et ainsi activer différentes cascades de kinases. (Oakley and Cidlowski 2013). A ce jour, les mécanismes détaillés et les implications biologiques de ces effets non-génomiques ne sont pas élucidés.

C. Transrépression / Transactivation

La transactivation induite par les GCs résulte de la fixation de l'homodimère de GR activé par la fixation de l'hormone, sur la séquence consensus palindromique GRE du gène cible, induisant ainsi son expression (Figure 3).

La transrépression est le mécanisme par lequel le GR activé par son ligand est recruté indirectement au niveau des sites de régulation d'un gène et inhibe son expression, en interagissant de manière protéine-protéine avec les facteurs de transcriptions fixés sur leur propre site de fixation à l'ADN (exemple NF- κ B et AP-1) (Figure 3).

Les GCs ont plus largement été étudiés pour leur effet anti-inflammatoire et de nombreux auteurs s'entendent sur l'hypothèse de la transrépression. Cette hypothèse suggère que la majorité des effets thérapeutiques anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des GCs sont dus à la transrépression, alors que la transactivation est responsable de la plupart des effets secondaires. Cette hypothèse a donc conduit de nombreux chercheurs à développer de nouvelles molécules pouvant dissocier l'activation du GR privilégiant la transrépression à la transactivation. (Ayroldi, *et al* 2014, Belvisi, *et al* 2001, Clark and Belvisi 2012, De Bosscher, *et al* 2014). Cependant, plus récemment, un nouveau rôle de la transactivation par le GR dans la réponse immuno-suppressive des GCs a émergé, grâce à la caractérisation fonctionnelle de plusieurs protéines anti-inflammatoires induites par les GCs, comme par exemple le Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) qui inhibe l'activation de différentes cellules immunes en condition d'inflammation (Cheng, *et al* 2014).

D. Les effets secondaires

Au niveau physiologique, l'homéostasie du niveau de GCs est maintenue par une boucle de rétro-contrôle négatif inhibant la sécrétion de corticolibérine et d'ACTH par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cependant, les GCs synthétiques présentent une plus forte puissance et une clairance métabolique plus longue que les GCs naturels, c'est pourquoi, malgré des effets thérapeutiques indéniables, les GCs utilisés généralement à fortes doses et

sur de longues périodes provoquent de nombreux effets secondaires. Ceux-ci incluent le diabète sucré, des psychoses, des troubles de l'humeur, une atrophie de la peau avec altération de la cicatrisation, de l'hypertension, une atrophie des muscles, des troubles du métabolisme des graisses et une redistribution des tissus adipeux, des glaucomes et cataractes, un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, une susceptibilité aux infections et de l'ostéoporose.

3) Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)

A. Généralités

Les GCs exercent leur effet en se fixant sur leur récepteur, le GR, un facteur de transcription induit par la fixation de son ligand et membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le GR est une molécule d'environ 100kDa exprimée de façon ubiquitaire et produite à partir d'un unique gène, NR3C1, localisé chez l'homme sur le chromosome 5q31-32. Cependant, l'expression du GR est soumise à des processus alternatifs (épissage, initiation de la traduction) conduisant à de multiples sous-types de GR fonctionnellement distincts.

B. Structure

Le GR est un membre de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires de type I caractérisés par la formation d'homodimères et la présence de trois fonctions distinctes. Ces trois fonctions sont définies par trois domaines spécifiques (Figure 4) :

- le domaine N-terminal (NTD) qui présente le domaine à fonction d'activation transcriptionnelle (AF) -1 qui contient la majorité des résidus sujets aux modifications post-traductionnelles (PTMs). Le NTD est essentiel pour le recrutement de co-régulateurs et de la machinerie transcriptionnelle de base.
- le domaine central de liaison à l'ADN (DBD) est constitué de deux motifs en doigts de zinc impliqués dans la liaison à l'ADN au niveau des séquences appelées Glucocorticoid-response element (GRE). Il s'agit de la région la plus conservée au sein de la famille des récepteurs nucléaires.
- le domaine C-terminal de fixation du ligand (LBD), qui est relié au DBD par une région charnière flexible (H), est composé de 12 hélices α et de 4 feuillets β formant une poche hydrophobe pour la fixation du GC. Il contient également un domaine AF-2 qui interagit avec les co-régulateurs de manière ligand dépendante.

Deux signaux de localisation nucléaire (NL1 et NL2) sont présents à la jonction du DBD et de la région charnière, et dans le LBD, respectivement.

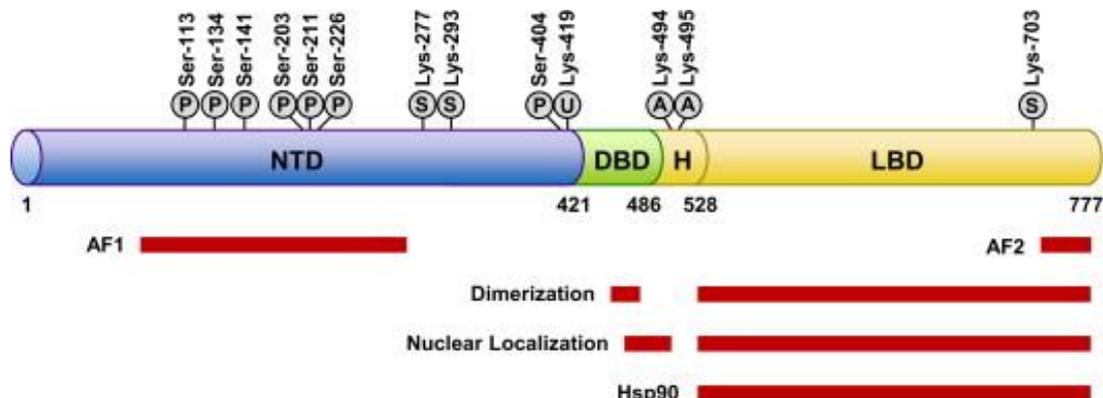


Figure 4 : Structure du récepteur aux glucocorticoïdes et sites de modifications post-traductionnelles.

(d'après (Oakley and Cidlowski 2013)). Sont représentés les domaines du GR et les régions du récepteur impliquées dans la transactivation (AF1 et AF2), la dimérisation, la localisation nucléaire et la liaison à Hsp90. Les résidus d'acides aminés modifiés par phosphorylation (P), sumoylation (S), ubiquitination (U) et acétylation (A) sont également représentés.

C. Isoformes

Chez l'homme, le gène codant pour le GR est composé de 9 exons. Le domaine NTD du GR est principalement codé par l'exon 2, le DBD par les exons 3 et 4, et le LBD par les exons 5 à 9. Malgré la présence d'un unique gène codant pour le GR, il existe de nombreuses isoformes du GR.

1. D'épissage

Le GR exprimé de manière prédominante dans les tissus humains est l'isoforme de taille entière GR α . Un épissage alternatif de l'ARN pré-messager du GR génère cinq isoformes distinctes, GR α , GR β , GR γ , GR-A et GR-P (Figure 5). Parmi celles-ci, les GR α et GR β sont les plus largement exprimées. Ces deux isoformes diffèrent par leur domaine C terminal et sont associées à des réponses distinctes aux GCs. Le GR α est l'isoforme « classique » du GR, elle est plus fortement exprimée que le GR β et conduit à la plupart des actions biologiques des GCs. L'isoforme GR β présente plusieurs propriétés différentes. En

effet, elle est principalement localisée dans le noyau, ne peut ni fixer d'agoniste des GCs, ni activer les gènes de réponse aux GCs. Cependant, lorsque le GR β est co-exprimé avec le GR α , il fonctionne comme un dominant négatif et agit comme un antagoniste de l'activité du GR α au niveau de la régulation de l'expression des gènes de réponse aux GCs. En effet, les mécanismes proposés pour cet antagonisme seraient une compétition au niveau de la liaison aux GRE, une compétition pour l'interaction avec les co-régulateurs de la transcription, ainsi que la formation d'hétérodimères inactifs GR α /GR β (Cruz-Topete and Cidlowski 2015, Oakley and Cidlowski 2013, Smith and Cidlowski 2010). Des études ont montré que l'augmentation du niveau d'expression du GR β pourrait être associée avec une résistance aux GCs dans des troubles inflammatoires (Lewis-Tuffin and Cidlowski 2006). Cependant, les mécanismes gouvernant les actions du GR β restent encore méconnus.

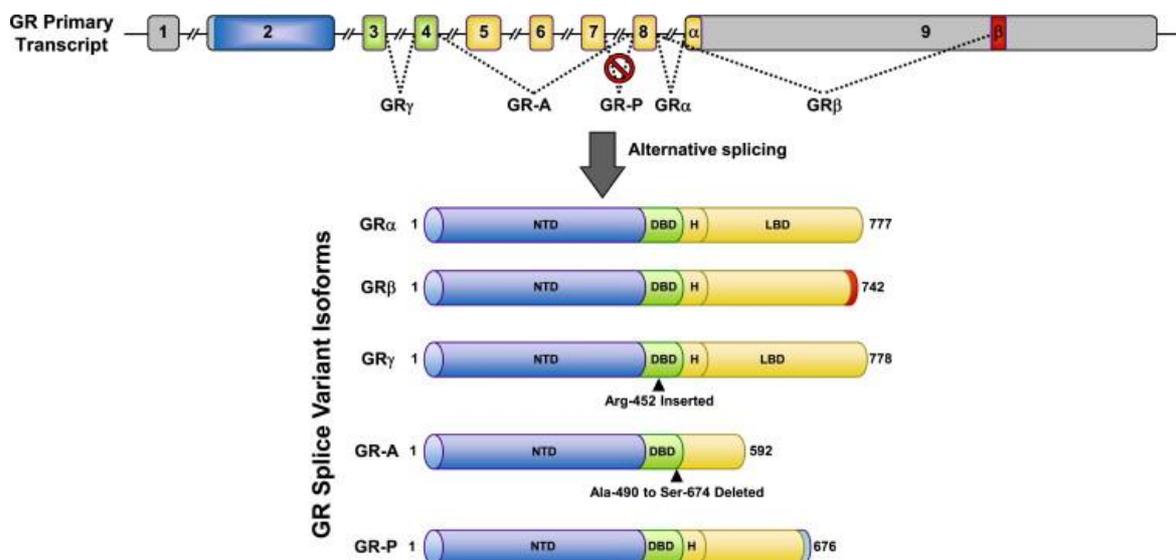


Figure 5 : Variants d'épissage du récepteur aux glucocorticoïdes.

(d'après (Oakley and Cidlowski 2013)). Le transcript primaire du GR est composé de 9 exons. L'exon 2 code pour le domaine NTD, les exons 3 et 4 codent pour le domaine DBD et les exons 5 à 9 codent pour la région charnière (H) et le domaine LBD. Le GR α résulte de l'épissage de l'exon 8 avec le début de l'exon 9. GR β , GR γ , GR-A et GR-P sont générés par les événements d'épissage alternatifs représentés.

Les isoformes GR γ , GR-A et GR-P sont les moins bien caractérisées et celles dont les rôles physiologiques sont les moins compris. Le variant d'épissage GR γ présente l'insertion de trois bases supplémentaires dans le domaine DBD résultant à l'insertion d'un résidu

arginine entre les deux structures en doigts de zinc, ce qui réduit sa capacité transcriptionnelle. Cette isoforme peut fixer les GCs et se lier à l'ADN de façon similaire au GR α . L'expression du GR γ est associée à une résistance aux GCs chez des patients atteints de carcinome du poumon à petites cellules, d'adénome corticotrope, et de leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant (Beger, *et al* 2003, Ray, *et al* 1996, Rivers, *et al* 1999). Il manque les exons 5 à 7 au variant d'épissage GR-A donnant un LBD tronqué dont l'activité de transactivation est manquante. Enfin, ce sont les exons 8 et 9 qui manquent à l'isoforme GR-P, donnant également un LBD tronqué ne permettant pas la fixation du GC (Oakley and Cidlowski 2013).

2. Traductionnelles

En plus de l'épissage alternatif, des isoformes supplémentaires sont produites à partir de sites alternatifs d'initiation de la traduction. En effet, huit codons AUG dérivés de l'exon 2 donnent lieu à huit sous-types d'isoformes avec des régions NTD de plus en plus courtes. Par exemple, la traduction de l'isoforme d'épissage GR α conduira à l'expression de huit isoformes traductionnelles GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 et GR α -D3 (Figure 6). L'ensemble des isoformes d'épissage GR β , GR γ , GR-A et GR-P possèdent le même nombre de sites d'initiation et donc peuvent présenter le même éventail d'isoformes traductionnelles (Oakley and Cidlowski 2013).

Les différentes isoformes traductionnelles du GR α ont une affinité pour les GCs ainsi qu'une capacité d'interaction avec les GREs après activation par le ligand, similaires. Cependant, ils montrent des différences pour d'autres propriétés. En effet, les isoformes GR α -A, GR α -B et GR α -C sont localisées au niveau du cytosol en absence d'hormone et transloquées au noyau après liaison du GC, alors que les isoformes GR α -D sont présentes constitutivement au noyau. Aussi, les études de Lu *et al.* et de Wu *et al.* en 2007 et 2013 montrent que chaque sous-types d'isoformes du GR α présentent des profils de régulation de gènes différents. En effet, l'expression des isoformes GR α -C dans les cellules U-2 OS, une lignée cellulaire d'ostéosarcome n'exprimant pas de GR endogène, augmente l'induction de mort par la Dexaméthasone (Dex) par rapport à l'expression des autres sous-types d'isoformes du GR α . Ceci est dû à la régulation sélective de l'induction de l'expression du Granzyme A et de la caspase 6 par le GR α -C (Lu, *et al* 2007). Les travaux de Wu *et al.* en 2013, réalisés dans la lignée de leucémie lymphoblastique T, Jurkat, résistante à la mort induite par les GCs dû à son faible niveau d'expression du GR, montrent également que l'expression du GR α -C permet d'induire plus efficacement la mort par la Dex par rapport aux

GR α , -A et -B. De plus, ils montrent que les cellules n'exprimant que le GR-D sont insensibles à cette induction de mort. L'expression du GR α -C permet l'inhibition de MYC et l'induction de Bim de manière plus efficace que les autres isoformes (Wu, *et al* 2013).

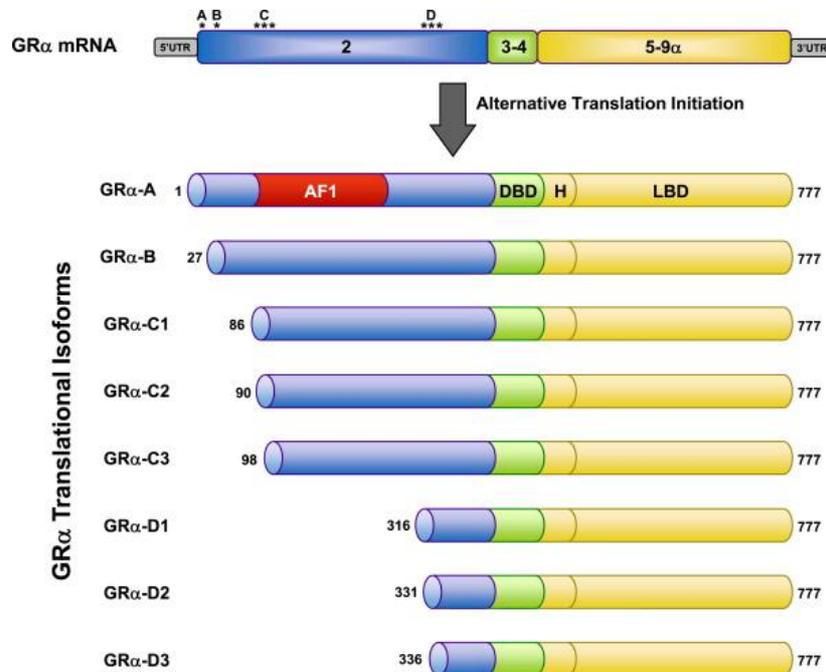


Figure 6 : Isoformes traductionnelles du récepteur aux glucocorticoïdes.

(d'après (Oakley and Cidlowski 2013)). L'initiation de la traduction à partir de 8 codons « start » AUG (indiqués par un astérisque) dans le seul ARNm GR α produit 8 isoformes du récepteur avec des domaines NTD de plus en plus courts. UTR : région non-traduite.

Si les isoformes GR α -A et GR α -B sont les plus abondantes au niveau protéique dans de nombreux types cellulaires, des études récentes ont montré que la composition en isoformes GR α dans une cellule ou un tissu donné peut varier en réponse à différentes conditions (Sinclair, *et al* 2012, Wu, *et al* 2013). Ces modifications d'expression d'isoformes du GR α pouvant aboutir à une hypersensibilité ou à une résistance aux GCs, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes cellulaires qui contrôlent l'expression de ces différentes isoformes de traduction.

D. Modifications post-traductionnelles

1. Phosphorylations

Chaque isoforme du GR issue des procédés d'épissage et de traduction alternatifs, est sujette à un éventail de PTMs qui vont moduler leur fonction et élargir le répertoire de sous-types de récepteurs disponibles lors de la réponse aux GCs (Figure 4). La première PTM identifiée et la plus étudiée est la phosphorylation du GR. Le GR α peut être phosphorylé par différentes kinases, comme MAPK, GSK-3 et cyclin-dependent kinase, sur au moins 7 résidus sérines (Ser-113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226 et Ser-404). Tous ces résidus sont situés dans le domaine NTD du récepteur. La plupart de ces sites présentes un état basal de faible phosphorylation et deviennent hyperphosphorylés après la liaison des GCs. La structure du GC fixé sur le GR peut influencer le motif et le niveau de phosphorylation. L'un des effets majeurs de la phosphorylation est le changement de l'activité transcriptionnelle du récepteur. Des études ont démontré que la transfection de mutants du GR dont la phosphorylation est déficiente, conduit à la modification de leur capacité à activer certains gènes de réponse aux GCs (Webster, *et al* 1997). Aussi, un défaut de phosphorylation de la Ser-211 pourrait contribuer à la résistance à la mort induite par les GCs développée par les cellules lymphoïdes malignes (Miller, *et al* 2007, Miller, *et al* 2005).

De plus, l'état de phosphorylation des sérines au sein du domaine AF-1 impacterait le recrutement des cofacteurs au niveau du promoteur du gène de réponse aux GCs. En effet, le recrutement du co-activateur MED14 par le GR α est augmenté par la phosphorylation dépendante du GC de la Ser-211 (Chen, *et al* 2008), alors que les interactions du GR α avec le co-activateur p300/CBP et la sous-unité p65 de NF- κ B sont diminuées par la phosphorylation de la Ser-404 (Galliher-Beckley, *et al* 2008).

Enfin, l'état de phosphorylation du GR α altère également d'autres propriétés du récepteur, comme sa stabilité qui est diminuée par certaines phosphorylations dépendante du GC, ou sa distribution cellulaire.

2. Ubiquitination

D'autres PTMs ont été montrées comme pouvant modifier la fonction du GR. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés qui une fois fixée à un résidu lysine spécifique, marque les protéines pour la dégradation par le protéasome. L'ubiquitination du

GR α au niveau du résidu lysine conservé, Lys-419, est montrée comme ciblant le récepteur pour son renouvellement par la protéasome (Wallace and Cidlowski 2001).

3. Sumoylation

La sumoylation correspond au processus par lequel des peptides SUMO (small ubiquitin-related modifier) sont fixés de manière covalente à des résidus lysines spécifiques (Lys-277, Lys-293, Lys-703) du récepteur. Cette sumoylation se déroule en absence de ligand et est augmentée par la fixation de GCs. En fonction du site de sumoylation, elle peut aboutir à l'augmentation ou la répression de l'activité transcriptionnelle du GR α , via l'altération du recrutement ou de l'activité des corégulateurs (Oakley and Cidlowski 2013).

4. Acétylation

Enfin, l'acétylation du GR α sur les résidus lysines 494 et 495 localisés dans la région charnière du récepteur, en réponse à la fixation de GCs, pourrait également moduler son activité transcriptionnelle (Oakley and Cidlowski 2013).

E. Polymorphismes

Il existe différents polymorphismes du gène codant le GR qui peuvent altérer la séquence d'acides aminés du récepteur et ainsi affecter sa fonction d'activateur ou de répresseur transcriptionnel.

Le polymorphisme du GR ER22/23EK est présent chez environ 3% de la population et donne lieu au changement d'une arginine par une lysine au sein du NTD. Ce polymorphisme du GR présente une activité transcriptionnelle réduite, et est donc associé à une insensibilité aux GCs.

Le polymorphisme N363S est présent chez environ 4% de la population et conduit à la substitution d'une asparagine en sérine au sein du NTD du GR. Contrairement au polymorphisme ER22/23EK, celui-ci augmente l'activité transcriptionnelle du GR et est associé à une hypersensibilité aux GCs (Oakley and Cidlowski 2013). Cependant, ce polymorphisme N363S n'a jamais été associé à un avantage thérapeutique notamment dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (Tissing, *et al* 2005b).

4) Apoptose induite par les GCs dans les cellules lymphoïdes

Les effets des GCs sur les lymphocytes sont largement étudiés depuis des années, ils comprennent l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la mort cellulaire programmée (apoptose) des thymocytes immatures, des cellules lymphocytaires pré-B, des lymphocytes T matures périphériques, et de plusieurs lignées cellulaires de leucémie (Planey and Litwack 2000). Cependant, même si la réponse aux GCs a largement été étudiée dans les cellules lymphoïdes, la grande majorité des études a été effectuée dans des cellules T.

Dans ce paragraphe, les données présentées ne seront pas exhaustives, mais donnerons un aperçu des travaux déjà réalisés et des effets des GCs sur les cellules lymphoïdes.

L'induction de ces mécanismes nécessite l'expression d'un GR fonctionnel et l'initiation du signal de transduction par la fixation du GC sur le récepteur. De nombreux gènes dont l'expression peut être augmenté ou diminué en réponse aux GCs ont été identifiés. C'est le cas de l'oncogène c-myc dont la répression par les GCs a été montrée dans les lymphocytes T et les cellules humaines pré-B 380 et 697 (Alnemri, *et al* 1992, Yuh and Thompson 1989). Ces études suggèrent que la diminution de l'expression de c-myc par les GCs pourrait être directement impliquée dans l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose des lymphocytes. Les gènes dont le niveau d'expression est augmenté en réponse aux GCs incluent les membres de la famille AP-1, c-jun et c-fos, la calmoduline, la β -galactoside binding protéine, la clusterine et des gènes codant pour des protéines de la famille Bcl-2.

A. Dans les thymocytes

Les GCs induisent l'apoptose des thymocytes via la synthèse de protéines dépendante du GR (Bruscoli, *et al* 2006, Cohen and Duke 1984). Certaines études ont montré que la voie mitochondriale de l'apoptose est impliquée dans la mort induite par les GCs dans les thymocytes, notamment via l'implication de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, Sentman *et al.* en 1991, ont démontré que la surexpression de Bcl-2, dans un modèle de souris transgéniques, protège les thymocytes immatures de la mort induite par les GCs. Aussi, l'étude de Grillot *et al.* en 1995 a mis en évidence, également via un modèle de souris transgénique, que l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L inhibe l'induction de mort par les GCs des thymocytes immatures (Grillot, *et al* 1995,

Sentman, *et al* 1991). Enfin, les travaux de Wang *et al.* en 1999 ont révélé que la voie de survie NF- κ B/c-myc est ciblée par les GCs dans les thymocytes immatures *in vivo*. En effet, ils ont mis en évidence que le traitement par la Dex induit l'expression d'I κ B α et d'I κ B β et diminue la liaison à l'ADN de NF- κ B (Wang, *et al* 1999).

B. Dans le développement des lymphocytes T

L'un des effets biologiques des GCs le plus prédominant sur les lymphocytes est l'induction d'apoptose. Notamment dans le thymus où les cellules doubles positives CD4⁺ CD8⁺ sont les plus sensibles. Le rôle des GCs naturels dans le développement des thymocytes a été suggéré pour la première fois par Jaffe en 1924, lorsqu'il a montré que l'ablation bilatérale des glandes surrénales conduisait à une hypertrophie du thymus (Jaffe 1924).

Lors du développement des thymocytes, la spécificité pour le ligand du récepteur de l'antigène des cellules T (TCR) détermine largement la vie ou la mort du thymocyte immature. Lors de la sélection positive, les thymocytes présentant des TCR dont l'avidité pour un complexe majeur d'histocompatibilité du soi est trop faible, ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent par « négligence », les thymocytes avec des TCR dont l'avidité pour un antigène du soi est trop forte meurent par apoptose lors de la sélection négative. Les thymocytes présentant des TCR avec une avidité intermédiaire survivent et se différencient en cellules T immunocompétentes matures (Ashwell, *et al* 1996).

Comment l'avidité du TCR peut être interprétée comme un signal de survie ou de mort n'est pas connu. Cependant, il a été proposé que les GCs interagissent avec le TCR via un « antagonisme mutuel » lors de la sélection des lymphocytes T. Ceci provenant du fait que la stimulation du TCR protège les cellules T de l'apoptose induite par les GCs, et réciproquement, les GCs préviennent la mort cellulaire induite par l'activation du TCR. Dans ce modèle d'antagonisme mutuel, les GCs agiraient comme un rhéostat en modulant le seuil de l'apoptose induite par l'activation du TCR lors de la sélection des thymocytes (Smith and Cidlowski 2010).

Aussi, il a été montré que l'apoptose des cellules T induite par les GCs est régulée par l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui varie au cours de la sélection des lymphocytes T, et que le profil d'expression de Bcl-2 est responsable de la susceptibilité des cellules à l'apoptose induite par les GCs (Nakayama, *et al* 1993, Siegel, *et al* 1992).

C. Dans les hémopathies malignes

Le potentiel thérapeutique des GCs synthétiques dans le traitement des hémopathies malignes a été suggéré pour la première fois en 1943, lorsque l'administration d'hydroxycorticoesterone a induit l'apoptose de lymphocytes malins chez la souris (Dougherty and White 1943). Suite à cette observation, les GCs synthétiques ont été ajoutés aux traitements des leucémies et des lymphoblastomes, enfin de nos jours, les GCs ont une place majeure dans le traitement de toutes les hémopathies malignes (Smith and Cidlowski 2010).

5) Mécanismes induisant l'apoptose par les GCs

Dans tous les types cellulaires étudiés, les GCs semblent agir par la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, les GCs peuvent engendrer la mort cellulaire par l'induction de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bim, Bid et Bad (Lu, *et al* 2007, Wang, *et al* 2003) ou par la répression de membres anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-x_L (Casale, *et al* 2003, Lu, *et al* 2007, Rogatsky, *et al* 1999). La mort induite par les GCs est compromise dans les thymocytes provenant de souris déficientes pour la protéine pro-apoptotique Apaf1 ou déficientes pour la caspase 9 (Kuida, *et al* 1998, Yoshida, *et al* 1998). Enfin, les thymocytes de souris présentant une double déficience pour les effecteurs Bak et Bax sont résistants à l'apoptose induite par les GCs (Rathmell, *et al* 2002).

Aussi, des études ont suggéré l'implication de la down-régulation de c-myc dans la mort induite par les GCs, cependant l'étude d'Ausserlechner *et al.* en 2004, a montré dans des cellules de leucémies lymphoblastiques, que la down-régulation de c-myc et de la cycline D3 est nécessaire pour l'arrêt du cycle en phase G1, mais n'est pas requise pour l'induction de mort par les GCs (Ausserlechner, *et al* 2004).

Enfin, la participation des caspases effectrices 3, 6 et 7 dans l'apoptose induite par les GCs a bien été définie et différentes études ont impliqué la caspase 3 comme la caspase effectrice clé (McColl, *et al* 1998, Robertson, *et al* 1997). Cependant, d'autres études suggèrent que la caspase 3 n'est pas nécessairement requise pour induire la mort cellulaire par les GCs, car il y aurait une redondance au niveau des caspases effectrices dans la réponse aux GCs (Kuida, *et al* 1996, Miyashita, *et al* 1998).

Les mécanismes impliqués dans la mort induite par les GCs sont donc complexes et pas encore totalement élucidé. Cependant, la voie mitochondriale de l'apoptose semble être un processus primordial.

6) Le Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)

Le gène codant pour la protéine Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) a été identifié comme étant l'un des gènes les plus fortement régulés par les GCs. Il a ensuite été démontré que GILZ présente un rôle de médiateur des effets anti-inflammatoires des GCs.

A. Structure et localisation

Le Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) a été identifié en 1997 lors de l'étude des gènes induits par les GCs dans des thymocytes murins (D'Adamio, *et al* 1997). Du fait de sa forte homologie avec d'autres membres de la famille TSC22 (TNF- β -stimulated clone 22), le gène codant pour GILZ a été nommé TSC22D3-2. Il a été décrit chez l'homme en 2001 par Cannarile *et al.* (Cannarile, *et al* 2001). Il est localisé sur le chromosome X et code pour 4 isoformes, dont la plus connue et décrite, est la protéine GILZ de 135aa (17kDa). Plus récemment, une isoforme longue de GILZ a été identifiée, la protéine L-GILZ de 234aa (28kDa) (Bruscoli, *et al* 2010, Soundararajan, *et al* 2007).

La protéine GILZ est composée de trois domaines : le domaine N-terminal qui contient une TSC-box, le domaine Leucine zipper (LZ) et le domaine C-terminal qui est une région riche en proline et en acide glutamique (domaine PRR) (Figure 7) (Ayroldi and Riccardi 2009). Aussi, GILZ présente différents sites potentiels de phosphorylation et de glycosylation (Cannarile, *et al* 2001). GILZ est exprimé de manière constitutive dans différents tissus humains à l'exception du foie et du pancréas. Il est fortement transcrit dans le cerveau, les poumons, la rate et les muscles, alors que son expression est plus faible dans le cœur et les reins. L'étude de son expression par les cellules normales hématopoïétiques a également montré que GILZ est exprimé par les cellules de la moelle osseuse, les monocytes, les granulocytes, les lymphocytes matures T et B ainsi que par les cellules souches CD34⁺ qui présentent un niveau de GILZ supérieur à celui de l'ensemble des lymphocytes du sang périphérique ou des cellules de la moelle osseuse (Cannarile, *et al* 2001).

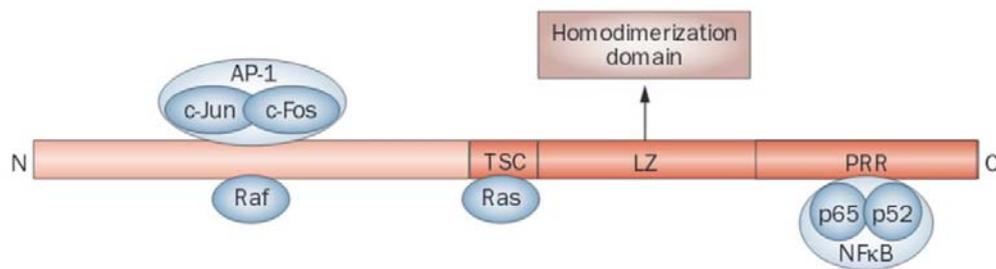


Figure 7 : Structure et sites d'interaction de GILZ.

(d'après (Beaulieu and Morand 2011)). La protéine GILZ est constituée de trois domaines majeurs : le domaine N-terminal, le domaine Leucine-zipper (LZ) et le domaine C-terminal. Une région riche en proline (PRR) se trouve au niveau du domaine C-terminal. TSC : tuberous sclerosis complex.

B. Régulation de l'expression de GILZ

Le promoteur du gène codant pour GILZ comprend 6 GREs, des sites de liaison de STAT6, de NFAT (nuclear factor of activated T cell), d'Octamer 1, de c-myc, de CREB, des FHREs (Forkhead response element), et des séquences de réponse aux œstrogènes (Asselin-Labat, *et al* 2004). L'expression de GILZ est rapidement induite par les GCs via une régulation transcriptionnelle impliquant l'interaction du GR avec les séquences GREs du promoteur du gène. Indépendamment des GCs, GILZ peut également être induit par l'IL-10, l'IL-15, l'érythropoïétine, le SCF (stem cell factor), le TGF- β , ou encore la privation d'IL-2. Il a également été montré que l'expression de GILZ peut être diminuée lors de l'activation des lymphocytes T par un anti-CD3, lors de l'activation des lymphocytes B par l'activation du BCR, et par des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales des voies aériennes (Ayroldi and Riccardi 2009).

C. Cibles moléculaires de GILZ

GILZ a initialement été décrit comme étant un facteur de transcription (D'Adamio, *et al* 1997), cependant, cette protéine ne présente pas de domaine de fixation à l'ADN. En revanche, son domaine LZ prédit son homodimérisation ou son hétérodimérisation avec d'autres protéines à domaine LZ. Ayroldi *et al.*, en 2001 ont démontré que GILZ peut interagir avec NF- κ B et ainsi induire sa transrépression, en inhibant sa translocation au noyau, sa liaison à l'ADN, et la transactivation de ses gènes cibles. Les études de ce même laboratoire ont également montré que GILZ peut se lier à Raf et Ras, inhibant ainsi dans un

cas la voie ERK et dans l'autre cas les voies ERK et Akt (Figure 7) (Ayroldi, *et al* 2001, Ayroldi, *et al* 2007, Ayroldi, *et al* 2002). De plus, une étude par immunoprécipitation de chromatine a mis en évidence que GILZ pouvait avoir une fonction de répresseur de la transcription en se liant à un tandem de répétition du site de fixation CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) dans le promoteur du gène codant pour PPAR- γ 2 (peroxisome-proliferator-activated receptor- γ 2) (Ayroldi and Riccardi 2009, Shi, *et al* 2003). Enfin, GILZ a été montré comme pouvant interagir avec les sous-unités c-Fos et c-Jun, et ainsi inhiber la fixation sur l'ADN du facteur de transcription qu'elles composent, AP-1 (Mittelstadt and Ashwell 2001). Cependant, les travaux de Ayroldi *et al.* en 2001 n'ont pas permis de démontrer l'interaction entre c-Fos et GILZ.

D. Rôle de GILZ dans la réponse aux GCs

1. Thymocytes / Lymphocytes T

Dans le système immunitaire, GILZ est fortement augmenté par les GCs, notamment dans les thymocytes, cellules dans lesquelles il a été identifié par D'Adamio *et al.* en 1997. L'étude de l'implication de GILZ dans la régulation de la survie des thymocytes a conduit Delfino *et al.* en 2004, à générer des souris transgéniques sur-exprimant GILZ dans le lignage cellulaire T. Cette étude a permis de montrer que la surexpression de GILZ participe à la régulation de l'apoptose des thymocytes via la diminution de l'expression de Bcl-x_L et à l'augmentation de l'activation des caspases 8 et 3, suggérant que GILZ présente des effets similaires à ceux des GCs (Delfino, *et al* 2004).

De façon similaire aux GCs, il a également été montré un rôle anti-apoptotique de GILZ lors de l'activation du TCR des lymphocytes T. En effet, GILZ inhibe l'apoptose induite par l'anticorps anti-CD3 dans les cellules T via une interaction directe avec AP-1, mais inhibe également la mort de ces cellules induite par la privation d'IL-2 via la régulation négative de l'activité de FoxO3 et de l'expression de Bim (Asselin-Labat, *et al* 2005, Asselin-Labat, *et al* 2004, Mittelstadt and Ashwell 2001).

Enfin, Ayroldi *et al.* en 2007 ont montré que l'extinction de GILZ par ARN interférence, dans la lignée cellulaire d'hybridome T, 3DO, inhibe l'effet antiprolifératif de la Dex qui est provoqué par l'interaction de GILZ et de Ras (Ayroldi, *et al* 2007).

2. Cellules dendritiques, monocytes et macrophages

GILZ est exprimé de manière constitutive par les macrophages et monocytes humains, et son expression est induite par les GCs. Dans ces cellules GILZ mime les effets des GCs (Ayroldi and Riccardi 2009). Aussi, la surexpression de GILZ par des cellules dendritiques induit la génération de cellules T régulatrices qui inhibent la réponse T spécifique de l'antigène, et ainsi contribue à l'immunosuppression par les GCs (Hamdi, *et al* 2007).

3. Cellules souches mésenchymateuses et progéniteurs

Les GCs sont impliqués, selon leur concentration, dans la différenciation des progéniteurs des cellules souches mésenchymateuses, notamment en adipocytes ou en ostéoblastes. Les GCs stimulent aussi bien la transcription de C/EBP- δ et de GILZ qui présentent des fonctions opposées (Ayroldi and Riccardi 2009). En effet, C/EBP- δ induit l'expression de PPAR- γ 2 et la différenciation en adipocytes, alors que GILZ inhibe la transcription de PPAR- γ 2 induite par C/EBP- δ en se fixant sur les sites de C/EBP dans le promoteur de PPAR- γ 2 ce qui s'oppose à la différenciation des cellules en adipocytes (Shi, *et al* 2003).

4. Dans les cellules malignes

Malgré la large utilisation des GCs dans le traitement des cancers, l'implication de GILZ dans la réponse aux GCs des cellules malignes n'a été que très rarement étudiée.

GILZ a été montré comme exprimé en réponse aux GCs dans différents modèles malins, notamment par les cellules d'ostéosarcomes, U2OS, par des cellules de MM, des cellules de LMC et par des cellules de LAL pédiatriques (Bachmann, *et al* 2007, Blind and Garabedian 2008, Chen, *et al* 2006, Grugan, *et al* 2008, Joha, *et al* 2012), mais également de manière constitutive par des cellules de cancers épithéliaux ovariens invasifs (Redjimi, *et al* 2009).

En 2012, une étude a été réalisée dans des cellules de LMC, les lignées cellulaires BCR-ABL+. Elle montre qu'au cours de l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK), les cellules expriment de moins en moins de GILZ constitutif. Cependant, ces cellules restent sensibles aux GCs et GILZ est toujours inductible par le traitement par la Dex. Cette étude montre également que l'augmentation de l'expression de GILZ par transfection ou par traitement par les GCs permet de surmonter la résistance aux ITK via l'interaction de GILZ avec mTORC2, inhibant ainsi son activité et donc la

phosphorylation d'Akt, et permettant l'activation de la transcription de Bim par FoxO3a (Joha, *et al* 2012).

7) La résistance aux GCs

La large utilisation des GCs dans de nombreuses pathologies inflammatoires ou malignes a mis en évidence l'existence non pas d'une mais de plusieurs résistances aux GCs dont les mécanismes sont loin d'être tous élucidés.

A. L'altération de l'expression des isoformes du GR

Plusieurs études évoquent le profil d'expression des isoformes du GR comme pouvant être responsable de la variation de la réponse aux GCs. En effet, l'augmentation de l'expression de l'isoforme dominante négative GR β a été montrée dans des cellules T de LAL, CEM, dans des cellules primaires provenant de patients atteints de LAL et des cellules de LLC résistantes aux GCs (Haarman, *et al* 2004, Shahidi, *et al* 1999) Aussi, Koga *et al.*, en 2005 ont montré une corrélation inverse entre l'induction d'apoptose par la prédnisone et le niveau d'expression du GR β dans des cellules de LAL pédiatriques (Koga, *et al* 2005). Cependant, cette corrélation n'a pas été retrouvée dans des cellules primaires provenant de LAL par les travaux de Haarman *et al.*, en 2004 et de Tissing *et al.*, en 2005 (Haarman, *et al* 2004, Tissing, *et al* 2005a).

De plus, une étude sur cellules primaires et après rechute de LAL a montré qu'un niveau plus élevé du GR γ était associé à une résistance aux GCs (Haarman, *et al* 2004). D'autres études ont identifié l'augmentation des isoformes GR-P et GR-A dans la résistance aux GCs de cellules malignes (de Lange, *et al* 2001, Krett, *et al* 1995, Moalli, *et al* 1993). Cependant, l'étude plus récente de Tissing *et al.* sur une cohorte d'échantillons provenant de 54 enfants atteints de LAL contredit ces hypothèses. En effet, elle indique que les niveaux d'expression relatifs des isoformes GR α , GR β et GR-P ne sont pas associés à la résistance à la prédnisolone, contrairement à la faible expression du GR dans sa globalité (Tissing, *et al* 2005a).

Enfin, les travaux effectués sur les isoformes traductionnelles ont permis de mettre en évidence que la surexpression du GR α -D, qui est l'isoforme la moins active sur le plan transcriptionnel, peut induire une résistance à l'apoptose induite par les GCs dans les cellules d'ostéosarcome ainsi que dans les cellules T de LLC, Jurkat (Lu, *et al* 2007, Wu, *et al* 2013).

B. L'altération de l'expression du GR

Plusieurs études ont montré une corrélation entre le faible niveau d'expression du GR et la faible réponse au traitement chez des patients atteints de LAL (Bloomfield, *et al* 1981, Pui and Costlow 1986). De plus, dans certains types cellulaires, le traitement par les GCs peut conduire à la diminution de l'expression du GR aussi bien en ARNm qu'en protéine. Le mécanisme impliqué dans ce phénomène pourrait être une déstabilisation de l'ARNm par la présence d'un motif AUUUA au niveau de la région 3'-UTR de l'ARN messager codant le GR (Schaaf and Cidlowski 2002). Aussi, l'exposition prolongée aux GCs peut aboutir à l'émergence de cellules résistantes aux GCs présentant une faible expression basale du GR (Smith and Cidlowski 2010, Zilberman, *et al* 2004).

Enfin, des xénogreffes de LAL résistantes aux GCs mais qui expriment le GR aussi fortement que des xénogreffes sensibles, ont été décrites par Bachmann *et al.*, en 2007, ce qui suggère d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance aux GCs (Bachmann, *et al* 2007).

C. Les mutations du GR

De nombreuses mutations du GR α ont été identifiées, notamment à partir de lignées résistantes dérivées en laboratoire ou de cas de résistance familiale aux GCs, comme présenté dans le tableau 7.

Lignée cellulaire	Mutations	Domaine du GR impacté	Conséquences sur l'activité du GR	Références
CEM T LAL	L753F	LDB	Liaison du ligand ↓ Transactivation ↓	(Hillmann, <i>et al</i> 2000)
6TG1.1 T LAL	L753F	LDB	Liaison du ligand ↓ Transactivation ↓	(Liu, <i>et al</i> 1995, Powers, <i>et al</i> 1993)
Jurkat T LAL	R477H	DBD	Liaison à l'ADN ↓ Transactivation ↓	(Riml, <i>et al</i> 2004)
Résistance aux GCs familiale (patients)	I559N, V571A, D641V, G679S, V729I, F737L, I747M, L773P	LBD	Liaison du ligand ↓ Transactivation ↓	(Charmandari, <i>et al</i> 2008)

Tableau 7 : Mutations du récepteur aux glucocorticoïdes.

Malgré l'identification de cette liste non-exhaustive de mutations, leur étude ne permet pas d'associer la résistance aux GCs à un certain polymorphisme du GR (Tissing, *et al* 2005b).

D. Expression aberrante de molécules de la famille Bcl-2

Dans les lymphomes et les leucémies, une des causes majeures de la résistance aux GCs est l'expression aberrante d'une molécule anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (Almawi, *et al* 2004, Kfir, *et al* 2007, Sionov, *et al* 2006). En effet, le gène *BCL2* est affecté par la translocation t(14;18) présente dans environ 80% des cellules de lymphome B (Cleary, *et al* 1986, Tsujimoto and Croce 1986). La surexpression de Bcl-2 confère une résistance vis-à-vis de l'apoptose induite par les GCs en prévenant la perte du potentiel de membrane mitochondriale et le relargage de cytochrome c et d'Apaf-1 en réponse aux GCs (Kfir, *et al* 2007, Susin, *et al* 1999).

De plus, les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 ont été montrés comme pouvant altérer l'efficacité de l'induction de l'apoptose par les GCs (Kfir, *et al* 2007, Opferman, *et al* 2003, Wei, *et al* 2006). Cependant, la détermination de leur implication dans la résistance aux GCs nécessite de plus amples études.

E. Défaut de l'induction de Bim

Enfin, il est bien établi que l'induction de l'expression de Bim est une étape importante dans la mort induite par les GCs (Schmidt, *et al* 2006, Wang, *et al* 2003). Aussi, l'étude de Bachmann *et al.* en 2007 a permis de montrer que malgré une forte expression du GR et une induction de GILZ, des xénogreffes de LAL résistantes aux GCs présentaient un défaut d'induction de Bim en réponse au traitement, indiquant que le mécanisme de résistance impliqué se situe en aval de la transactivation (Bachmann, *et al* 2007).

III. L'APOPTOSE

En 1972, le terme « apoptose » est introduit pour décrire un processus physiologique de mort cellulaire observé dans de nombreux tissus, dont les caractéristiques morphologiques sont distinctes de celles observées lors du processus de mort par nécrose (Kerr, *et al* 1972). Lors de ce processus d'apoptose, les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal de mort. Cette mort cellulaire programmée et régulée permet le développement et l'homéostasie de tout organisme pluricellulaire grâce à l'équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire, en permettant l'élimination des cellules anormales, endommagées ou surnuméraires. L'altération du processus d'apoptose est une caractéristique commune des cellules tumorales, promouvant ainsi leur survie et la résistance aux traitements (Hanahan and Weinberg 2000).

1) Les caractéristiques spécifiques de l'apoptose

L'apoptose, en opposition à la nécrose, est un phénomène actif, organisé, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications biochimiques, morphologiques et structurales aboutissant à sa destruction complète. La mort cellulaire par apoptose se caractérise par une condensation de la chromatine, puis une fragmentation nucléaire, suivi par la formation des corps apoptotiques, entourés de membranes plasmiques et contenant des organelles cytoplasmiques ou des fragments nucléaires. Enfin, les corps apoptotiques sont phagocytés (Kerr, *et al* 1972) (Figure 8).

A la suite de la réception des signaux de mort, les cellules engagées dans le processus apoptotique présentent des caractéristiques morphologiques particulières. En effet, au niveau de la mitochondrie, on observe une disparition du potentiel membranaire et un gonflement de la matrice. Ce gonflement est suivi d'une rupture de la membrane externe de la mitochondrie par un mécanisme principal impliquant les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou par un mécanisme impliquant l'induction d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale. Ceci a pour conséquence de libérer dans le cytoplasme des facteurs apoptogènes, comme le cytochrome c, qui vont réguler l'activité protéolytique des effecteurs finaux que sont les caspases (Orrenius, *et al* 2015). Au niveau nucléaire, on observe une condensation de la chromatine suivie par le clivage de l'ADN qui se fait d'une part, via l'activation de DNAses telles que les déoxyribonucléases (activées par les caspases), et d'autre part, via l'endonucléase G (Wyllie, *et al* 1980). Enfin, au niveau de la cellule entière,

l'intégrité de la membrane plasmique est conservée durant tout le processus apoptotique. Cependant, celle-ci subit des modifications biochimiques comme l'externalisation des phosphatidylsérines qui sont des phospholipides anioniques du feuillet interne de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines ainsi présentées à la surface membranaire sont reconnues par les macrophages conduisant à l'élimination des cellules par phagocytose ce qui assure une réponse non-inflammatoire du processus apoptotique (Fadok, *et al* 1998).

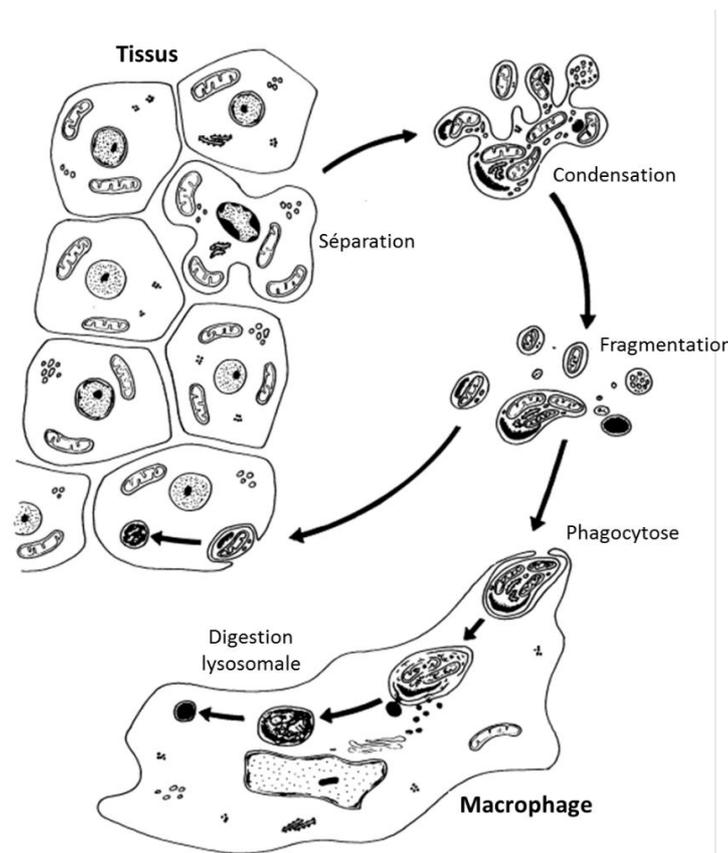


Figure 8 : Illustration des caractéristiques morphologiques de l'apoptose.
(d'après (Kerr, et al 1972)).

L'apoptose se distingue par ses caractéristiques morphologiques des autres principaux modes de mort cellulaire que sont la nécrose, l'autophagie et la catastrophe mitotique (Galluzzi, *et al* 2007).

La nécrose est la principale forme de mort d'une cellule. Elle a longtemps été opposée à l'apoptose car considérée comme étant un processus désorganisé et non programmé. Il est désormais établi que la nécrose peut être régulée par des voies moléculaires déterminées, donnant à cette mort par « nécrose programmée » le nom de nécroptose. Morphologiquement,

la nécrose se caractérise par un gain de volume cellulaire dû à l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme qui conduit à terme à la rupture de la membrane cytoplasmique entraînant la libération des composants cellulaires dans le milieu extracellulaire. Ce processus fait suite à des traumatismes importants (ischémie, choc thermique, lésion) subis par la cellule et est caractérisé par une réponse inflammatoire locale (Galluzzi, *et al* 2007, Linkermann and Green 2014).

Contrairement à l'apoptose qui est un processus rapide, l'autophagie est un phénomène lent, spatialement restreint au cours duquel des parties du cytoplasme sont séquestrées dans des vacuoles à double membranes appelées « autophagosomes » qui fusionnent ensuite avec le lysosome. Les protéines à longue durée de vie et les organites cellulaires y seront donc digérés par des hydrolases lysosomales (Galluzzi, *et al* 2007). L'autophagie est en premier lieu un mécanisme de survie et de défense cellulaire face au stress, par contrôle et élimination des protéines et structures obsolètes. Il faut noter que l'autophagie joue un rôle important dans des cellules dont l'apoptose est déficiente (Levine and Yuan 2005).

Enfin, un autre cas de mort cellulaire est la catastrophe mitotique qui se produit au cours ou peu de temps après une mitose aberrante. Morphologiquement distincte de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie, la catastrophe mitotique s'accompagne de micro-nucléation et de multi-nucléation qui se produisent avant la mort cellulaire. Ce processus résulte de l'association d'anomalies au niveau des points de contrôles du cycle cellulaire et de dommages cellulaires qui activent les voies d'autodestruction, ce qui conduit finalement à la disparition cellulaire (Castedo, *et al* 2004).

2) Les effecteurs de l'apoptose : les caspases

Quelle que soit la voie d'activation de l'apoptose, la conséquence commune est l'activation des caspases qui sont les effecteurs de la mort cellulaire (Degterev, *et al* 2003). Le rôle central des caspases au cours de l'apoptose a été mis en évidence par de nombreuses études réalisées sur des modèles de nématodes, de souris et également chez l'homme (Li and Yuan 2008). Les caspases sont des enzymes protéolytiques appartenant à la famille des cystéines protéases. Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu aspartate. Leur nom de « caspase » vient donc de cette spécificité pour « cystein aspartate protease » (Alnemri, *et al* 1996). Chez l'homme, ces caspases sont au nombre de 13 : caspases 1 à 10, caspases 12, 14 et 16 (Shalini, *et al* 2015).

Les caspases sont principalement localisées au niveau du cytoplasme, de la mitochondrie et à la surface du réticulum endoplasmique. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (ou pro-formes) constitués d'un pro-domaine en position N-terminale, d'une grande sous-unité de 17 à 21 kDa portant le site catalytique à résidu cystéine dans un motif consensus (QACxG) et d'une petite sous-unité de 10 à 14 kDa en position C-terminale (Figure 9).

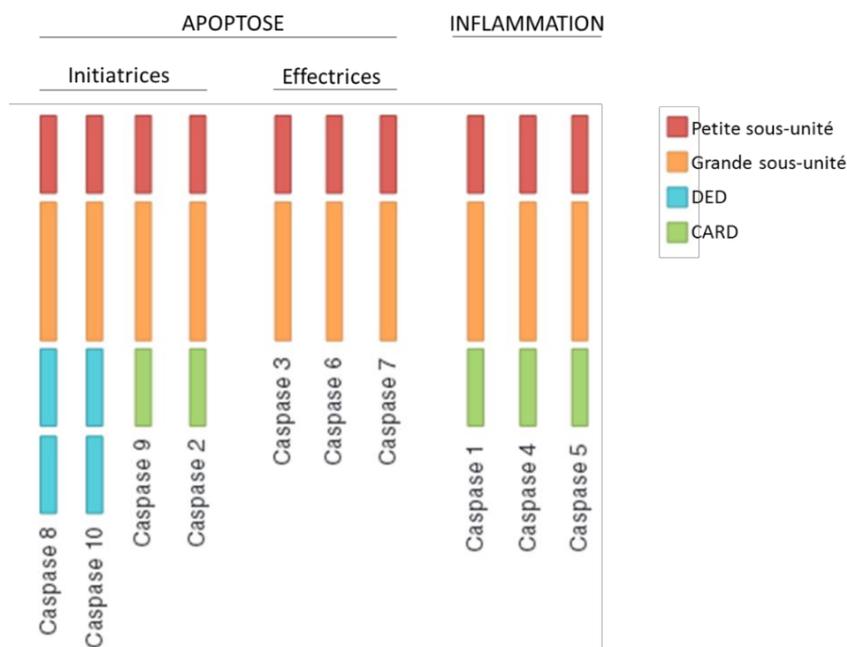


Figure 9 : Structure et classification des caspases.

(d'après (McIlwain, et al 2013)). DED : Death Effector Domain ; CARD : Caspase Activation and Recruiting Domain.

Sur un plan fonctionnel, on peut distinguer trois groupes de caspases (McIlwain, *et al* 2013) (Figure 9).

- Les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) sont caractérisées par la présence d'un long pro-domaine au sein duquel se trouvent des motifs d'interactions protéine-protéine DED (Death Effector Domain) ou CARD (Caspase Activation and Recruiting Domain). Ces motifs permettent le recrutement des caspases initiatrices au sein des complexes multi-protéiques induisant leur activation.
- Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) sont quant à elles activées principalement par les caspases initiatrices. Elles ont un pro-domaine plus court que les caspases initiatrices et ne possèdent pas de domaine de recrutement. Les caspases effectrices

peuvent également activer des caspases en amont grâce à une boucle d'amplification. La caspase 3 est la caspase la plus en aval de la cascade d'activation, elle représente un point de non-retour dans le processus apoptotique (Chang and Yang 2000). Les caspases effectrices orchestrent la destruction de diverses structures cellulaires par clivage de substrats spécifiques. En effet, on peut citer l'exemple de la fragmentation nucléaire effectuée après le clivage d'ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase), l'inhibiteur de l'endonucléase CAD (Caspase Activated DNase) permettant à cette dernière de cliver l'ADN en fragments oligomériques caractéristiques (Nagata 2000).

- On note que les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 constituent un sous-groupe de caspases initiatrices impliquées dans l'inflammation.
- Enfin, le rôle des caspases 14 et 16 n'est pas encore bien défini (Shalini, *et al* 2015).

La réponse aux signaux de mort induit l'activation des caspases en faisant intervenir deux clivages successifs aux niveaux de sites caractérisés par la présence de plusieurs résidus aspartate entre la petite et la grande sous-unité mais également entre la grande sous-unité et le pro-domaine. Ces clivages permettent la libération du pro-domaine et l'association des deux sous-unités qui forment ainsi le site actif de l'enzyme. Enfin, la caspase active est un tétramère constitué de deux petites et de deux grandes sous-unités (Figure 10) (Chang and Yang 2000).

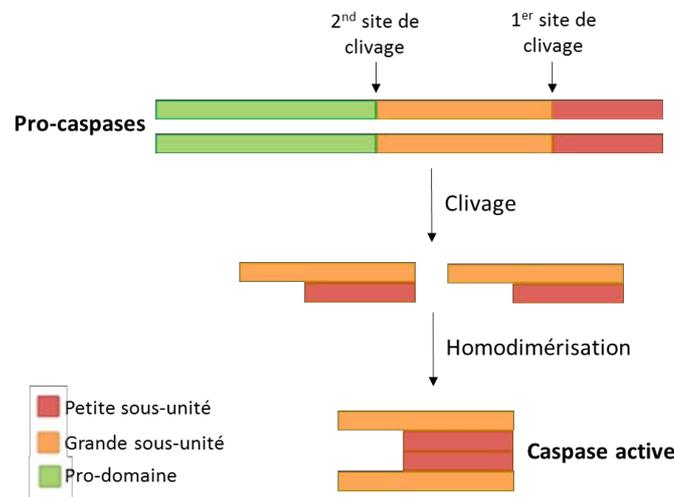


Figure 10 : Mécanisme d'activation d'une caspase.
(d'après (Chang and Yang 2000)).

3) Les différentes voies d'activation de l'apoptose

L'induction de la cascade d'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire peut se faire via deux principales voies : la voie extrinsèque impliquant des récepteurs de mort ou la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie (Fulda and Vucic 2012) (Figure 11).

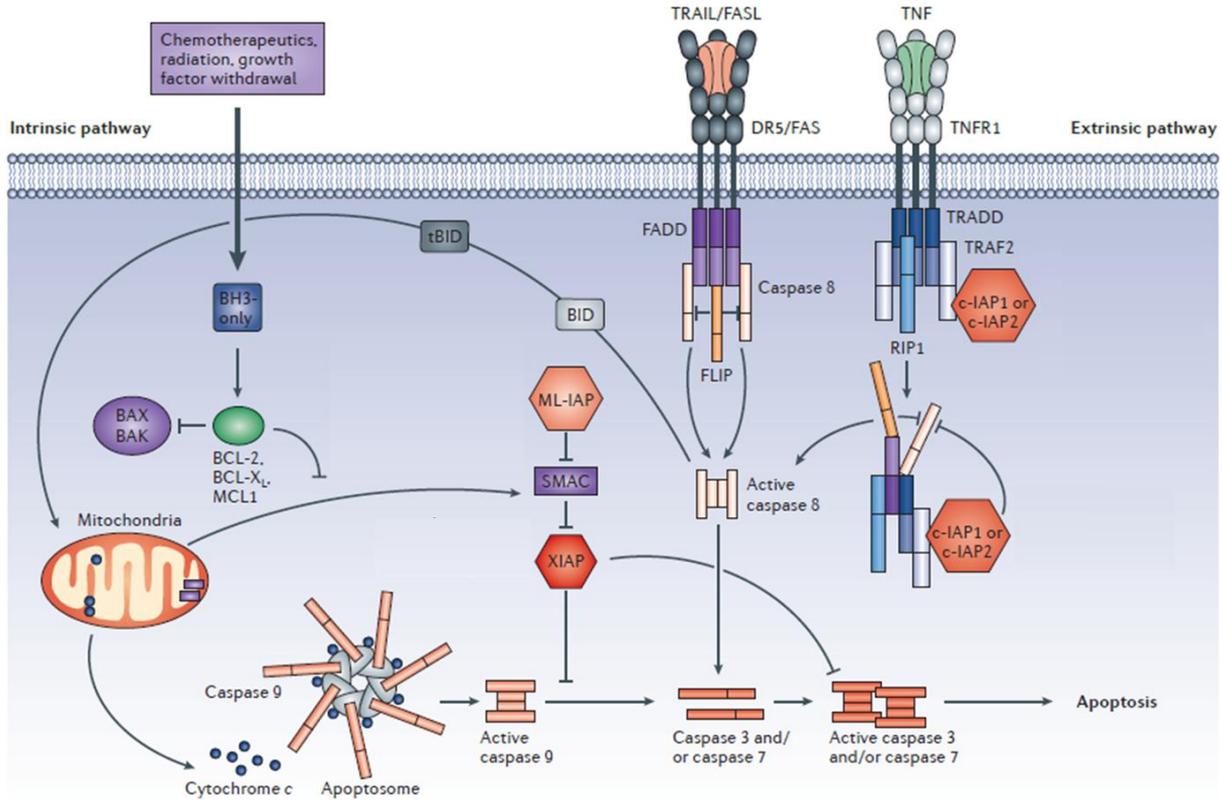


Figure 11 : Voies d'activation de l'apoptose.

(d'après (Fulda and Vucic 2012)). L'activation de la voie extrinsèque se fait par la fixation sur les récepteurs de mort (DR5 pour Death Receptor 5 (TRAIL-R2) ou FAS) de leurs ligands (TRAIL et FASL). Ceci induit le recrutement de complexes protéiques (FADD, TRADD) activant la caspase 8 puis les caspases effectrices 3 et 7. La voie intrinsèque est engagée par différents signaux de mort (i.e chimiothérapie, irradiation, baisse en facteur de croissance...) qui activent les protéines pro-apoptotiques BH3-only, ce qui permet ensuite l'activation de Bak et Bax, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome c. Ce dernier va induire l'activation des caspases et la mort cellulaire par apoptose. Le clivage de Bid en t-Bid peut également activer la voie intrinsèque. Celle-ci peut être inhibée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 alors que les protéines inhibant l'apoptose (IAP) inhibent principalement la voie extrinsèque.

A. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose désigne le déclenchement du programme apoptotique par l'activation des récepteurs de mort. Ces récepteurs appartiennent à la super famille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF), qui comprend une trentaine de membres impliqués dans des fonctions cellulaires différentes comme la mort cellulaire, l'immunité et la différenciation (Ashkenazi 2002).

La famille des récepteurs du TNF se divise en trois sous-groupes de récepteurs en fonction de la structure de leur partie cytoplasmique et des voies de signalisations induites (Dempsey, *et al* 2003). Seuls les récepteurs du premier groupe peuvent induire un signal de mort car ils possèdent un domaine cytoplasmique appelé « Death Domain », impliqué dans la transmission du signal de mort de la membrane de la cellule aux voies de signalisations intracellulaires. Il s'agit des récepteurs Fas (Apo-1/CD95), TNF receptor-1 (TNFR1), TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor-1 (TRAIL-R1) et TRAIL-R2, qui sont activés par l'interaction avec leur ligand respectif FasL, TNF- α et lymphotoxine- α , et TRAIL.

Le modèle classique de la voie extrinsèque est celui du couple Fas/FasL. La liaison de FasL sur son récepteur induit le changement de conformation de celui-ci ainsi que sa polymérisation, conduisant au rapprochement de trois « Death Domain ». Les molécules adaptatrices FADD (Fas-associated Death Domain) ou TRADD (TNF-associated Death Domain) sont recrutées au niveau de la partie intracellulaire du récepteur. Ces molécules adaptatrices vont, à leur tour, recruter la pro-caspase 8 ce qui forme le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel, *et al* 1995). Ce complexe induit l'oligomérisation et l'activation par auto-clivage de la caspase 8 qui va ensuite activer les caspases effectrices 3 et 7. Cependant, la caspase 8 peut également provoquer l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose via le clivage de la protéine Bid (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) (Danial and Korsmeyer 2004) (Figure 11).

B. La voie intrinsèque ou mitochondriale

La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale. Elle est activée en réponse à des signaux de mort comme des dommages à l'ADN, la privation de facteurs de croissance, l'activation d'oncogène, les rayonnements ionisants, les chimiothérapies...etc. L'engagement dans cette voie de l'apoptose est finement régulé au niveau de la mitochondrie par les interactions entre les membres de la famille Bcl-2. Cette voie conduit à un point de

non-retour du déclenchement de l'apoptose qui est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Kroemer, *et al* 2007). Cette perméabilisation nécessite l'activation et la polymérisation de Bax et Bak, deux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, indispensables à cette étape décisive de l'induction de l'apoptose (Wei, *et al* 2001). En effet, en réponse à un stress ou à un dommage cellulaire, les protéines Bax et Bak sont activées, provoquant le changement de leur conformation et la constitution d'homo-oligomères qui forment des pores au sein de la membrane mitochondriale externe (Figure 12) (Westphal, *et al* 2011).

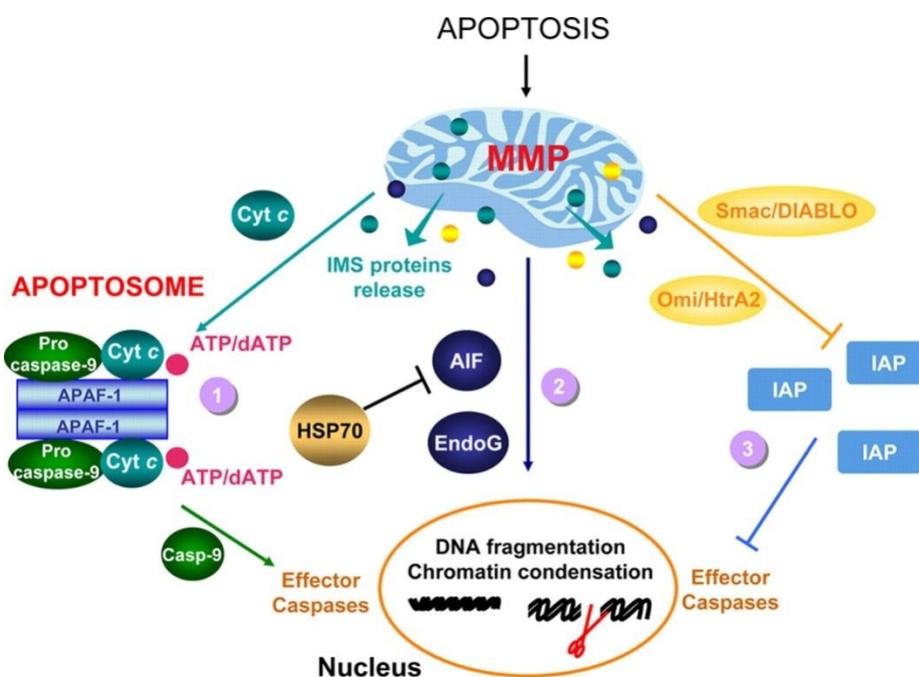


Figure 12 : Apoptose par la voie mitochondriale.

(d'après (Kroemer, *et al* 2007)). Les signaux pro-apoptotiques entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) provoquent la libération des protéines de l'espace intermembranaire mitochondriale (IMS) qui vont induire différentes voies : 1) le cytochrome c (Cyt c) favorise la formation de l'apoptosome en se complexant avec Apaf-1 et l'activation de la caspase 9 (Casp-9) qui à son tour, va activer des caspases effectrices. 2) Les effecteurs de mort indépendants des caspases, AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et l'endonucléase G (EndoG), sont transloqués vers le noyau, où ils vont favoriser la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Les membres de la famille HSP (Heat Shock Protein) inhibent la translocation au noyau d'AIF et de l'EndoG. 3) Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 promeuvent l'apoptose indirectement en inhibant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe entraîne la libération de médiateurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytoplasme tels que le cytochrome c, Smac/DIABLO, AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucléase G et HtrA2/Omi (Kroemer, *et al* 2007). Le cytochrome c ainsi libéré, se lie à la molécule Apaf-1 qui présente un domaine de recrutement des caspases (CARD) (Zou, *et al* 1997). La caspase 9 est ensuite recrutée et activée. Ce complexe forme alors l'apoptosome, structure multi-protéique permettant à son tour l'activation des caspases effectrices de l'apoptose (Riedl and Salvesen 2007) (Figure 12).

4) Les inhibiteurs de l'apoptose

L'apoptose étant un processus fondamental dans la détermination de la survie cellulaire, elle est soumise à une régulation complexe. Pour cela, trois groupes de protéines sont impliqués dans la régulation négative de l'apoptose : les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), les protéines c-FLIP (cellular FADD-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE) inhibitory proteins) et les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (qui seront décrites dans le chapitre suivant).

- Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) sont membres d'une famille hétérogène de protéines partageant un élément structural commun, le domaine BIR (baculoviral IAP Repeat), un motif d'interaction protéine-protéine responsable de la liaison et de l'inhibition des caspases par les protéines IAP (Figure 12). Certaines protéines IAP possèdent également un domaine RING (Really Interesting New Gene) qui présente une activité E3 ubiquitin ligase et est responsable de l'ubiquitination et de la dégradation protéasomale de nombreux substrats dont les caspases (Fulda 2014).
- Les protéines c-FLIP, c-FLIP_S et c-FLIP_L, sont issues de l'épissage alternatif d'un unique gène, et inhibent la formation du complexe DISC ainsi que l'activation de la caspase 8 (Krueger, *et al* 2001).

IV. LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2

Le gène *BCL2* (B Cell Lymphoma 2), membre fondateur de cette famille de protéines qui compte près d'une vingtaine de membres, a initialement été cloné dans le lymphome folliculaire, un lymphome à cellules B de bas grade de malignité. Dans cette pathologie, une translocation $t(14;18)(q32;q21)$ associe le locus du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines avec le gène *BCL2* (Bakhshi, *et al* 1985, Tsujimoto, *et al* 1984). Cette translocation induit la surexpression de Bcl-2 et confère aux cellules un avantage au niveau de la survie. Alors que les oncogènes précédemment décrits avaient pour caractéristique de favoriser la prolifération, Bcl-2 est le premier oncogène identifié comme étant impliqué dans la survie cellulaire (Vaux, *et al* 1988).

1) Classification et structure des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 partagent une homologie de structure qui est la présence de domaines BH (Bcl-2 Homology). En effet, ces protéines possèdent de un à quatre domaine BH participant à la formation d'hélice α . De plus, les différents membres de la famille Bcl-2 présentent au moins un domaine BH3, motif d'acides aminés conservé défini par la séquence LxxxGD (Youle and Strasser 2008). Enfin, les membres de la famille Bcl-2 peuvent posséder une hélice hydrophobe en position C-terminale qui correspond à un segment transmembranaire (Figure 13).

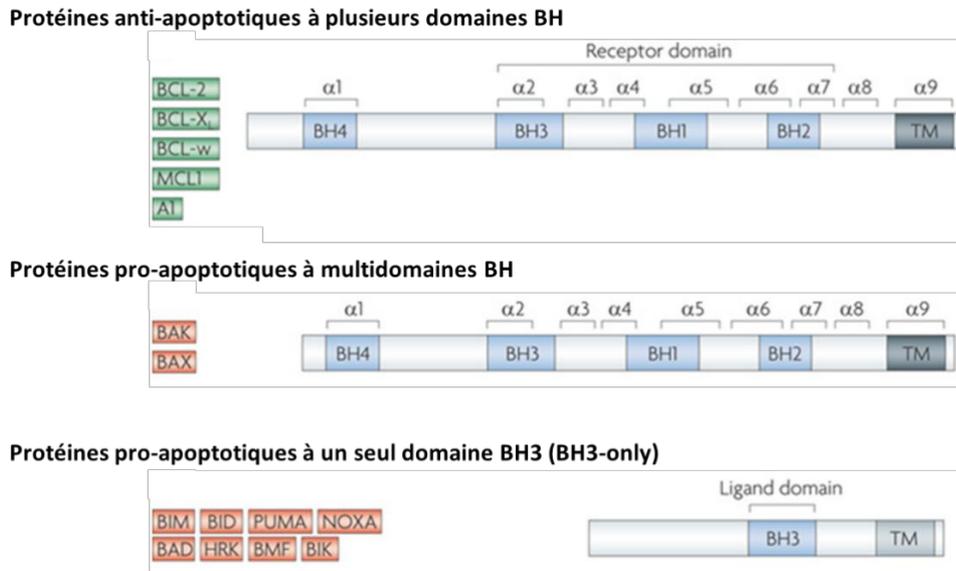


Figure 13 : Classification et structure des membres de la famille Bcl-2.

(d'après (Lessene, *et al* 2008)). BH : Bcl-2 Homology ; TM : domaine transmembranaire.

2) Classification fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2

Selon le nombre de domaines, on peut diviser les membres de cette famille en trois groupes : i) les protéines anti-apoptotiques à plusieurs domaines BH ; ii) les protéines pro-apoptotiques à multidomaines BH ; et iii) les protéines à un seul domaine BH3 dites « BH3-only » (Figure 13).

Les protéines membres de la famille Bcl-2 sont les régulateurs majeurs de la perméabilisation mitochondriale. Elles représentent ainsi un point de contrôle essentiel dans le déclenchement de l'apoptose (Borner 2003). Les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 intègrent les divers signaux de survie ou de mort générés en amont. Ce sont ces interactions qui gouvernent la vie ou la mort de la cellule comme décrit dans la figure 14 (Adams and Cory 2001, Strasser, *et al* 2000).

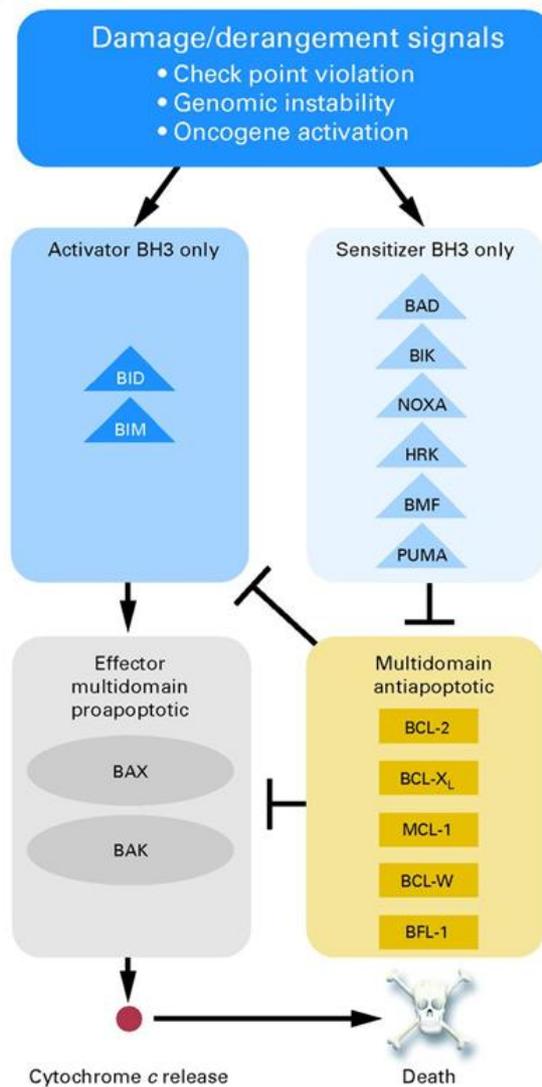


Figure 14 : Fonctions et interactions des protéines de la famille Bcl-2.

(d'après (Davids and Letai 2012)). Trois groupes de protéines de la famille Bcl-2 régissent la décision d'entrer ou non en apoptose par la voie mitochondriale. Les signaux de dommage ou de dérèglement génère l'activation des protéines pro-apoptotiques BH3-only qui sont divisées en deux groupes, les activatrices et les sensibilisatrices. Les protéines BH3-only activatrice vont activer les protéines pro-apoptotiques effectrices à multidomaines Bax et Bak, conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à l'engagement dans la mort apoptotique. Les protéines anti-apoptotiques à plusieurs domaines BH s'opposent à ce processus en séquestrant les protéines activatrices ou les protéines effectrices. Les protéines BH3-only sensibilisatrices agissent comme des inhibiteurs sélectifs des protéines anti-apoptotiques.

3) Les protéines anti-apoptotiques

Depuis la découverte de Bcl-2 en 1984, d'autres protéines anti-apoptotiques appartenant à la même famille ont été décrites : Bcl-x_L (Boise, *et al* 1993), Mcl-1 (Kozopas, *et al* 1993), Bfl-1 (A1) (Lin, *et al* 1993) et Bcl-w (Gibson, *et al* 1996). Ces protéines régulent négativement la voie mitochondriale de l'apoptose via deux mécanismes principaux : i) par la liaison et la séquestration des protéines BH3-only activatrices, ii) par l'interaction directe avec Bax et Bak provoquant leur inhibition.

A. Structure des protéines anti-apoptotiques

Malgré des différences dans les séquences primaires des protéines, les structures tridimensionnelles des membres anti-apoptotiques sont similaires (Denisov, *et al* 2003, Petros, *et al* 2001). En effet, ces protéines présentent une structure globulaire composée de 9 hélices α formées en partie par les domaines BH. Les domaines BH1, BH2 et BH3 interagissent entre eux pour former une poche hydrophobe à la surface de la protéine, ce qui lui permet de séquestrer les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et lui confère son rôle anti-apoptotique (Figure 15) (Sattler, *et al* 1997).

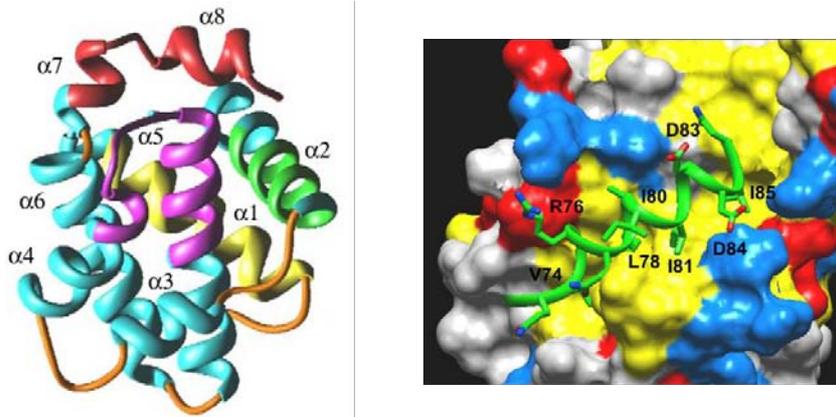


Figure 15 : Structure des protéines anti-apoptotiques.

(d'après (Petros, *et al* 2004)). A gauche, représentation en ruban de Bcl-x_L, à droite, représentation du peptide Bak (16 aa) dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L.

Alors que le domaine BH3 est impliqué dans la liaison avec les partenaires protéiques, les domaines BH1 et BH2 sont nécessaires mais insuffisants pour induire l'activité anti-apoptotique de ces protéines (Matsuyama, *et al* 1998). Quant au domaine BH4, il est absent de certains membres anti-apoptotiques comme Mcl-1. Ce domaine est localisé dans la partie

N-terminale de la protéine et est lié par une boucle flexible de longueur et de structure variable (Aouacheria, *et al* 2005). Il serait impliqué dans l'activité anti-apoptotique des membres qui le possède, car sa suppression dans Bcl-2 ou Bcl-x_L les inactive (Huang, *et al* 1998).

B. Bcl-2

Bcl-2 est le membre fondateur de cette famille de protéines. De nombreuses études ont montré que Bcl-2 joue un rôle important dans la différenciation, la survie cellulaire et la prolifération (Bonney-Berard, *et al* 2004, Vaux, *et al* 1988). La régulation de son expression est très contrôlée tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que protéique.

Pour ce travail, nous nous intéressons uniquement à l'activité de Bcl-2 dans la survie cellulaire.

1. Rôle de Bcl-2 dans la survie cellulaire :

Lors de l'apoptose par la voie mitochondriale, les protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak, sont activées et forment des pores au niveau de la membrane mitochondriale externe libérant ainsi les molécules apoptogènes. La fonction anti-apoptotique principale de Bcl-2 s'exerce alors au niveau de la membrane mitochondriale externe via ses interactions directes avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, grâce à sa poche hydrophobe, Bcl-2 peut séquestrer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, mais également le BH3-only activatrices Bim et Bid, via leur domaine BH3, et ainsi inhiber leur fonction pro-apoptotique et la formation de pores (Antonsson, *et al* 1997, Yin, *et al* 1994).

En plus de son action à la mitochondrie, il a été montré que Bcl-2 peut jouer un rôle en aval de la mitochondrie en se liant avec Apaf-1 (Zou, *et al* 1997) et empêchant ainsi la formation de l'apoptosome et la cascade d'activation des caspases (Cosulich, *et al* 1999, Swanton, *et al* 1999).

Aussi, bien que sa localisation principale soit au niveau de la membrane mitochondriale externe, Bcl-2 est également retrouvée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Il a été montré que Bcl-2 peut y réguler le flux de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, en agissant sur la pompe à calcium SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) ou le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R) (Dremina, *et al* 2004, Pinton and Rizzuto 2006). Ainsi, différentes études

ont montré que Bcl-2 favorise la survie cellulaire en diminuant les signaux de stress du réticulum endoplasmique via la régulation des flux de calcium (Oakes, *et al* 2006, Palmer, *et al* 2004).

2. La régulation de l'expression de Bcl-2 :

i. Régulation au niveau transcriptionnel

Le gène codant pour Bcl-2 est composé de trois exons (dont un non traduit) et de deux introns. Deux régions promotrices, P1 et P2, permettent la transcription du gène. P2 est localisée au niveau de l'exon 2 et contient une TATA box ainsi qu'une CAAT box. Cependant, peu de transcrits sont issus de cette région promotrice P2. P1 est, quant à elle, localisée au sein d'une région riche en CG dans l'exon 1. Elle ne possède ni TATA box ni CAAT box, mais plusieurs sites de liaison de Sp1 et plusieurs sites d'initiation de la transcription, et également un site de liaison de Pie1 qui régule négativement la transcription de Bcl-2 (Chen and Boxer 1995, Seto, *et al* 1988). Différents facteurs de transcription induisant la transcription de Bcl-2 ont été identifiés comme Brn3a dans les cellules WT1, Aiolos dans les cellules T, HIV tat, Gli 1 et Pax8 (Bigelow, *et al* 2004). Enfin, l'expression du gène *BCL2* peut être induite par des cytokines (IL-7, IL-15) et des facteurs de croissance (VEGF, IGF-1), ou inhibée par p53 (Beierle, *et al* 2002a, Beierle, *et al* 2002b, Kurowska, *et al* 2002, Miyashita, *et al* 1994, von Freeden-Jeffry, *et al* 1997).

ii. Régulation au niveau post-transcriptionnel

L'expression de l'ARN messenger (ARNm) codant pour Bcl-2 peut être régulée par des micro-ARN (miRNA). En effet, il a été montré dans des lignées de leucémie lymphoïde chronique que l'expression des miRNA miR-15 et miR-16 induit une diminution de l'expression de Bcl-2 (Cimmino, *et al* 2005).

L'ARNm de Bcl-2 peut également être dégradé via hnRNPL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) et AUF-1 (AU-rich element binding factor-1), qui se lient à la région 3'UTR de l'ARNm, recrutent les protéines de l'exosome et ainsi conduisent à la dégradation de l'ARNm (Lee, *et al* 2009). A l'opposé, l'ARNm de Bcl-2 possède également une séquence en 3'UTR riche en AU sur laquelle va se fixer la nucléoline et augmenter la stabilité et donc le temps de demi-vie de l'ARNm de Bcl-2 (Ishimaru, *et al* 2010, Sengupta, *et al* 2004).

iii. Régulation au niveau post-traductionnel

Certaines modifications post-traductionnelles de Bcl-2, en modifiant son activité, ont été décrites dans différentes pathologies. Les principales sont la phosphorylation et le clivage de Bcl-2.

La protéine Bcl-2 peut être phosphorylée sur différents sites de la région entre les domaines BH3 et BH4. Ces phosphorylation peuvent avoir différents effets aussi bien sur la stabilité ou la fonction de la protéine (Blagosklonny 2001). En effet, certaines phosphorylations ont été décrites comme augmentant le rôle anti-apoptotique de Bcl-2, c'est le cas des phosphorylations induites par la voie MAPK/ERK1-2 qui augmente la stabilité de Bcl-2 (Breitschopf, *et al* 2000). A l'inverse, d'autres phosphorylations abrogent l'action anti-apoptotique de Bcl-2, notamment celles induites par Raf-1 (Blagosklonny 2001) ou par protéine kinase A (Srivastava, *et al* 1998) qui rompent les complexes que Bcl-2 forme avec les membres pro-apoptotique, renforçant un signal apoptotique. Enfin certaines phosphorylations augmentent la dégradation de Bcl-2 par le protéasome (Lin, *et al* 2006).

Plusieurs études ont montré que Bcl-2 pouvait être le substrat des caspases 3 et 9, ainsi que des calpaïnes (Chen, *et al* 2007). En effet, Bcl-2 possède deux sites de clivage par les caspases et un site de clivage par les calpaïnes. Après clivage et perte du domaine BH4, Bcl-2 perd son activité anti-apoptotique et le fragment contenant le domaine BH3 devient pro-apoptotique. Le fait que Bcl-2 puisse à la fois inhiber l'activation des caspases en aval de la mitochondrie et être leur substrat, suggère qu'il existe une boucle d'amplification aboutissant à la mort de la cellule (Cheng, *et al* 1997).

C. Mcl-1

Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1) est une protéine anti-apoptotique à plusieurs domaines BH de la famille Bcl-2, identifiée en 1993 dans la lignée myéloïde ML-1 (Kozopas, *et al* 1993). Le gène codant pour Mcl-1 est localisé sur le chromosome 1, est composé de trois exons et deux introns, et code pour trois protéines du fait d'un épissage alternatif (Craig, *et al* 1994). Contrairement à Bcl-2 et Bcl-x_L qui en ont quatre, Mcl-1 ne possède que trois domaines BH (Thomas, *et al* 2010). La demi-vie de la protéine Mcl-1 dans des cellules non-tumorales est très courte (Yoon, *et al* 2002). Sa localisation intracellulaire est similaire à celle de Bcl-2, principalement au niveau de la membrane mitochondriale via son domaine transmembranaire (Akgul, *et al* 2000a).

1. Rôle de Mcl-1 dans la survie cellulaire

La principale fonction de Mcl-1 est son activité anti-apoptotique par la séquestration et l'inhibition des membres pro-apoptotiques Bax et Bak, mais également des BH3-only Bim, Puma et Noxa, grâce à sa poche hydrophobe (Chen, *et al* 2005).

L'expression de Mcl-1 est souvent induite par des signaux de survie et confère aux cellules une protection vis-à-vis de l'apoptose. En effet, des travaux au sein de notre laboratoire ont montré que l'IL-6, principal facteur de croissance des cellules de MM, augmente l'expression de Mcl-1 dans les lignées et leur confère ainsi une résistance envers ce mécanisme de mort cellulaire (Puthier, *et al* 1999a). La surexpression de Mcl-1 est retrouvée dans certains cancers et est couramment associée à une résistance accrue de ces cellules vis-à-vis des agents anticancéreux (Olberding, *et al* 2010, Son, *et al* 2010).

Au niveau lymphocytaire, il a été démontré que le rôle de Mcl-1 est essentiel dans le développement et la survie des lymphocytes T et B matures, ainsi que des plasmocytes (Opferman, *et al* 2003, Peperzak, *et al* 2013, Vikstrom, *et al* 2010).

2. La régulation de l'expression de Mcl-1 :

i. Régulation au niveau transcriptionnel

La région promotrice du gène codant pour Mcl-1 contient différents sites de liaison pour des facteurs de transcription, comme STAT3 (consensus stat response element), l'AMP cyclique (cAMP response element), et NF- κ B (Akgul, *et al* 2000b). Dans la leucémie lymphoïde chronique et le myélome multiple, il a été montré que l'IL-6 et le VEGF augmentent la transcription du gène de Mcl-1 via STAT3 (Le Gouill, *et al* 2004, Lee, *et al* 2005, Puthier, *et al* 1999a).

ii. Régulation au niveau post-transcriptionnel

L'ARNm codant pour Mcl-1 est sujet à un épissage alternatif qui, en plus de la forme longue anti-apoptotique, Mcl-1_L, conduit à la formation d'une forme courte, nommée Mcl-1_S, ne comprenant ni les domaines BH1 et BH2, ni le domaine transmembranaire. Cet épissage aboutit également à la formation d'une seconde forme courte, nommée Mcl-1_{ES}. Ces deux transcrits alternatifs donnent ensuite des protéines ayant perdu leur fonction anti-apoptotique, et présentant même une fonction pro-apoptotique en se liant à la forme classique de Mcl-1.

Enfin, l'ARNm de Mcl-1 présente une demi-vie très courte, et peut également être régulé négativement par des miRNA (Chen, *et al* 2013, Gong, *et al* 2013, Mott, *et al* 2007).

iii. Régulation au niveau post-traductionnel

La fonction de Mcl-1 est également régulée par des phosphorylations à différents sites de la protéine. Certaines de ces phosphorylations stabilisent Mcl-1 et sont nécessaires à sa fonction anti-apoptotique, comme celles induites par les voies MAPK/ERK1 ou JNK (Ding, *et al* 2008, Kodama, *et al* 2009). En revanche, les phosphorylations induites par GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) altèrent la stabilité ainsi que la fonction anti-apoptotique de Mcl-1, notamment en altérant la liaison de la protéine à Bim (Maurer, *et al* 2006).

Enfin, la protéine Mcl-1 ne semble être clivée que par les caspases (Thomas, *et al* 2010). Ce clivage peut être spontané ou induit par des traitements, et conduit à la modification de la fonction de Mcl-1. Dans le myélome, il a notamment été montré que le fragment clivé de Mcl-1 (128-350) exerce une action pro-apoptotique, soit par l'activation directe de Bax (Menoret, *et al* 2010), soit de manière indirecte par l'activation de la voie c-JUN (Fan, *et al* 2014).

D. Bcl-x_L

1. Rôle de Bcl-x_L dans la survie cellulaire

La protéine Bcl-x_L est caractérisée par ses quatre domaines BH et son domaine transmembranaire en C-terminal qui lui confèrent son activité anti-apoptotique grâce à sa poche hydrophobe. Comme Bcl-2 et Mcl-1, elle peut interagir avec différents membres pro-apoptotiques comme Bim (Liu, *et al* 2003), Puma (Yu, *et al* 2001), Bad (Petros, *et al* 2000), tBid (Yao, *et al* 2009) ou encore Noxa (Lopez, *et al* 2010). Bcl-x_L a également la capacité de s'hétérodimériser avec les membres pro-apoptotiques à multidomains Bax et Bak (Sattler, *et al* 1997, Sedlak, *et al* 1995). Comme décrit pour Bcl-2, Bcl-x_L semble pouvoir se lier à Apaf-1 et ainsi inhiber la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 en aval de la mitochondrie (Zou, *et al* 1997). Il a également été décrit que Bcl-x_L pourrait interagir directement avec les caspases et ainsi les inhiber (Clem, *et al* 1998).

Enfin, comme pour Mcl-1, des travaux de l'équipe ont pu montrer que l'expression de Bcl-x_L est induite par l'IL-6, augmentant ainsi la résistance de la cellule à l'apoptose (Puthier, *et al* 1999b).

2. La régulation de l'expression de Bcl-x_L :

Les mécanismes de régulation de Bcl-x_L sont très proches de ceux décrits pour Bcl-2 et Mcl-1.

i. Régulation au niveau transcriptionnel

Chez l'homme, le gène codant pour Bcl-x_L (ou *BCL2L1*) est situé sur le chromosome 20. De multiples sites d'initiation de la transcription ont été identifiés sur ce gène et sont utilisés en fonction du type cellulaire. La région promotrice de Bcl-x_L contient différents sites de liaison de facteurs de transcription dont les plus décrits dans la régulation de l'expression de Bcl-x_L sont, NF-κB et STATs (Grillot, *et al* 1997). En effet, l'implication de la voie JAK/STAT dans la régulation de Bcl-x_L a été montrée dans plusieurs études, notamment dans des cellules de MM en réponse à l'IL-6 qui induit l'augmentation de Bcl-x_L via STAT3 (Catlett-Falcone, *et al* 1999, Plowright, *et al* 2000), ou en réponse à l'IL-2 qui active des signaux de survie dans les lymphocytes et induit Bcl-x_L via STAT5 (Lord, *et al* 2000).

Enfin, la voie Rel/NF-κB a été montrée comme étant directement impliquée dans la régulation de la réponse apoptotique via l'augmentation de la transcription de Bcl-x_L. En effet, dans des lymphocytes B, Lee *et al.*, ont décrit un site consensus de NF-κB dans le promoteur de Bcl-x_L et ont montré la nécessité de l'activité de NF-κB dans l'augmentation de Bcl-x_L en réponse aux signaux de survie induite par le CD40 (Lee, *et al* 1999). De plus, Chen *et al.* ont également montré l'implication de c-Rel et Rel-A dans l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L dans des cellules de fibrosarcome (Chen, *et al* 2000).

ii. Régulation au niveau post-transcriptionnel

L'ARNm codant pour Bcl-x_L est soumis à un épissage alternatif aboutissant, en plus de Bcl-x_L qui est le transcrit majeur, à deux autres isoformes, Bcl-x_S et Bcl-x_γ (Grillot, *et al* 1997). La forme courte Bcl-x_S est caractérisée par son seul domaine BH3 et par son activité pro-apoptotique. En effet, cette isoforme peut se lier à la poche hydrophobe de Bcl-2, ou de Bcl-x_L, et ainsi inhiber leur fonction anti-apoptotique (Boise, *et al* 1993). Enfin, le variant d'épissage Bcl-x_γ, identifié dans les lymphocytes T, régit l'activation ou la survie de ces cellules (Yang, *et al* 1997).

iii. Régulation au niveau post-traductionnel

Bcl-x_L peut être la cible des caspases. Son clivage au niveau de sa boucle libre un fragment ne possédant pas le domaine BH4 qui présente un effet pro-apoptotique (Clem, *et al* 1998).

Comme décrit précédemment pour Bcl-2 et Mcl-1, la phosphorylation de Bcl-x_L peut avoir différents effets, comme l'inactivation, ou au contraire le renforcement de son rôle anti-apoptotique, ou encore la diminution de la demi-vie de la protéine (Basu, *et al* 2006).

E. Bcl-w

Bcl-w (ou *BCL2L2*), possède tous les domaines BH ainsi qu'un domaine transmembranaire en C-terminal. Cette protéine peut interagir avec, et séquestrer, les membres pro-apoptotiques : Bim, Bax, Bak, Bad et Bik (Holmgreen, *et al* 1999). La conformation particulière de cette protéine fait que lorsqu'une protéine pro-apoptotique se lie à sa poche hydrophobe, Bcl-w se fixe dans la membrane mitochondriale ce qui neutralise son rôle anti-apoptotique (Wilson-Annan, *et al* 2003).

F. Bfl-1/A1

Le gène codant pour Bfl-1/A1 (ou *BCL2A1*) est localisé sur le chromosome 15. Bfl-1/A1 comprend quatre domaines BH, et un domaine transmembranaire formant une hélice $\alpha 9$ qui lui donne une double conformation tridimensionnelle (Choi, *et al* 1995). Ainsi, lorsque l'hélice $\alpha 9$ est présente dans la poche hydrophobe, la molécule est rigidifiée et l'accès aux domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques est limité. Présentée en dehors de la forme globulaire, l'hélice $\alpha 9$ permet l'ancrage de Bfl-1/A1 dans la membrane mitochondriale (Brien, *et al* 2009).

Bfl-1/A1 exerce principalement un rôle anti-apoptotique en séquestrant les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bim (Hsu, *et al* 1998), Bak, Bik (Holmgreen, *et al* 1999), Bad (Bae, *et al* 2001) et Bid (Werner, *et al* 2002). Bfl-1/A1 est principalement exprimée dans le système hématopoïétique, favorise la survie de certains leucocytes (lymphocytes, macrophages) et joue un rôle important lors de l'inflammation (Vogler 2012). Cependant, Bfl-1/A1 n'est pas exprimée par les plasmocytes (Tarte, *et al* 2004). Son expression est fortement régulée par les voies CD40 et NF- κ B (Lee, *et al* 1999, Zong, *et al* 1999).

4) Les protéines pro-apoptotiques à multidomaines : Bax et Bak

Les protéines pro-apoptotique Bax (BCL-2-associated X protein) et Bak (BCL-2 antagonist/killer 1) sont indispensables à l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale (Wei, *et al* 2001).

A. Structure

Les gènes codant pour Bax et Bak sont localisés sur les chromosomes 19 et 6, et codent pour des protéines de 21kDa et 23kDa, respectivement. Ces protéines possèdent les domaines BH1, BH2, BH3 et transmembranaire composant 9 hélices α et un coude. Leurs structures globulaires sont donc proches de celles de protéines anti-apoptotiques (Suzuki, *et al* 2000, Westphal, *et al* 2011).

B. Activation de Bax et Bak

En condition normale, Bax est principalement localisée dans le cytoplasme, liée à des protéines chaperonnes telles que Ku70 et 14-3-3 qui la maintiennent sous forme inactive. Un stress apoptotique va libérer Bax grâce à l'acétylation de Ku70 et à la phosphorylation de 14-3-3 (Cohen, *et al* 2004, Tsuruta, *et al* 2004). La libération de Bax de ces protéines inhibitrices est nécessaire, mais ne suffit pas à son activation. En effet, la transduction du signal apoptotique par les membres de la famille Bcl-2 est fondamentale pour l'activation de Bax.

Bak est localisé au niveau de la membrane mitochondriale externe, grâce à son hélice $\alpha 9$ transmembranaire. Bak est maintenue sous forme inactive par l'interaction avec VDAC2 (Cheng, *et al* 2003) ou avec des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-x_L ou Mcl-1 (Danial 2007). Les membres pro-apoptotiques BH3-only activateurs vont rompre ces complexes, et ainsi libérer et activer Bak.

L'activation de Bax et Bak induit leur changement de conformation qui expose leurs hélices $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 9$. L'exposition des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 9$ est essentielle pour la translocation de ces protéines à la mitochondrie et la formation d'homo-oligomères (Figure 16) (Wei, *et al* 2001), tandis que les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ permettent la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe (Lalier, *et al* 2007).

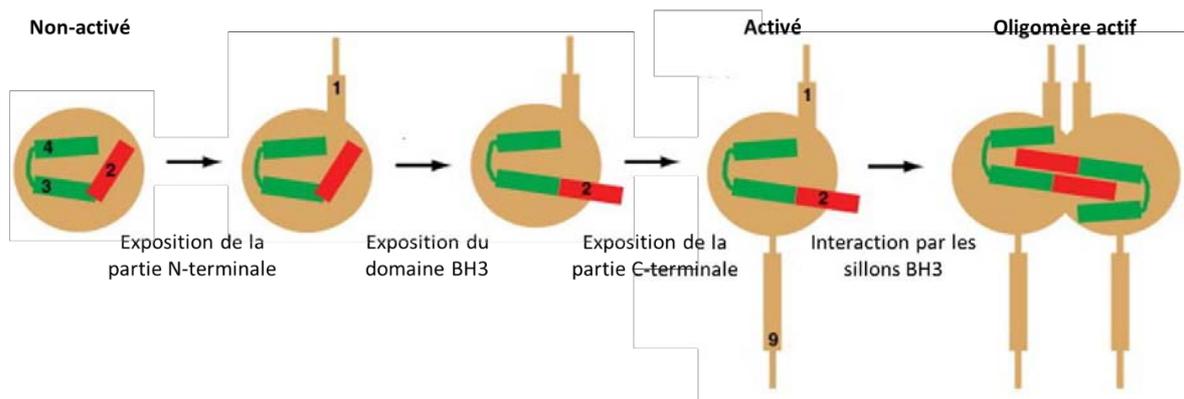


Figure 16 : Activation et oligomérisation de Bax et Bak.

(d'après (Westphal, *et al* 2011)). Le changement de conformation de Bax est initié par la liaison de Bim sur son extrémité N-terminale. Le changement de conformation génère un monomère de Bax actif qui expose son domaine BH3, permettant ainsi la formation d'oligomère via l'interaction des sillons BH3. Les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 9$ sont indiquées par les numéros.

L'activation de Bax et Bak induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, ce qui provoque la libération dans le cytoplasme des molécules apoptogènes (cytochrome c, Smac/DIABLO, endonucléase G,...) initialement présentes dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie.

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

Le groupe des membres pro-apoptotiques à un seul domaine BH3, dits BH3-only, est composé chez l'homme de huit protéines : Bad (Yang, *et al* 1995), Bik (Boyd, *et al* 1995), Bid (Wang, *et al* 1996), Hrk (Inohara, *et al* 1997), Bim (Hsu, *et al* 1998), Noxa (Oda, *et al* 2000), Puma (Nakano and Vousden 2001), et Bmf (Puthalakath, *et al* 2001).

Au cours de ce travail, seuls certains membres seront détaillés, avec un intérêt particulier pour Bim.

A. Structure et fonction des protéines BH3-only

Tous les membres de ce groupe possèdent un unique domaine d'homologie avec Bcl-2, le domaine BH3. Seuls Bim, Bik et Hrk possèdent un domaine transmembranaire (Gross, *et al* 1999a). La différence entre les protéines pro-apoptotiques à multidomaine et les BH3-only

ne provient pas seulement de leur activité biologique et de leurs séquences, mais également de leurs structures. En effet, contrairement aux protéines à multidomaines, les protéines BH3-only, à l'exception de Bid, sont des protéines intrinsèquement désordonnées (Hinds, *et al* 2007, Rautureau, *et al* 2010, Yao, *et al* 2009). C'est-à-dire que les protéines BH3-only ne sont pas des entités bien pliées, elles sont définies par leur manque de structure, y compris secondaire (Kvansakul and Hinds 2014). Bid est la seule protéine BH3-only avec une structure bien définie, elle présente une structure hydrophobe similaire à celle de Bcl-2 (Kvansakul and Hinds 2013). Les protéines BH3-only, y compris Bid, nécessitent une activation protéolytique ainsi qu'une étape de reformation pour être fonctionnelles (Kvansakul and Hinds 2014).

Les protéines BH3-only sont considérées comme les sentinelles du bien-être cellulaire et les protéines initiateuses de l'apoptose par la voie mitochondriale. Ces protéines peuvent être divisées en deux groupes en fonction de leur activité. En effet, elles déclenchent l'apoptose soit en activant par interaction directe, les protéines effectrices Bax et Bak, il s'agit des protéines BH3-only « activatrices », soit de manière indirecte en neutralisant les protéines anti-apoptotiques, il s'agit alors des protéines BH3-only « sensibilisatrices ». Ainsi, Bim, Bid sont des protéines activatrices, alors que Bad, Bik, Noxa et Puma sont des protéines sensibilisatrices (Figure 14) (Davids and Letai 2012).

B. Les BH3-only activatrices

1. Bim

Le gène de Bim (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death ou *BCL2L11*) est localisé sur le chromosome 2 et code pour 3 isoformes issues d'un épissage alternatif : Bim_{EL} (23kDa), Bim_L (19kDa) et Bim_S (15kDa). Ces trois protéines possèdent toutes un domaine BH3 ainsi que le domaine transmembranaire, mais elles diffèrent par leur partie N-terminale (O'Connor, *et al* 1998). Des analyses par immuno-histochimie, western blot et hybridation *in situ* ont révélé que les isoformes Bim_{EL} et Bim_L sont exprimées dans la plupart des tissus et des lignées cellulaires, alors que l'expression de Bim_S est beaucoup plus restreinte (O'Reilly, *et al* 2000). Ces différentes isoformes présentent également un pouvoir pro-apoptotique différent. En effet, Bim_S a le plus puissant pouvoir pro-apoptotique, suivi par Bim_L, puis Bim_{EL}. Deux mécanismes ont été proposés pour le maintien de Bim sous sa forme inactive. Le premier indique que les isoformes Bim_L et Bim_{EL} seraient séquestrées par DLC1 (Dynein Light Chain) au niveau des microtubules, ce qui expliquerait leur plus faible pouvoir pro-apoptotique. En

effet, lors d'un stress apoptotique, Bim_{EL} et Bim_L doivent d'abord être libérées de DLC1 par JNK (Lei and Davis 2003). Un deuxième mécanisme proposé est celui de l'interaction de Bim avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce qui séquestrerait la protéine inactive au niveau de la mitochondrie. Des travaux au sein de notre équipe ont vérifié cette deuxième hypothèse dans les cellules B, en montrant que les trois isoformes de Bim sont fortement associées aux protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-x_L, alors que peut de protéines Bim_{EL} et Bim_L sont associées avec les complexes de chaîne de dynéines (Gomez-Bougie, *et al* 2005).

En plus du fait que Bim est à même d'activer directement les protéines pro-apoptotiques à multidomains par son interaction, elle a également la capacité de se lier à tous les membres anti-apoptotiques avec la même affinité et ainsi de tous les inhiber.

L'expression de Bim est régulée aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionnel. En effet, il a été rapporté que l'expression de Bim est régulée au niveau transcriptionnel dans de nombreux types cellulaires lors de la privation en cytokine ou facteur de croissance. Ceci induit l'expression de Bim par les voies JNK ou PI3K/Akt en impliquant notamment le facteur de transcription FoxO3a (Forkhead box O3a ou FKHL1) (Dijkers, *et al* 2000, Putcha, *et al* 2001, Stahl, *et al* 2002). Aussi, cette régulation se fait de manière directe grâce aux deux séquences FRE (Forkhead Response Element) qui ont été décrites au niveau de la région promotrice de Bim (Gilley, *et al* 2003).

De plus, au niveau post-traductionnel, Bim peut être phosphorylé par les voies ERK1-2 (Ley, *et al* 2003, Ley, *et al* 2004, Luciano, *et al* 2003), JNK (Lei and Davis 2003, Putcha, *et al* 2003), et PI3K/Akt (Qi, *et al* 2006), ce qui affecte son niveau d'expression et son activité pro-apoptotique. Aussi, l'expression de Bim est régulée via la dégradation par le protéasome après ubiquitination (Ley, *et al* 2003, Luciano, *et al* 2003, Meller, *et al* 2006). Enfin, bien que Bim soit impliqué dans le mécanisme d'activation des caspases, cette protéine peut également être la cible de la caspase 3 qui régule négativement son expression en stimulant sa dégradation. Il s'agit alors d'une boucle de rétrocontrôle négative (Wakeyama, *et al* 2007).

Bim est un acteur clé de l'homéostasie lymphoïde, en effet, cette protéine est fortement exprimée dans les lymphocytes T corticaux (CD4⁺CD8⁺), les lymphocytes B du centre germinatif et les cellules plasmocytaires (O'Reilly, *et al* 2000, Yokoyama, *et al* 2002). Bim joue donc un rôle important dans la différenciation des lymphocytes, notamment lors de

la sélection négative des lymphocytes auto-réactifs (Bouillet, *et al* 1999, Bouillet, *et al* 2002, Enders, *et al* 2003).

2. Bid

Le gène de Bid (BH3-Interacting Domain death agonist) est localisé sur le chromosome 22 et code pour une protéine de 22kDa. Cette protéine cytoplasmique à une structure tridimensionnelle proche de celle de Bcl-x_L (Chou, *et al* 1999) et interagit avec Bcl-2 et Bax (Wang, *et al* 1996). Bid joue un rôle important dans l'apoptose en faisant un lien entre la voie extrinsèque et la voie mitochondriale. En effet, la caspase 8 activée par la voie extrinsèque clive Bid, et sa partie C-terminale tronquée forme tBid. Celle-ci est transloquée à la membrane mitochondriale externe où elle active Bax et inhibe Bcl-2 permettant ainsi la formation de pores et la libération du cytochrome c (Gross, *et al* 1999b). De plus, il a été décrit que tBid peut former des canaux ioniques *in vitro* suggérant que la seule présence de tBid pourrait induire la perméabilisation mitochondriale (Schendel, *et al* 1999).

C. Les BH3-only sensibilisatrices

Les protéines BH3-only sensibilisatrices ne peuvent pas directement activer les protéines pro-apoptotiques à multidomaines Bax et Bak. En revanche, elles peuvent se lier grâce à leur domaine BH3, à la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Elles antagonisent donc la fonction de ces protéines en dissociant les BH3-only activatrices et/ou en empêchant la fixation de BH3-only libres. De façon intéressante, l'affinité des différentes BH3-only sensibilisatrices pour les protéines anti-apoptotiques est très variable, elles n'interagissent donc pas obligatoirement avec toutes les protéines anti-apoptotiques (Certo, *et al* 2006, Kim, *et al* 2006, Kuwana, *et al* 2005, Letai, *et al* 2002).

1. Bad

Le gène de Bad (Bcl-2-associated Agonist of cell death) est localisé sur le chromosome 11 et code pour une protéine de 23kDa. Bad se lie à la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, grâce à son domaine BH3, inhibant ainsi leur effet anti-apoptotique. En réponse à une stimulation par l'IL-3, la protéine Bad est phosphorylée par la voie PI3K/Akt ce qui conduit à sa séquestration par la protéine 14-3-3 (del Peso, *et al* 1997).

2. *Bik*

Bik (Bcl-2 Interacting Killer) est l'une des premières protéines BH3-only à avoir été identifiées, elle est considérée comme le membre fondateur de ce groupe car c'est grâce à son étude que le lien entre le domaine BH3 et la fonction pro-apoptotique a été fait (Boyd, *et al* 1995). Son gène est situé sur le chromosome 22 et code pour une protéine de 20kDa localisée à la membrane du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. *Bik* peut interagir avec Bcl-x_L et Bcl-w. L'expression de *Bik* peut être régulée par p53 et le facteur de transcription E2F1 (Chinnadurai, *et al* 2008).

3. *Noxa*

Le gène de *Noxa* (ou *PMAIP1*) (*Noxa* signifie « menace » en latin) est localisé sur le chromosome 18 et code pour la plus petite des protéines de la famille Bcl-2 connues à ce jour. Cette protéine de 10kDa est constituée d'un domaine BH3 unique qui lui confère son activité pro-apoptotique. *Noxa* peut se lier aux protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bfl-1/A1, mais une étude a montré qu'elle interagit avec une forte affinité à Mcl-1 et une faible affinité à Bfl-1/A1, indiquant qu'elle est plus spécifique de Mcl-1 (Chen, *et al* 2005). La liaison de *Noxa* à Mcl-1 induit la dégradation de cette dernière par le protéasome (Ploner, *et al* 2008).

L'expression de *Noxa* peut être induite par différents signaux mitotiques ou apoptotiques dépendants ou non de p53 (Oda, *et al* 2000). Il a également été montré que lors d'un stress hypoxique, HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α) peut induire l'expression de *Noxa* (Kim, *et al* 2004).

4. *Puma*

Le gène de *Puma* (P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis) est localisé sur le chromosome 19 et code pour une protéine de 23kDa avec une localisation mitochondriale grâce à son domaine transmembranaire en C-terminal. *Puma* peut se lier à l'ensemble des protéines anti-apoptotiques ce qui lui donne un rôle pro-apoptotique majeur (Yu and Zhang 2003). La régulation de l'expression de *Puma* au niveau transcriptionnel est dépendante ou non de p53. En effet, un stress génotoxique induit l'expression de *Puma* via p53 tandis que la privation en facteur de croissance ou un stress du réticulum endoplasmique induisent son expression de manière p53 indépendante (Ming, *et al* 2008, Nickson, *et al* 2007). Enfin, l'expression de *Puma* peut également être induite par le facteur de transcription E2F1 (Hershko and Ginsberg 2004). Le classement de *Puma* dans le groupe des protéines BH3-only

sensibilisatrices est discuté, en effet, certaines études ont montrés que Puma pouvait se lier directement à Bax et Bak, et ainsi être une protéine BH3-only activatrice (Cartron, *et al* 2004, Kim, *et al* 2006).

V. LE MECANISME D'ACTION DE LA DEXAMETHASONE DANS LE MYELOME

La Dexaméthasone étant largement utilisée dans le traitement du myélome, comme décrit précédemment, des études ont été initiées dans le but de déterminer son mécanisme d'action.

Il a d'abord été montré qu'en plus de ses effets anti-inflammatoires et antalgiques, la Dex présente des effets directs sur les cellules de MM. En effet, elle possède des effets antiprolifératifs (Distelhorst, *et al* 1984) et induit la mort cellulaire des plasmocytes tumoraux (Gomi, *et al* 1990, Hardin, *et al* 1994, Juge-Morineau, *et al* 1995). Cependant les mécanismes mis en jeu ne sont pas totalement élucidés. Les premières études ont montré un impact de la Dex sur la production d'IL-6 et l'expression du récepteur à l'IL-6 par les cellules de MM. Il a également été montré que l'IL-6 de manière paracrine pouvait inhiber les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de la Dex (Hardin, *et al* 1994, Juge-Morineau, *et al* 1995).

Aussi, différentes études ont été réalisées sur un nombre restreint de lignées de MM, et notamment sur la lignée MM.1S qui a été décrite comme une lignée sensible à la Dex et la lignée résistante MM.1R dérivée de cette première après une longue exposition à la Dex. Ces études ont permis de mettre en évidence le rôle du récepteur aux glucocorticoïdes dans la réponse à la Dex de ces cellules (Sanchez-Vega and Gandhi 2009, Sanchez-Vega, *et al* 2006), mais également la modulation de l'expression de nombreux gènes, dont ceux codant pour les protéines de la famille Bcl-2, Bcl-x_L et Bim (Chauhan, *et al* 2002, Sharma and Lichtenstein 2008).

Enfin, en 2007, Grugan et ses co-auteurs ont émis l'hypothèse, d'après les études réalisées sur les cellules T, que GILZ pouvait être impliqué dans la réponse aux GCs dans le MM. Après avoir montré l'augmentation de l'expression de GILZ par la Dex dans différentes lignées de MM, ils ont mis en évidence que la réduction par ARN interférence de l'induction de GILZ conduit à une faible diminution de la mort induite par la Dex, supportant ainsi l'hypothèse de l'implication de GILZ dans la mort induite par les GCs dans le MM. Cependant, le modeste effet démontré laisse penser que GILZ ne serait pas l'unique acteur de cette mort. Dans cette étude, le prétraitement des cellules avec de l'IL-6 ou de l'IGF1 inhibe en partie l'augmentation de l'expression de GILZ et la mort cellulaire induite par la Dex (Grugan, *et al* 2008).

VI. LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Comme montré précédemment, le mécanisme d'action des glucocorticoïdes, et notamment de la Dexaméthasone, n'est pas encore totalement élucidé dans le myélome. Or, l'utilisation de la Dex dans le traitement du MM est très large et non ciblée. En effet, elle ne prend pas en compte l'hétérogénéité moléculaire du myélome. De plus, l'usage de la Dex est associé à un large éventail d'effets indésirables et est confronté à de nombreuses résistances.

Les études précédentes ont été réalisées sur un nombre restreint de lignées cellulaires et la spécificité de la réponse à la Dex en fonction des différentes entités moléculaires du MM n'avait jusqu'à présent pas été définie. Nous avons donc réévalué l'activité anti-tumorale intrinsèque de la Dex dans le MM en fonction des sous-groupes moléculaires du myélome. Pour cela, nous avons mené cette étude sur notre large cohorte de lignées cellulaires représentative de la diversité du MM. Aussi, afin d'améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires qui conduisent à l'induction de la mort cellulaire par la Dex, nous avons étudié l'implication des différents acteurs précédemment évoqués, le GR, GILZ et les protéines de la famille Bcl-2, dans la réponse à la Dex.

Nous avons ainsi mis en évidence lors de cette étude, la spécificité de la réponse à la Dex de deux sous-groupes moléculaires du myélome, et également une partie du mécanisme d'action de la Dex impliquant GILZ dans l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Résultats

I. Mécanismes de la mort cellulaire induite par la Dex et impact de l'hétérogénéité moléculaire du MM sur la réponse.

Article 1 : La mort cellulaire induite par la Dexaméthasone est restreinte à des sous-groupes moléculaires du myélome multiple spécifiques.

Comme décrit précédemment, le myélome multiple est une tumeur plasmocytaire incurable malgré des avancées thérapeutiques majeures. Cette pathologie regroupe plusieurs catégories de patients à fort impact pronostique basées sur les principales anomalies génétiques. La Dexaméthasone (Dex) est le glucocorticoïde le plus largement utilisée dans le traitement du MM. Cependant, en monothérapie, seule la moitié des patients répondent à la Dex. Grâce à notre large collection de lignées de MM, représentative de l'hétérogénéité moléculaire retrouvée chez les patients, nous avons mis en évidence que l'apoptose induite par la Dex dans les lignées de MM est restreinte aux sous-groupes moléculaires t(4;14) (MS) et t(14;16) (MF) associés à un mauvais pronostic, alors que le sous-groupe t(11;14) (CCND1) de pronostic neutre est résistant. Cette hétérogénéité de la réponse à la Dex a été confirmée *in vivo* dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée. Afin de comprendre cette hétérogénéité de la réponse, nous avons recherché les mécanismes moléculaires responsables de la sensibilité à la Dex. Nous avons démontré que l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) est un facteur limitant de la réponse à la Dex et que son expression est corrélée avec l'expression de l'oncogène MAF. Nous avons également montré que l'expression de la protéine GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) est induite par la Dex dans le MM et que cette induction est principalement dépendante du niveau d'expression du GR. Aussi, nous avons mis en évidence que GILZ et Bim sont nécessaires à l'induction dans la mort par la Dex. Enfin, nous avons montré que l'induction de GILZ est impliquée dans la régulation de l'expression de Bim dans le MM.

Cette étude a permis de mettre à jour, d'une part, que les sous-groupes moléculaires MF et CCND1 présentent une spécificité de réponse à la Dex bien différente, et d'autre part, l'importance du niveau d'expression du récepteur aux GCs et de l'induction de l'expression de GILZ et de Bim dans la réponse à la Dex. Ce travail souligne donc l'intérêt de continuer les investigations afin d'élucider complètement le mécanisme d'action des GCs dans le

myélome, et suggère que l'effet des GCs pourrait être réévalué en fonction des sous-groupes moléculaires du myélome, afin d'améliorer l'efficacité et de réduire les effets indésirables de ce traitement.

Dexamethasone-induced cell death is restricted to specific molecular subgroups of multiple myeloma

Charlotte Kervoëlen^{1,2}, Emmanuelle Ménoret¹, Patricia Gomez-Bougie^{2,3}, Régis Bataille², Catherine Godon⁴, Séverine Marionneau-Lambot⁵, Philippe Moreau^{2,3}, Catherine Pellat-Deceunynck^{2,3}, Martine Amiot^{2,3}

¹Myelomax, 8 quai Moncoussu, Nantes, France

²INSERM, UMR892, Nantes, France; University of Nantes, Nantes, France; CNRS, UMR 6299, Nantes, France

³Hematology Clinic, University Hospital, Nantes, France

⁴Hematology Laboratory, University Hospital, Nantes, France

⁵Plate-forme *in vivo*, Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France

Correspondence to:

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

Keywords: multiple myeloma, glucocorticoid, glucocorticoid receptor, GILZ, Bim

Received: March 27, 2015

Accepted: July 06, 2015

Published: July 16, 2015

ABSTRACT

Due to its cytotoxic effect in lymphoid cells, dexamethasone is widely used in the treatment of multiple myeloma (MM). However, only a subset of myeloma patients responds to high-dose dexamethasone. Despite the undeniable anti-myeloma benefits of dexamethasone, significant adverse effects have been reported. We re-evaluate the anti-tumor effect of dexamethasone according to the molecular heterogeneity of MM. We demonstrated that the pro-death effect of dexamethasone is related to the genetic heterogeneity of MM because sensitive cell lines were restricted to *MAF* and *MMSET* signature subgroups, whereas all *CCND1* cell lines ($n = 10$) were resistant to dexamethasone. We demonstrated that the glucocorticoid receptor expression was an important limiting factor for dexamethasone-induced cell death and we found a correlation between glucocorticoid receptor levels and the induction of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) under dexamethasone treatment. By silencing GILZ, we next demonstrated that GILZ is necessary for Dex induced apoptosis while triggering an imbalance between anti- and pro-apoptotic Bcl-2 proteins. Finally, the heterogeneity of the dexamethasone response was further confirmed *in vivo* using myeloma xenograft models. Our findings suggested that the effect of dexamethasone should be re-evaluated within molecular subgroups of myeloma patients to improve its efficacy and reduce its adverse effects.

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is an incurable plasma cell malignancy despite considerable improvements to survival due to the introduction of new drugs, such as proteasome inhibitors and immunomodulatory agents [1]. Glucocorticoids (GCs) are widely used in the treatment of MM, mainly in combination regimens. Among GCs, dexamethasone (Dex) is used in all phases of treatment, including induction, consolidation and maintenance. In 1992, Alexanian *et al* showed that high doses of Dex were effective in about half of untreated MM patients and that the efficacy of the combination of vincristine,

doxorubicin and dexamethasone was mainly due to the high doses of Dex [2]. Following the introduction of thalidomide, Dex has mainly been used in combination regimens because the combination of Dex with thalidomide demonstrates significantly superior response rates in newly diagnosed MM patients compared with Dex alone [3]. More recently, Dex associated with bortezomib and lenalidomide has appeared as the most promising drug association recommended for high-risk patients [4].

The effects of GCs occur through GC binding to the GC receptor GR, a member of the type I nuclear receptor superfamily. GR is transcribed from a single

gene, *NR3C1*, located on chromosome 5. However, GR actions are dependent on multiple receptor isoforms. Alternative splicing of GR pre-mRNA produces five distinct GR protein isoforms: the predominant full-length GR α , the dominant negative GR β , and the three less-well characterized and less abundant isoforms GR γ , GR-A and GR-P [5, 6]. Resistance to GCs is not fully understood because multiple molecular mechanisms are involved and are likely cell-type specific [7, 8]. However, altered or low-level GR expression accounts for inherent resistance to GCs [8]. Resistance may also occur downstream of GR. GCs bind GR, which then translocates to the nucleus and interacts with either GC-response elements to induce gene transcription (transactivation) or directly interacts with transcription factors, such as NF κ B or AP-1 to repress their activity (transrepression). The transactivation activity of GR is highly regulated and required for GC-induced apoptosis involving the intrinsic mitochondrial pathway [6, 9]. The *TSC22D3* gene encoding the GC-induced leucine zipper protein GILZ is one of the most strongly up-regulated genes by GCs [10]. An important overlap between the effect of GILZ and those of GCs was demonstrated, suggesting that GILZ is a critical mediator of the therapeutic effect of GCs [11–13]. GILZ protein is involved in numerous protein/protein interactions and thus regulates multiple signaling pathways, including NF- κ B and Ras [11–13].

Among the multiple candidate genes involved in GC-induced apoptosis, *BCL2L1*, which encodes the pro-apoptotic Bim protein, appears to be the most important. In 2003, *BCL2L1* was identified as a GC-induced death gene (18). Since that time, numerous studies have shown that Bim is a key mediator of GC-induced cell death in lymphoid cells [9, 14–16].

MM is molecularly heterogeneous, with chromosomal abnormalities that include full or partial deletions of chromosomes 13 or 17, amplification of 1q21, recurrent translocations of 14q32 or hyperdiploidy [17–19]. The recurrent 14q32 translocation and hyperdiploidy are associated with distinct gene expression profiles that define several groups, namely the HY, MS, CD-1/2 and MF groups, characterized by the hyperdiploid, *MMSET*, *CCND1* and *MAF* signatures, respectively. The MS and MF subgroups have been associated with poor overall survival [20, 21]. Although c-maf translocation is only found in 5 to 10% of patients, c-maf is overexpressed in approximately 50% of patients and is regulated both by the MEK and MMSET pathways [22, 23].

Because only 50% of untreated MM patients respond to high doses of Dex [2], our study was undertaken to re-evaluate the anti-tumor effect of Dex according to the molecular heterogeneity of MM patients using a large collection of myeloma cell lines ($n = 31$) that are representative of the molecular translocations found in patients.

RESULTS

The cellular response to Dex was correlated with the molecular subtype of human myeloma cell lines (HMCLs)

Although it is well accepted that Dex induces apoptosis in MM, the variability of the response among HMCLs with different genetic backgrounds harboring the main recurrent translocations has never been investigated. HMCLs were classified into MF, MS and CCND1 subgroups according to their IgH translocation (Supplementary Table S1). All HMCLs that did not present the main recurrent translocations leading to *MAF*, *MMSET* or *CCND1* over-expression were classified into the “Others” subgroup. Cell death induction was assessed across a panel of 31 HMCLs following Dex treatment for 72 hours. The dose of 1 μ M of Dex was chosen because there is no dose response effect in cell death induction for Dex concentrations ranging from 0.1 to 10 μ M (Supplementary Figure S1A). The ability of Dex to induce myeloma cell death was very heterogeneous within the different subgroups of HMCLs (Figure 1A, Supplementary Table S1). Dex-induced apoptosis was restricted to the MF and MS subgroups, with a mean number of apoptotic cells of 25% and 24%, respectively (Figure 1A). In contrast, no cell death was induced by Dex in any of the CCND1 HMCLs ($n = 10$). We first determined whether cell death was associated with caspase activation and PARP1 cleavage in a selected panel of cell lines, including Dex-sensitive (>15% cell death) and Dex-resistant HMCLs, which were representative of the molecular diversity of MM (Figure 1B). The results in Figure 1C showed that the activation of caspase 3 and the PARP1 cleavage were effective in all sensitive cell lines. Then, the effect of Dex was assessed in 19 primary myeloma cells, showing that cell death induction was highly heterogeneous from 0 to 96% (Table 1, Supplementary Figure S1B). Four samples harbored an IgH translocation, one with a t(14;16), one with a t(4;14) and two with a t(11;14). Of note, the MF and MS patient were sensitive (92% and 49% cell death respectively), whereas the CCND1 patients were resistant (2% and 4% cell death). Two samples at diagnosis appeared resistant to Dex, indicating that primary tumor cells could present an inherent resistance to Dex.

High *NR3C1* expression characterized the MF and hyperdiploid (HY) subgroups of myeloma patients

Because Dex exerts its action through the GR, we investigated GR expression by transcriptomic Affymetrix analysis of the *NR3C1* gene in the different HMCL subgroups. *NR3C1* gene expression was heterogeneous among the HMCL subgroups ($p = 0.02$); however, the MF and MS subgroups exhibited a higher expression

Table 1: Dex sensitivity and characteristics of primary myeloma cells

Patient characteristics				Dex sensitivity	FISH analysis		
Sample	Disease	Status	Origin	% cell death (1 μ M)	t (4;14)	t (14;16)	t (11;14)
1*	MM	R	BM	96	–	–	–
2	pPCL	D	PB	92	–	+	–
3*	MM	R	BM	87	–	–	–
4	pPCL	D	PB	84	–	–	–
5	MM	R	BM	60	–	–	–
6	MM	R	BM	58	–	–	–
7	MM	D	BM	49	+	–	–
8*	MM	D	BM	33	–	–	–
9	pPCL	D	PB	29	–	–	–
10	pPCL	D	PB	26	–	–	–
11	pPCL	D	PB	20	–	–	–
12	sPCL	R	PB	17	–	–	–
13*	MM	R	BM	8	–	–	–
14	MM	R	BM	8	–	–	–
15	MM	R	BM	4	–	–	+
16	sPCL	R	PB	2	–	–	+
17	sPCL	R	PB	0	–	–	–
18*	MM	D	BM	0	–	–	–
19	pPCL	D	PE	0	–	–	–

Abbreviations: MM, multiple myeloma; pPCL, primary plasma cell leukemia; sPCL, secondary plasma cell leukemia; D, diagnosis; R, relapse; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; PE, pleural effusion.

Plasma cells were purified (*) or not with CD138-immunomagnetic beads depending on the myeloma infiltration and the total number of cells. Cell death was assessed after 48 hours Dex treatment by the loss of CD138 staining.

compared with the CCND1 and Others subgroups (1.8-fold mean increase, $p = 0.002$) (Figure 2A). We also found that *NR3C1* expression was significantly higher in the MF subgroup compared with all other HMCLs (1.4-fold mean increase, $p = 0.029$) (Figure 2A). We then took advantage of the publicly available Affymetrix gene expression microarray data from 309 newly diagnosed MM patients to analyze *NR3C1* expression in the MF, MS, CCND1 and HY groups of patients, as previously defined [18]. We first noticed that none of the patients completely lacked *NR3C1* expression but that *NR3C1* levels were significantly different between the molecular subgroups ($p < 0.0001$). Of note, MF patients expressed significantly higher levels of *NR3C1* than all other subgroups (1.8-fold mean change, $p < 0.0001$) (Figure 2B), suggesting that the specific regulation of *NR3C1* expression may occur in MF patients. Moreover, HY patients expressed significantly higher levels of *NR3C1* than MS and CCND1 patients (1.3-fold mean increase, $p < 0.0001$) (Figure 2B), which may be explained by the localization of the *NR3C1*

gene on chromosome 5. Indeed, chromosome 5 trisomy is frequent in hyperdiploid MM [24].

Levels of GR expression appear to be a limiting factor for Dex-induced cell death

To deepen the understanding of Dex sensitivity, we established two Dex-resistant cell lines, NAN8DR and MM.1SDR, obtained by long-term culture of the parental cell lines with a low Dex concentration (Supplementary Figure S2). NAN8DR and MM.1SDR cells were characterized by an absence of cell death induction (0% cell death in both NAN8DR and MM.1SDR compared with 58% and 35% in the parental cell lines, respectively) associated with nearly no caspase activation and no PARP1 cleavage under Dex treatment (Supplementary Figure S2). In contrast, their sensitivity to bortezomib or lenalidomide was unchanged (Supplementary Figure S2). To determine whether long-term Dex treatment affected the GR levels in resistant cell lines compared with their respective parental

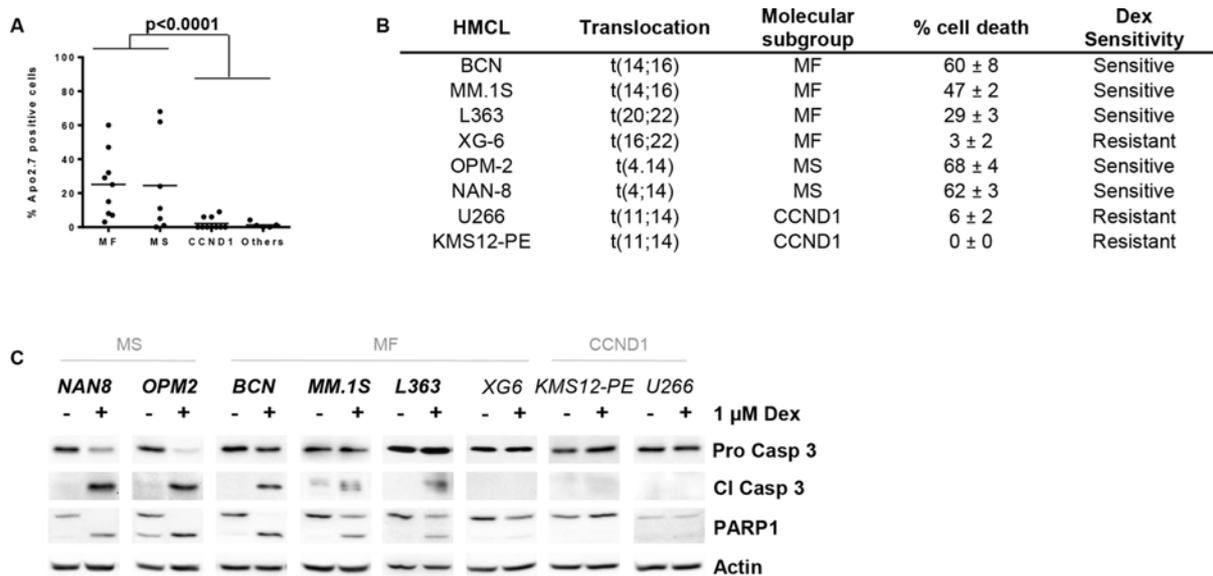


Figure 1: Dex sensitivity is heterogeneous and restricted to the MS and MF HMCL subgroups. **A.** HMCLs ($n = 31$) were treated with $1 \mu\text{M}$ Dex for 72 hours, and cell death was assessed by Apo2.7 staining. HMCLs were classified into 4 groups as follow: MS, MF, CCND1 and Others for no or no recurrent translocation cell lines. Of note, HMCLs harboring a t(14;20), t(20;22) or t(16;22) were included in the MF subgroup. Each symbol represents one HMCL. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. **B.** Characteristics of selected sensitive and resistant cell lines. Dex sensitivity was defined as follows: sensitive, $\geq 15\%$ apoptotic HMCL cells and resistant, $< 15\%$ apoptotic HMCL cells. **C.** Cell death signature was analyzed by immunoblotting after 24 hours of Dex treatment. Actin was used as a loading control.

cell lines, we assessed *NR3C1* levels by Q-PCR. NAN8DR and MM.1SDR cells expressed very low *NR3C1* levels compared with the parental cell lines (Figure 2C). We next compared the *NR3C1* levels in our selected panel of cell lines and showed that sensitive cell lines demonstrated higher *NR3C1* levels than resistant cell lines ($p = 0.036$) (Figure 2D). However, we noticed that among the resistant cell lines, KMS12-PE expressed higher *NR3C1* levels than other resistant cell lines. Additionally, with some exceptions, we showed a correlation between *NR3C1* mRNA expression and the pro-apoptotic effect of Dex (Figure 2E, $p < 0.0001$, $\text{Rho} = 0.70$). Finally, we found a correlation between *NR3C1* and *MAF* expression suggesting that *NR3C1* expression may be linked with *MAF* expression (Figure 2F, $p = 0.0012$, $\text{Rho} = 0.55$). In its inactive form, GR is located in the cytoplasm; once activated by GC, it is translocated to the nucleus [25]. Thus, we analyzed GR protein expression in the cytosolic fraction and its translocation to the nucleus. Dex treatment induces the total translocation of GR to the nuclear fraction irrespective of its endogenous level (Figure 2G). Altogether, these results suggested that low levels of GR appear to be one of the first limiting events in Dex resistance.

The strong up-regulation of GILZ was necessary for Dex-induced apoptosis

Using the same panel of HMCLs, we further investigated the expression of GILZ, a protein encoded

by the *TSC22D3* GC-transactivated gene. After Dex exposure, *TSC22D3* levels were up-regulated in most cell lines (Figure 3A). However, resistant cell lines failed to up-regulate *TSC22D3* to the same extent as sensitive cell lines (Figure 3A). Of note, a correlation was found between the levels of GR expression and Dex-induced *TSC22D3* up-regulation ($p = 0.03$, $\text{Rho} = 0.68$) (Figure 3B). Analysis of the GILZ protein under Dex treatment confirmed a stronger up-regulation of GILZ not only in sensitive cell lines but also in KMS12-PE cells, which expressed high levels of GR (Figure 3C). To assess whether GILZ may influence the Dex response, we next performed transient knockdown of GILZ in both OPM2 and BCN cell lines. Indeed, GILZ silencing strongly reduced Dex-induced apoptosis (54% decrease, $p = 0.008$) in OPM2 cell line (Figure 3D) and to a lesser extent in BCN (30% decrease, $p = 0.03$) (Supplementary Figure S3). However, this weaker effect on Dex-induced apoptosis in BCN compared to OPM2 is probably due to the less efficient GILZ silencing (40% versus 83% inhibition respectively). Altogether, these results highlighted the implication of GILZ in Dex-induced apoptosis.

GILZ was involved in Bim up-regulation and Bcl-x_L down-regulation associated with Dex-induced apoptosis in HMCLs

Among the pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, Bim, a BH3-only member, has frequently been identified

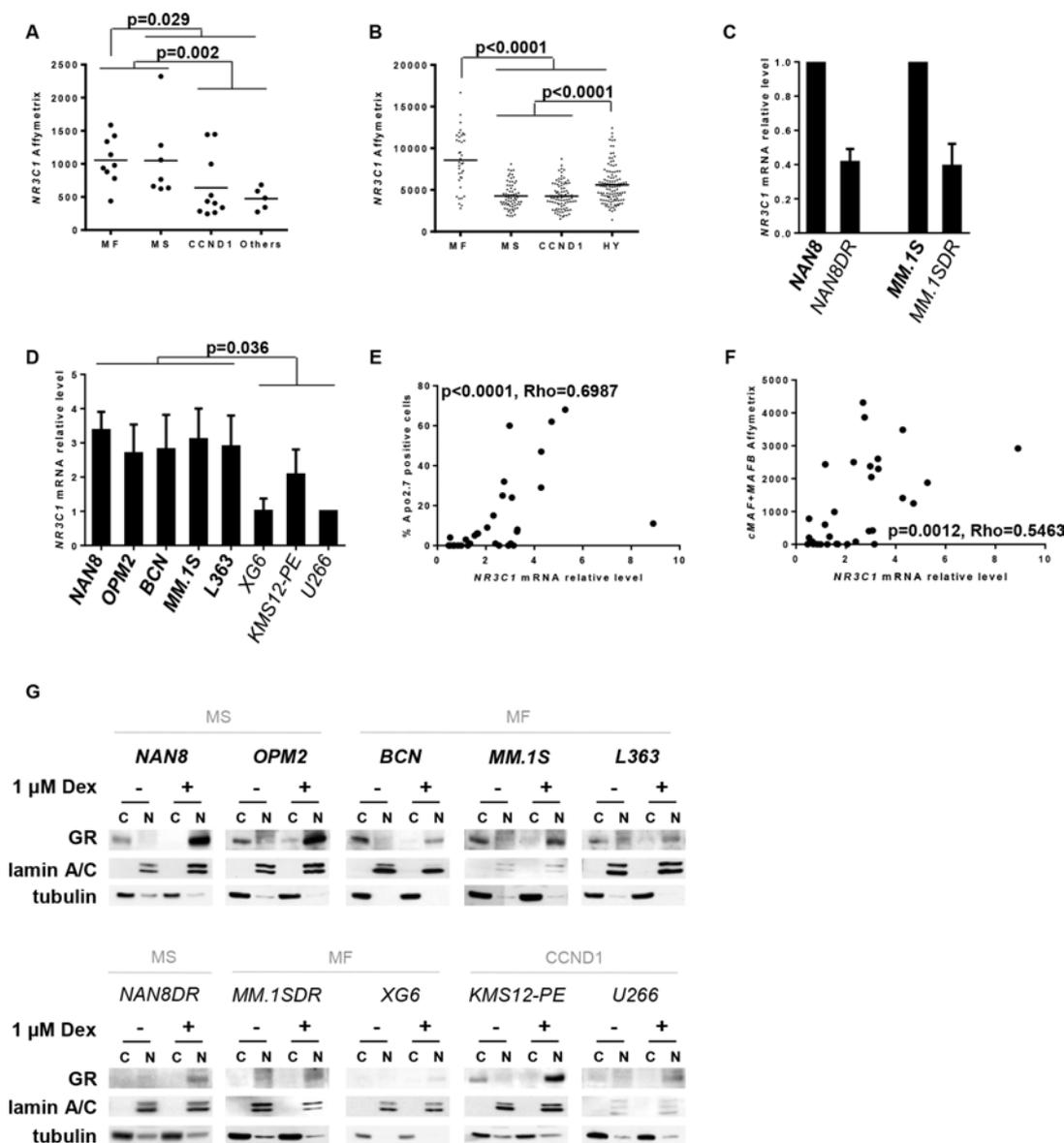


Figure 2: Analysis of both *NR3C1* gene and GR protein expression in myeloma subgroups. A, B. *NR3C1* gene expression of HMCLs and 309 newly diagnosed MM patients was assessed by transcriptomic Affymetrix analysis and plotted for the respective HMCL subgroups (A), or for the MF, MS, CCND1 and hyperdiploid (HY) patient groups (B) Each symbol represents one HMCL or one patient. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. C, D. *NR3C1* mRNA expression of Dex-resistant cell lines (C) and HMCL collection (D) was assessed by Q-PCR. *NR3C1* mRNA expression of generated Dex-resistant cell lines was normalized to *NR3C1* mRNA expression of the parental cell lines. *NR3C1* mRNA expression of HMCLs was normalized to *NR3C1* mRNA expression of U266 cell line. The mean \pm SD of 3 experiments is presented. Sensitive cell lines are indicated by thick characters, and resistant cell lines are indicated by thin characters. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. E, F. The relative *NR3C1* mRNA level was analyzed versus the percentage of Apo2.7-positive cells under Dex treatment (E) or versus *MAFB* Affymetrix expression (F). *MAFB* gene expression was assessed by addition of the *cMAFB* and *MAFB* values of transcriptomic Affymetrix expression. Spearman's rank correlation coefficients are indicated. G. After 24 hours of Dex treatment, the translocation of GR was assessed by analyzing the expression of GR in both the nuclear (N) and cytosolic (C) fractions. Each fraction (20 μ g) was subjected to western blot analysis for GR expression. Lamin A/C and tubulin were included as fraction purity markers. Sensitive cell lines are indicated as above.

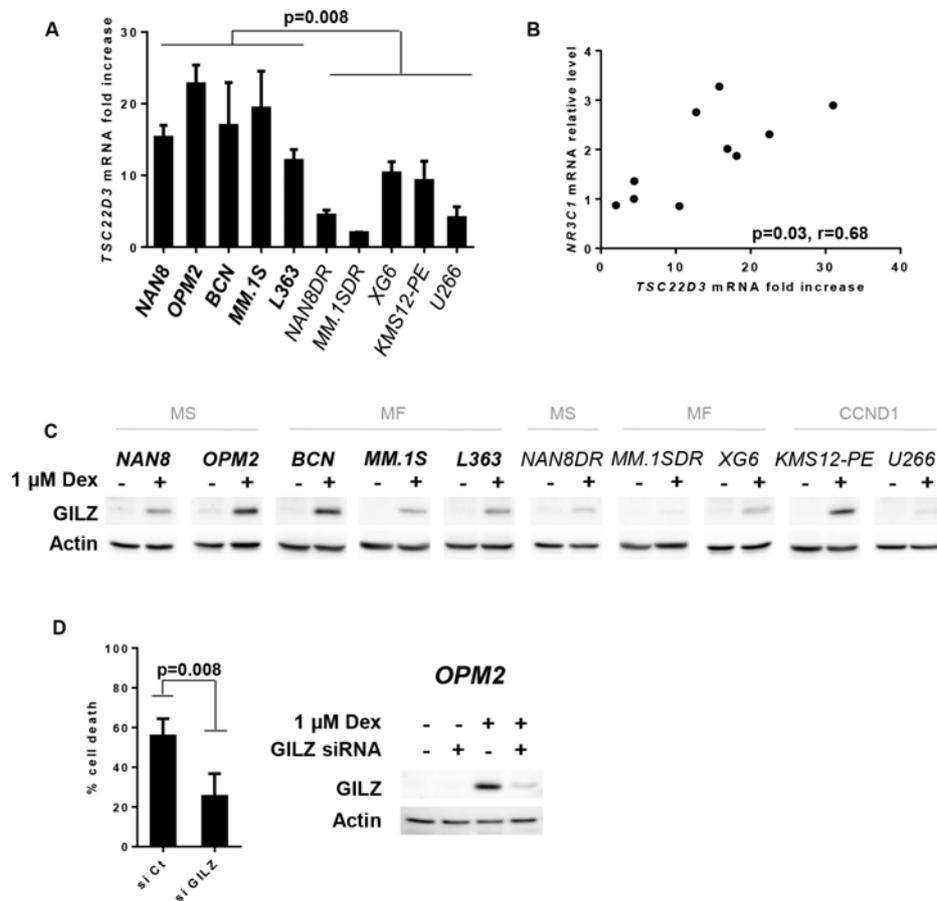


Figure 3: GILZ up-regulation is necessary for Dex-induced apoptosis. **A.** *TSC22D3* mRNA expression was assessed by Q-PCR after 24 hours of Dex treatment. *TSC22D3* mRNA induction was assessed by calculating the fold increase relative to the untreated cell line. The mean \pm SD of 3 experiments is presented. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. **B.** Analysis of the relative *NR3C1* mRNA level versus the fold increase of *TSC22D3* mRNA under Dex treatment. Spearman's rank correlation coefficient is indicated. **C.** Cell lines were treated with Dex for 24 hours and cell lysates were immunoblotted with a GILZ antibody. **D.** Following GILZ silencing, OPM2 cells were treated with Dex. Cell death was assessed by Apo2.7 staining after 48 hours of Dex treatment. Data represent the mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. After 16 hours of Dex treatment, GILZ silencing was analyzed by immunoblotting.

as one of the key mediators of GC-induced apoptosis [14–16]. In addition to Bim, Puma another BH3-only member was also shown to contribute to GC-induced apoptosis [15]. Furthermore, based on a previous microarray analysis in MM.1S cells [26], the *BCL2L1* gene that encodes Bcl-x_L was shown to be the only anti-apoptotic gene strongly down-regulated by Dex. We demonstrated that a strong up-regulation of all Bim isoforms occurred mainly in sensitive cell lines but also in KMS12-PE Dex-resistant cells (Figure 4A). When Puma was endogenously expressed in the HMCLs, we observed a weak Puma up-regulation in parallel to Bim up-regulation (Figure 4A). The anti-apoptotic Mcl-1 protein was not modulated with the exception of OPM2 where Mcl-1 is down-regulated. In contrast to Mcl-1, we showed that Bcl-x_L protein expression was strongly decreased in all Dex-sensitive HMCLs, whereas its expression was weakly modified in

Dex-resistant HMCLs (Figure 4A). These results may indicate that the apoptotic response is associated with an imbalance between pro- and anti-apoptotic proteins. We next demonstrated that Bim silencing in OPM2 cells caused a significant decrease in Dex-induced cell death (51%, $p = 0.004$) (Figure 4B). Finally, because the resistant KMS12-PE HMCL is characterized by an increase in Bim under Dex treatment but an absence of Bcl-x_L down-regulation, we silenced Bcl-x_L to determine whether its down-regulation could overcome Dex resistance. Despite the complete silencing of Bcl-x_L in KMS12-PE cells, Dex did not induce significant cell death, indicating that Bcl-x_L down-regulation concomitant to Bim up-regulation was not sufficient to counteract Dex resistance in this CCND1 HMCL (Figure 4C). Of interest, the silencing of GILZ impairs both Bim up-regulation and Bcl-x_L down-regulation under Dex treatment (Figure 4D). Finally,

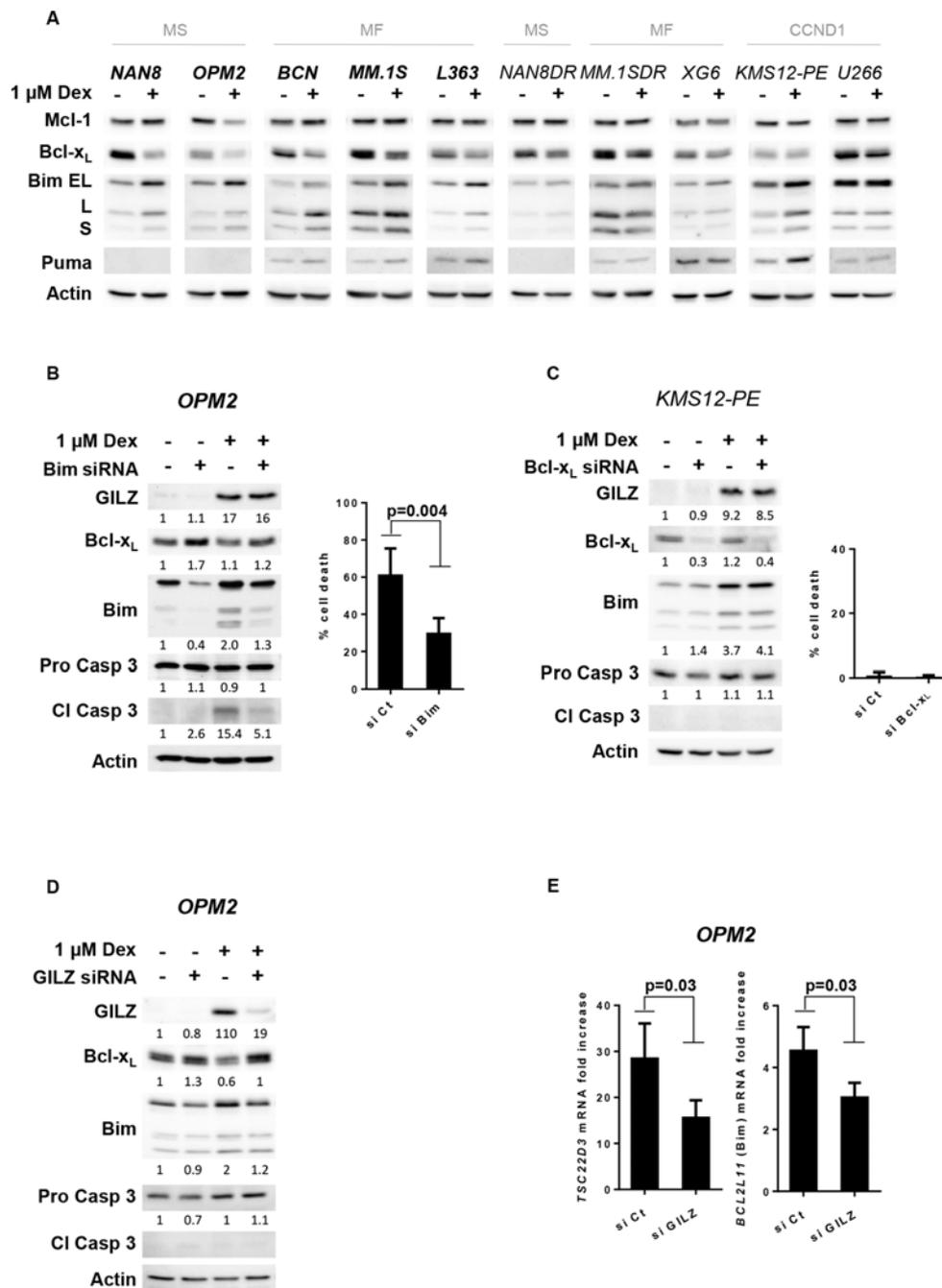


Figure 4: GILZ is involved in Bim up-regulation and Bcl-x_L down-regulation associated with Dex-induced apoptosis.

A. Cell lines were treated with Dex for 24 hours and lysates were immunoblotted with Mcl-1, Bcl-x_L, Bim and Puma antibodies. **B.** Following siRNA transfection, OPM2 cells were treated with Dex for 48 hours. The expression of Bim, Bcl-x_L, GILZ and caspase 3 were analyzed by immunoblotting and normalized (arbitrary unit) to actin expression. Apoptosis was quantified by Apo2.7 staining. The results show the mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **C.** Following siRNA transfection, KMS12-PE cells were treated with Dex for 48 hours. The protein expressions were analyzed by immunoblotting and normalized (arbitrary unit) using actin expression. Apoptosis was quantified by Apo2.7 staining. The results show the mean \pm SD of 3 independent experiments. **D.** GILZ was transiently silenced in OPM2 cells for 48 hours, before to be treated with Dex for 16 hours. The protein expressions were analyzed by immunoblotting and normalized (arbitrary unit) to actin expression. **E.** Following GILZ silencing, OPM2 cells were treated with Dex for 8 hours. *TSC22D3* and *BCL2L11* mRNA induction was assessed by calculating the fold increase relative to the untreated cell line. The mean \pm SD of 5 independent experiments is presented. Statistical analysis was performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

we demonstrated that GILZ silencing decreased *BCL2L1* (Bim) up-regulation at the transcriptional level (33% decrease, $p = 0.03$) (Figure 4E). Altogether, these results seem to indicate a pivotal role for GILZ in Dex-induced cell death through the regulation of the Bcl-2 protein network.

Dexamethasone reduced tumor cell growth of *in vitro* sensitive but not resistant cells

To assess whether the differential *in vitro* activity of Dex could reflect its *in vivo* activity, both Dex-sensitive (OPM2) and Dex-resistant (KMS12-PE) cell lines were xenografted into SCID mice. Mice were subcutaneously inoculated with 12×10^6 cells. When mice bore tumors of similar sizes, they were randomly separated into 2 groups and received either vehicle (control) or Dex (1 mg/kg) 5 days a week for 3 consecutive weeks (Figure 5). When the tumor sizes exceeded 2000 mm³, mice were sacrificed on day 19 and 17 for mice grafted with OPM2 and KMS12-PE cells respectively. Dex significantly inhibited OPM2 tumor growth (Figure 5A) ($p < 0.05$), but failed to reduce tumor growth of the *in vitro* resistant KMS12-PE cells (Figure 5B). Taken together, these data demonstrated that the *in vivo* pro-apoptotic Dex effect in pre-clinical myeloma models is related to *in vitro* Dex-induced cell death.

DISCUSSION

Because clinical practice has frequently been based on empirical studies, our study was undertaken to re-evaluate Dex, a conventional therapy, according to the molecular classification of MM patients. Our results

highlighted that the Dex pro-apoptotic effect was restricted to the MF and MS subgroups of HMCLs, whereas all other cell lines were totally resistant to Dex. In particular, all CCND1 HMCLs and primary samples were resistant to Dex-induced cell death. The analysis of Dex sensitivity in relation to *NR3C1* levels revealed that the MF subgroup expressed the highest levels of *NR3C1*, which may partially explain their stronger sensitivity to Dex. A previous study has also reported a link between GC and MAF showing that GC reduced c-maf protein levels via an ubiquitination-dependent degradation [27]. Nevertheless, more investigations will be necessary to explain the over-expression of *NR3C1* in the MF subgroup. In addition, the localization of the *NR3C1* gene on chromosome 5 probably explains the higher levels of *NR3C1* found in the HY subgroup compared with the MS and CCND1 subgroups because chromosome 5 trisomy is frequently found in hyperdiploid MM [24]. The generation of MF or MS Dex-resistant HMCLs after long-term exposure to Dex led to an important decrease in *NR3C1*, indicating that an *NR3C1* level seems necessary for Dex-induced apoptosis. To support this hypothesis, we showed a correlation between *NR3C1* levels and the apoptotic response in HMCLs. Consistently, a poor prognosis has been associated with low *NR3C1* expression in MM patients [28, 29]. In addition, we demonstrated that Dex induced the total translocation of GR to the nucleus in all HMCLs tested, even in resistant cell lines, showing that the ability of GR to translocate to the nucleus is not a limiting step in Dex resistance.

Many studies in hematopoietic cells, essentially in T and dendritic cells, have identified GILZ as one of the main GC-regulated genes [30, 31]. The GILZ promoter includes 6 GC-responsive element motifs that allow for GR

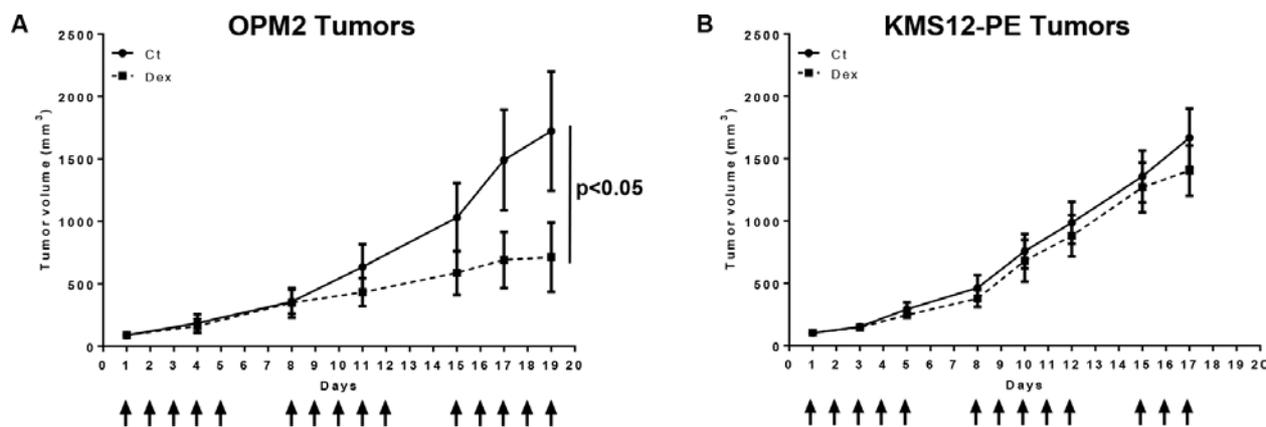


Figure 5: Dexamethasone reduces tumor cell growth of *in vitro* sensitive OPM2 but not resistant KMS12-PE cells in xenograft models. A. Dex treatment inhibited *in vivo* OPM2 tumor growth. Mice were subcutaneously injected with 12×10^6 OPM2 cells. The mice received either vehicle (Ct) or Dex (1 mg/kg, i.p.) 5 days per week for 3 consecutive weeks. Arrows indicate injections. The mice were then sacrificed on day 19. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test, followed by a Bonferroni post-test. B. Dex treatment did not affect *in vivo* KMS12-PE tumor growth. Mice were subcutaneously injected with 12×10^6 KMS12-PE cells and treated as above. The mice were then sacrificed on day 17. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test, followed by a Bonferroni post-test.

homodimer binding and transactivation [32]. In the present study, we demonstrated that Dex induced an up-regulation of GILZ in all HMCLs but that this up-regulation was significantly higher in sensitive cell lines. Furthermore, we found a correlation between *NR3C1* levels and *TSC22D3* mRNA up-regulation. This result reinforces the fact that GILZ expression was proposed as a reliable measure of GR function [33]. We also demonstrated that GILZ silencing induced a strong reduction in Dex-induced cell death. This is in agreement with a study from Grugan *et al* [34], which has already implicated GILZ in Dex-induced apoptosis. However, in this previous study, the reduction in Dex-induced cell death caused by GILZ silencing was very modest (10%). Altogether, these data now clearly indicate a pivotal role of GILZ in the induction of cell death by Dex. Although Dex-induced apoptosis required the contribution of multiple processes, modification of the Bcl-2 protein rheostat has been reported as a key process [35]. Particularly, BH3-only members have been shown to be important mediators of GC-induced apoptosis [14–16]. In our HMCL collection, we demonstrated that a strong Bim up-regulation associated with a weak Puma up-regulation occurs mainly in Dex-sensitive cell lines, but also in the Dex-resistant KMS12-PE cell line. We further demonstrated that Bim silencing led to a strong reduction in apoptosis, which confirms the important role of Bim in the cell death process induced by Dex. In parallel with Bim up-regulation, we observed a strong down-regulation of Bcl-x_L, which is restricted to sensitive HMCLs. Thus, an imbalance between anti- and pro-apoptotic molecules occurred, leading to a decrease in the apoptotic threshold in Dex-sensitive cell lines. Of interest, GILZ silencing provided evidence that GILZ contributed to the regulation of the Bcl-2 protein network by inducing Bim up-regulation and Bcl-x_L down-regulation. The regulation of Bcl-x_L by GILZ is in agreement with a previous study showing that Bcl-x_L is decreased in GILZ-overexpressing transgenic mice [36]. The implication of GILZ in Bim up-regulation remains an important question that deserves further investigation. Altogether, our data reinforce the importance of GILZ in the pro-apoptotic effect of GC in hematopoietic tumor cells.

Whereas CCND1 HMCLs have a low level of GR, which could in part account for their resistance to Dex, KMS12-PE cells exhibited a high level of GR, leading to both a significant induction of GILZ and up-regulation of Bim without the induction of apoptosis. Because Dex did not induce Bcl-x_L down-regulation in KMS12-PE cells as it did in other sensitive cell lines, we forced this down-regulation, showing that concomitant Bcl-x_L down-regulation, Bim up-regulation and GILZ induction were not sufficient to counteract the Dex resistance of KMS12-PE cells. We cannot rule out other factors that may contribute to the Dex response. Finally, the *in vivo* growth of myeloma cells in our mouse model confirmed the heterogeneity of Dex efficacy, which corroborated our *in vitro* findings. Indeed, whereas Dex led to a reduction of MS tumor

growth, Dex had no effect on CCND1 tumor growth. Of note, the dual action of GCs in survival has been reported [37, 38]. Indeed, it was demonstrated that although Dex induced the apoptosis of a large majority of primary leukemia cells from children with newly diagnosed acute leukemia, the survival of a subset of primary acute leukemia samples (32%) was increased by GCs [37]. Furthermore, our results seem to indicate that Dex had no pro-apoptotic effects on CCND1 myeloma cells both *in vitro* and *in vivo*, despite the presence of effective GR. Interestingly, the CCND1 subgroup has already been distinguished from other subgroups by its particular anti- and pro-apoptotic Bcl-2 member expression and its specific drug response [39, 40]. Altogether, these results indicated that both the MF and CCND1 subgroups presented important specificities that require better analysis during the course of the disease and the response to treatment. The risk/benefit of prolonged GC treatment should be re-evaluated to propose optimal treatments by GCs for each molecular group of MM.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, primary myeloma cells and culture conditions

HMCLs BCN, MDN, SBN, NAN-1, -6, -7, -8, -10 and XG-1, -2, -3, -5, -6, -7 were derived in our laboratory from primary myeloma cells in the presence of interleukin (IL)-6. ANBL-6 was kindly provided by Dr. Jelinek (Rochester, MN). KMS11, KMS12-BM, KMS12-PE, and KMM1 were kindly provided by Dr. Otsuki (Kurashiki, Japan). JJN3, JIM3, Karpas620, and MM.1S were, respectively, kindly provided by Drs. Van Riet (Brussels, Belgium), MacLennan (Birmingham, UK), Karpas (Cambridge, UK), and S. Rosen (Chicago, IL). AMO1, LP1, L363, NCI-H929, SKMM2, U266, and OPM2 were purchased from the DSMZ, and RPMI8226 from American Type Culture Collection. Each HMCL was characterized and identified as previously described [41–43].

After obtaining informed consent, blood or bone marrow samples from MM patients were collected at the Department of Hematology at the University Hospital of Nantes or at the Intergroupe Francophone du Myélome (ethical approval n° DC-2011–1399, Pr Rodat). Plasma cells were purified with CD138 immunomagnetic beads. The purity of the plasma cells was greater than 90%, as assessed morphologically or by CD138 staining.

Reagents

Dexamethasone was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and dissolved in ethanol at 1 mM as a stock solution. For the *in vivo* study, Dex was dissolved in ethanol and then in PBS at a final Dex concentration of 0.2 mg/ml, with a final ethanol concentration of less than 3%.

Cell death assays

The evaluation of cell death in HMCLs was performed by flow cytometry using Apo2.7 staining. Cell death in primary myeloma cells was measured after 48 hours of culture in RPMI-1640 containing 5% FCS with or without Dex (1 μ M) by assessing the loss of CD138 staining, as previously described [42].

Establishment of Dex-resistant cell lines

To establish Dex-resistant cell lines, NAN8 and MM.1S cells were continuously treated with Dex beginning with a dose of 0.001 μ M. After cells displayed a viability of 80% under continuous exposure to a low Dex concentration, the drug dose was doubled. This process was repeated until cells were cultured in a Dex concentration of 10 μ M. Prior to the experiments, the cells were cultured in Dex-free medium for 5 days before use.

Immunoblotting

Western blotting analyses were performed as previously described [44]. The following antibodies were used: caspase-3 (E-8), GR (E-20), lamin A/C (E-1), GILZ (FL-134), Mcl-1 (S-19) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Puma (D30C10) (Cell Signaling Technology, Saint Quentin, France), tubulin (GE Healthcare Life Sciences, Velizy, France), Bcl-x_L (BD Transduction Laboratories, Rungis, France), Bim, PARP1 (Ab-2) and actin (Merck Chemicals, Nottingham, UK). Protein expression was quantified and normalized to actin expression using ImageJ software.

RNA interference assays

Control nontargeted siRNA, siBim and siGILZ were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), and siBcl-x_L was purchased from Thermo Scientific (Ilkirch, France). OPM2 cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies, St Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated at 1×10^6 cells per well in a 6-well plate. After 24 hours, 100 pmol siRNA was transfected into the cells using Lipofectamine RNAiMAX reagent. Cells were incubated for 72 hours for siBim and 48 hours for siGILZ before being subjected to various analyses. KMS12-PE and BCN cells were transfected using the Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza, Cologne, Germany). The cell pellet was resuspended with 100 μ l solution F (Lonza) containing 100 pmol siRNA and electroporated using the CA137 or the DN100 program for KMS12-PE and BCN, respectively. After 24 hours, the cells were treated with Dex.

Affymetrix gene expression

Gene expression analyses of newly diagnosed MM patients were performed with the publicly available

Affymetrix Amazonia database (<http://amazonia.transcriptome.eu/>). HMCL gene expression analyses were performed with the RAGE database. The probes used for analyses were as follows: 211671_s_at for the *NR3C1* gene, 209348_s_at for the *cMAF* gene and 218559_s_at for the *MAFB* gene.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR

RNA extraction, reverse transcription and Q-PCR were performed as previously described [45]. TaqMan gene expression assays for *NR3C1* (Hs00353740_m1), *TSC22D3* (Hs00608272_m1), *BCL2L1* (Hs00708019_s1) and *RPL37A* (Hs01102345_m1, housekeeping gene) were obtained from Applied Biosystems (Life Technologies, St Aubin, France).

Cell fractionation

Cell fractionation was performed using a Nuclear Extraction kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) by following the manufacturer's protocol. Briefly, the cytosolic fraction was first obtained after lysis using a hypotonic buffer. Then, the nuclear fraction was obtained after 30 minutes incubation with a nuclear extraction buffer.

Xenotransplant

Female, beige, 6-week-old SCID mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Mice were bred and housed in the Experimental Therapeutic Unit (UTE, SFR Bonamy, Nantes, France) under animal care license n°44565. OPM2 or KMS12-PE tumors were generated by implanting 12×10^6 cells in 100 μ l of PBS/Matrigel (1:1, Corning) in the right flank above the hind leg [46]. The tumor volume was recorded in three dimensions using a digital caliper and calculated as the length x width x depth. When the mice bore similar tumor sizes (approximately 100 mm³), they were randomly separated into 2 groups (6 mice per group) and received an intraperitoneal injection (i.p.) of either vehicle (PBS-diluted ethanol) or Dex (1 mg/kg) 5 days a week for 3 consecutive weeks. Animals were sacrificed when their tumor sizes reached 2000 mm³.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Spearman, Wilcoxon matched-pairs signed rank or a two-way ANOVA test.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tumorothèque IRCNA (CHU and ICO, Nantes, France) for providing us with purified myeloma cells.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflict of interest.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from Actions Cancer 44.

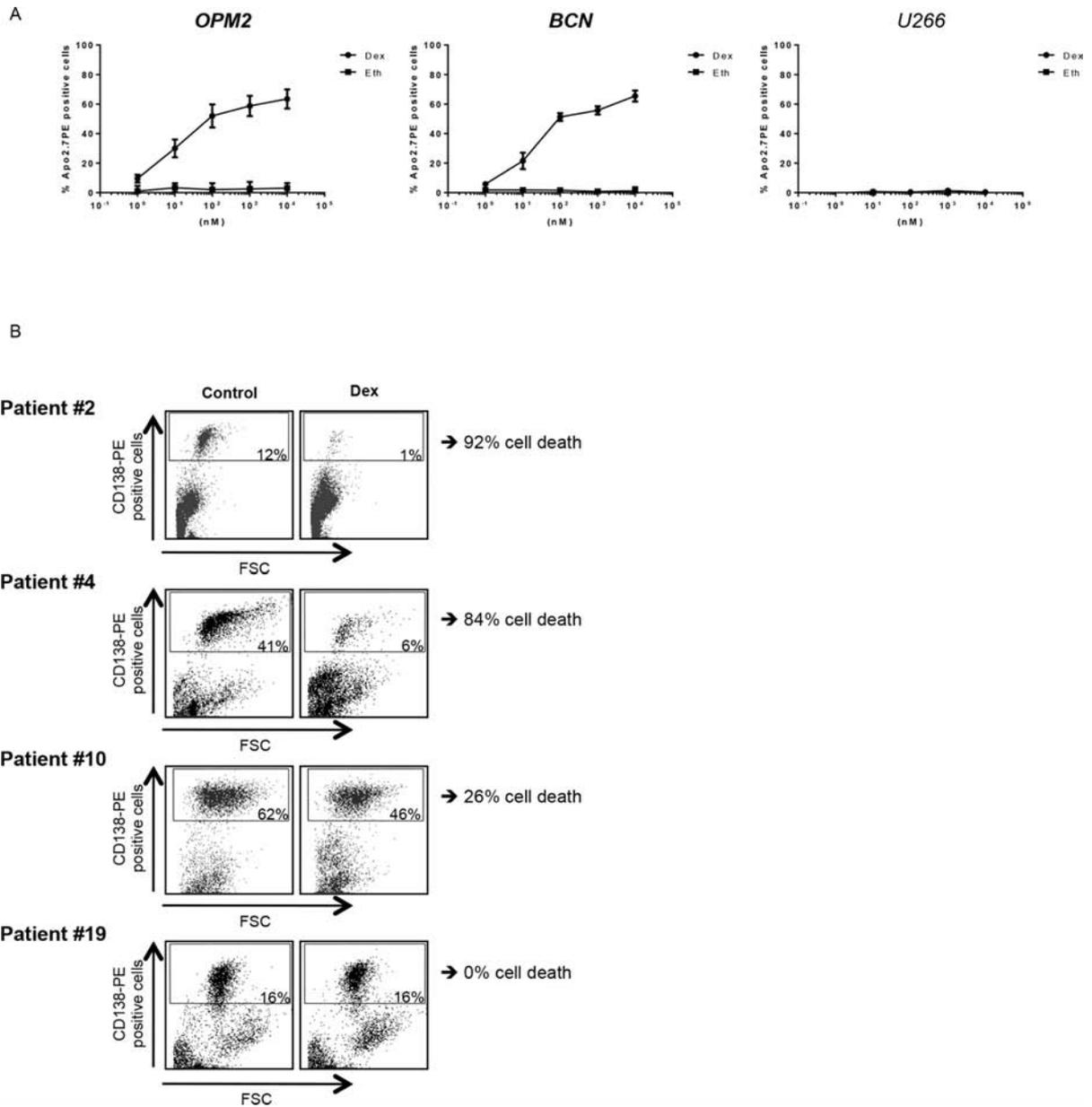
REFERENCES

1. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008; 111:2516–2520.
2. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992; 80:887–890.
3. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR Eastern Cooperative Oncology G. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24:431–436.
4. Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *International journal of hematology*. 2013; 97:313–323.
5. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015; 22:20–32.
6. Smith LK, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Progress in brain research*. 2010; 182:1–30.
7. Gruver-Yates AL, Quinn MA, Cidlowski JA. Analysis of glucocorticoid receptors and their apoptotic response to dexamethasone in male murine B cells during development. *Endocrinology*. 2014; 155:463–474.
8. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009; 300:7–16.
9. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2002; 9:6–19.
10. Rainer J, Lelong J, Bindreither D, Mantinger C, Ploner C, Geley S, Kofler R. Research resource: transcriptional response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Molecular endocrinology*. 2012; 26:178–193.
11. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009; 23:3649–3658.
12. Beaulieu E, Morand EF. Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011; 7:340–348.
13. Ayroldi E, Macchiarulo A, Riccardi C. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014; 28:5055–5070.
14. Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279:55809–55817.
15. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells *in vivo*. *Blood*. 2005; 106:4131–4138.
16. Bachmann PS, Gorman R, Mackenzie KL, Lutze-Mann L, Lock RB. Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. *Blood*. 2005; 105:2519–2526.
17. Herve AL, Florence M, Philippe M, Michel A, Thierry F, Kenneth A, Jean-Luc H, Nikhil M, Stephane M. Molecular heterogeneity of multiple myeloma: pathogenesis, prognosis, and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011; 29:1893–1897.
18. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006; 108:2020–2028.
19. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*. 2013; 4:2186–2207.
20. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillemin G, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007; 109:3489–3495.
21. Nair B, van Rhee F, Shaughnessy JD Jr, Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A, Alsayed Y, Waheed S, Crowley J, Barlogie B. Superior results of Total Therapy 3 (2003–33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006–66 with VRD maintenance. *Blood*. 2010; 115:4168–4173.
22. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in

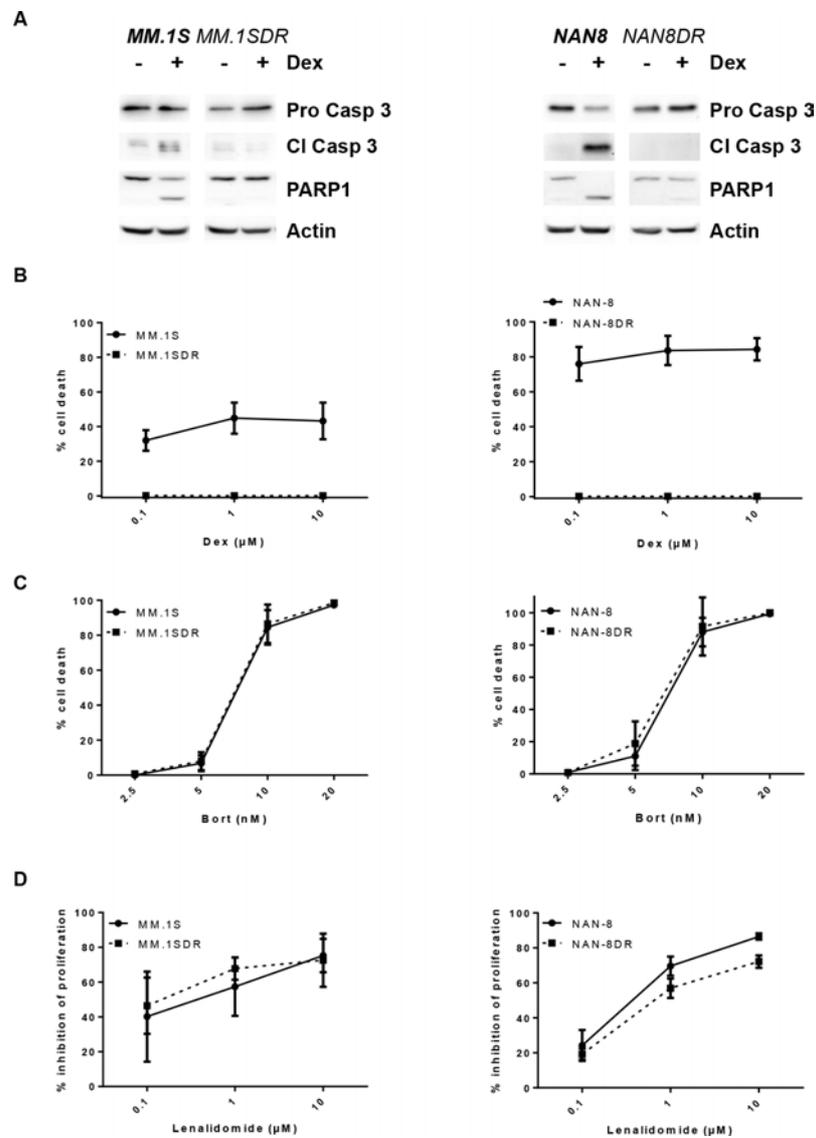
- multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer cell*. 2004; 5:191–199.
23. Annunziata CM, Hernandez L, Davis RE, Zingone A, Lamy L, Lam LT, Hurt EM, Shaffer AL, Kuehl WM, Staudt LM. A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression. *Blood*. 2011; 117:2396–2404.
 24. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Hayman SR, Buadi FK, Dingli D, Knudson RA, Greenberg A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Lust JA, Kyle RA, Bergsagel L, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012; 119:2100–2105.
 25. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic*. 2012; 13:364–374.
 26. Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, Podar K, Gupta D, Richardson P, Schlossman RL, Krett N, Chen LB, Munshi NC, Anderson KC. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene*. 2002; 21:1346–1358.
 27. Mao X, Stewart AK, Hurren R, Datti A, Zhu X, Zhu Y, Shi C, Lee K, Tiedemann R, Eberhard Y, Trudel S, Liang S, Corey SJ, Gillis LC, Barber DL, Wrana JL, et al. A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate c-maf expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin. *Blood*. 2007; 110:4047–4054.
 28. Murakami T, Togawa A, Satch H, Katoh M, Imamura Y, Ohsawa N, Takaku F. Glucocorticoid receptor in multiple myeloma. *European journal of haematology*. 1987; 39:54–59.
 29. Heuck CJ, Szymonifka J, Hansen E, Shaughnessy JD Jr, Usmani SZ, van Rhee F, Anaissie E, Nair B, Waheed S, Alsayed Y, Petty N, Bailey C, Epstein J, Hoering A, Crowley J, Barlogie B. Thalidomide in total therapy 2 overcomes inferior prognosis of myeloma with low expression of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18:5499–5506.
 30. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, D'Adamio F, Riccardi C. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood*. 2001; 98:743–753.
 31. Cannarile L, Zollo O, D'Adamio F, Ayroldi E, Marchetti C, Tabilio A, Bruscoli S, Riccardi C. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell death and differentiation*. 2001; 8:201–203.
 32. Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoeuche D, Zennaro MC, Bertoglio J, Pallardy M. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood*. 2004; 104:215–223.
 33. Thiagarajah AS, Eades LE, Thomas PR, Guymer EK, Morand EF, Clarke DM, Leech M. GILZ: Glitzing up our understanding of the glucocorticoid receptor in psychopathology. *Brain research*. 2014; 1574:60–69.
 34. Grugan KD, Ma C, Singhal S, Krett NL, Rosen ST. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008; 110:244–254.
 35. Ploner C, Rainer J, Niederegger H, Eduardoff M, Villunger A, Geley S, Kofler R. The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22:370–377.
 36. Delfino DV, Agostini M, Spinicelli S, Vito P, Riccardi C. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood*. 2004; 104:4134–4141.
 37. Gundisch S, Boeckeler E, Behrends U, Amtmann E, Ehrhardt H, Jeremias I. Glucocorticoids augment survival and proliferation of tumor cells. *Anticancer research*. 2012; 32:4251–4261.
 38. Al-Wadei HA, Takahasi T, Schuller HM. PKA-dependent growth stimulation of cells derived from human pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelium by dexamethasone. *European journal of cancer*. 2005; 41:2745–2753.
 39. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Leveson JD, Souers AJ, Maiga S, Bene MC, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28:210–212.
 40. Gomez-Bougie P, Amiot M. Apoptotic machinery diversity in multiple myeloma molecular subtypes. *Frontiers in immunology*. 2013; 4:467.
 41. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maiga S, Hose D, Goldschmidt H, Jauch A, Reme T, Jourdan M, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011; 96:574–582.
 42. Surget S, Chiron D, Gomez-Bougie P, Descamps G, Menoret E, Bataille R, Moreau P, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer research*. 2012; 72:4562–4573.
 43. Maiga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, Menoret E, Kervoelen C, Vie H, Cesbron A, Moreau-Aubry A, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015.

44. Gomez-Bougie P, Bataille R, Amiot M. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *European journal of immunology*. 2004; 34:3156–3164.
45. Maiga S, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Gratas C, Moreau P, Le Gouill S, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. Paradoxical effect of lenalidomide on cytokine/growth factor profiles in multiple myeloma. *British journal of cancer*. 2013; 108:1801–1806.
46. Tessoulin B, Descamps G, Moreau P, Maiga S, Lode L, Godon C, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood*. 2014; 124:1626–1636.

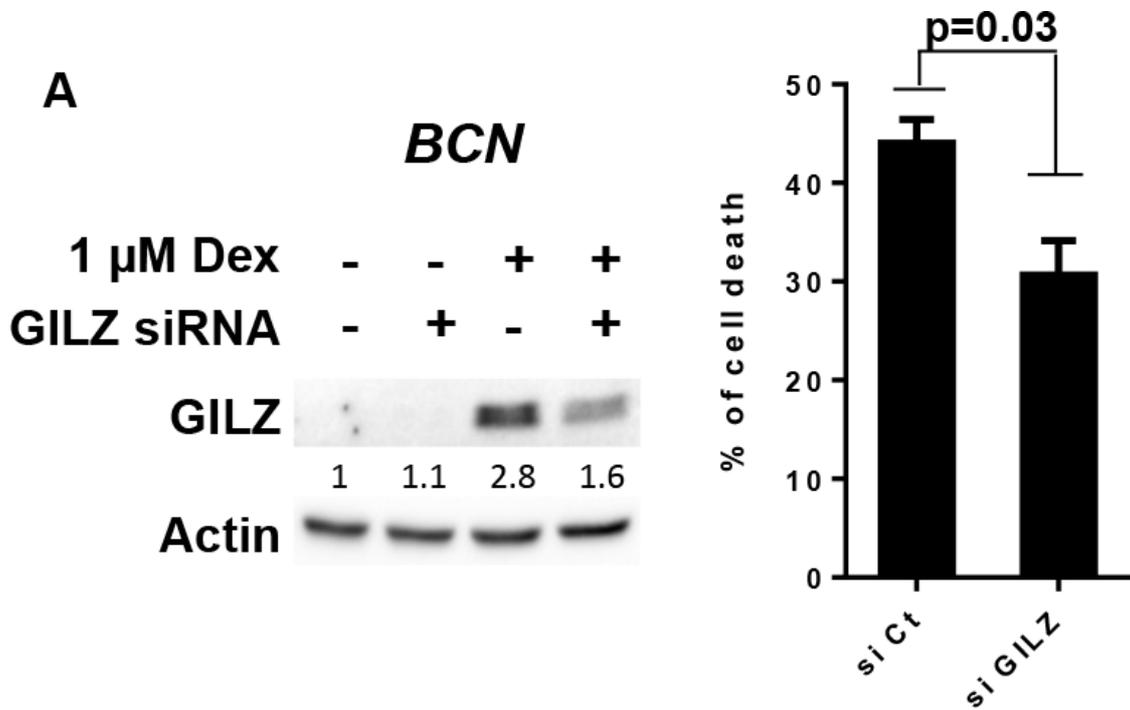
SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLE



Supplementary Figure S1: A. OPM2, BCN and U266 cell lines were treated with Dex concentrations ranging from 1 to 10^4 nM Dex for 72 hours and cell death was assessed by Apo2.7 staining. B. Dex sensitivity of patient samples was assessed by measure of the loss of CD138 expression after 48 hours of $1 \mu\text{M}$ Dex.



Supplementary Figure S2: A. Cell death signature was analyzed by immunoblotting after 24 hours of Dex treatment. Actin was used as a loading control. **B. Dex-induced cell death** was assessed by Apo2.7 staining after 72 hours of treatment with 0.1, 1 or 10 μM of Dex. Data represent the mean ($\pm\text{SD}$) of 4 experiments. **C. Bortezomib induced cell death** were assessed by Apo2.7 staining after 48 hours of treatment. Data represent the mean ($\pm\text{SD}$) of 4 experiments. **D. Inhibition of proliferation** induced by 72 hours of Lenalidomide treatment was assessed by measurement of incorporation of [^3H] Thymidine. Myeloma cells (10^4 cells/well) were cultured in triplicate in 96-well plates for 72 hours. Cells were pulsed with 1 μCi [^3H]thymidine for the last eight hours of culture. The uptake of [^3H]thymidine was monitored using a 1450-Microbeta Jet beta-counter. Data represent the mean ($\pm\text{SD}$) of 4 experiments.



Supplementary Figure S3: A. Following GILZ silencing, BCN cells were treated with Dex. Cell death was assessed by Apo2.7 staining after 48 hours of Dex treatment. Data represent the mean \pm SD of 5 independent experiments. Statistical analysis was performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. After 16 hours of Dex treatment, GILZ silencing was analyzed by immunoblotting.

Supplementary Table S1: Characteristics of the HMCL cohort

HMCL name	Translocation	Molecular subgroup	% cell death	Dex Sensitivity
BCN	t(14;16)	MF	60 ± 8	Sensitive
MM.1S	t(14;16)	MF	47 ± 2	Sensitive
ANBL6	t(14;16)	MF	32 ± 6	Sensitive
L363	t(20;22)	MF	29 ± 3	Sensitive
RPMI8226	t(14;16)	MF	25 ± 2	Sensitive
NAN6	t(14;20)	MF	15 ± 3	Sensitive
JJN3	t(14;16)	MF	8 ± 3	Resistant
NAN1	t(14;16)	MF	7 ± 4	Resistant
XG6	t(16;22)	MF	3 ± 2	Resistant
MM.1SDR	t(14;16)	MF	0 ± 0	Resistant
OPM2	t(4;14)	MS	68 ± 4	Sensitive
NAN8	t(4;14)	MS	62 ± 3	Sensitive
JIM3	t(4;14)	MS	24 ± 5	Sensitive
KMS11	t(4;14)	MS	11 ± 1	Resistant
NCI-H929	t(4;14)	MS	5 ± 4	Resistant
LP1	t(4;14)	MS	1 ± 1	Resistant
NAN8DR	t(4;14)	MS	0 ± 0	Resistant
XG7	t(4;14)	MS	0 ± 0	Resistant
SKMM2	t(11;14)	CCND1	9 ± 1	Resistant
Karpas620	t(11;14)	CCND1	6 ± 4	Resistant
U266	t(11;14)	CCND1	6 ± 2	Resistant
NAN7	t(11;14)	CCND1	0 ± 2	Resistant
XG1	t(11;14)	CCND1	0 ± 1	Resistant
KMS12-BM	t(11;14)	CCND1	0 ± 0	Resistant
KMS12-PE	t(11;14)	CCND1	0 ± 0	Resistant
MDN	t(11;14)	CCND1	0 ± 0	Resistant
NAN10	t(11;14)	CCND1	0 ± 0	Resistant
XG5	t(11;14)	CCND1	0 ± 0	Resistant
XG3	t(14;?)	Others	4 ± 4	Resistant
XG2	t(12;14)	Others	1 ± 4	Resistant
SBN	t(14;?)	Others	1 ± 1	Resistant
KMM1	t(6;14)	Others	0 ± 0	Resistant
AMO1	t(12;14)	Others	0 ± 0	Resistant

The MM cell lines ($n = 31$) and the two resistant-induced cell lines were screened for the effect induced by Dex 1 μM for 72 hours. Cell death was assessed by Apo2.7 staining. Dex sensitivity was defined as follow: sensitive, \geq to 15% apoptotic HMCL cells.

II. Lignées résistantes à la Dex

1) Etablissement et authentification des lignées résistantes

Dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans la résistance à la Dex, nous avons établi deux lignées résistantes à partir de lignées parentales sensibles. Pour cela, nous avons cultivé les cellules avec de faible concentration de Dex. Lorsque la viabilité cellulaire était acceptable, les doses de Dex ont été augmentées progressivement jusqu'à atteindre une concentration de 10 μM . Ce procédé nécessite une culture des cellules sur une longue période. En effet, il faut en fonction de la lignée, entre 4 et 8 mois pour l'élaboration d'une lignée totalement résistante. Au bout de ce processus, nous avons vérifié l'identité de nos lignées résistantes, afin de nous assurer qu'elles dérivent bien des lignées parentales sensibles à la Dex, en utilisant la méthode décrite dans l'article 2.

Article 2: Un algorithme simple, basé sur la cytométrie de flux, pour l'authentification de routine des lignées cellulaires de myélome multiple et de lymphome à cellules du manteau.

Au laboratoire nous travaillons simultanément avec une large collection de lignées de MM ce qui augmente le risque de faire des erreurs d'identification ou des contaminations croisées entre les lignées. Ceci pourrait conduire à la publication de fausses interprétations. Pour éviter ce genre d'erreurs, le comité international d'authentification des lignées cellulaires recommande d'utiliser la méthode du profile de « Short Tandem Repeat » (STR) qui compare des loci spécifiques de l'ADN. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée pour l'identification des lignées cellulaires en routine. C'est pourquoi une méthode rapide et peu coûteuse de ré-identification des lignées après chaque décongélation ou établissement de résistance est nécessaire. Nous avons donc décrit une méthode simple impliquant le typage des antigènes d'histocompatibilité HLA (Human Leucocyte Antigen) et un phénotypage, pouvant être utilisé pour la réauthentification de routine par cytométrie en flux. Cette méthode utilise un algorithme qui est basé sur l'expression du HLA-A*02 et sur l'expression mutuellement exclusive des chaînes légères des immunoglobulines kappa ou lambda, puis sur l'expression sélective de quelques marqueurs.

A Simple Flow Cytometry-Based Barcode for Routine Authentication of Multiple Myeloma and Mantle Cell Lymphoma Cell Lines

To the Editor:

CELL lines are widely used in laboratories for in vitro experiments, especially for investigating abnormal hallmarks in cancer cells and identifying therapeutic targets. Human cell lines are typically derived in academic laboratories from a wide range of cancer samples. To achieve a representation of intra-cancer heterogeneity, several laboratories, including ours, have established cell line collections. However, the establishment and maintenance of such collections significantly increase the risk of cross-contaminations and misidentification of cell lines, leading to the publication of false data/interpretation (1). In addition to the risk of cross-contamination, widely used cell lines can be described in contrasting manners for a particular feature (e.g., the JN3 myeloma cell line appears either *TP53^{wt}* or *TP53^{KO}*, depending on the article), suggesting that cell lines may have been misidentified. ICLAC, the international cell line authentication committee, recommends cell lines authentication using single tandem repeat (STR) profiles that are usually performed by suppliers (2). Nevertheless, while cell lines are frozen and thawed at least four times per year, STR profile is assessed upon receipt of cell lines but not for routine assessment of cell lines identity. Because cross-contaminations might happen, a rapid and low-cost method for re-identification after each thawing of cells is required, as it is for mycoplasma detection.

In this letter, we describe a simple and low cost method involving human leukocyte antigen (HLA) typing and phenotyping that could be used for routine re-authentication using flow cytometry. HLA typing is an international worldwide nomenclature dedicated to blood transfusion and organ transplant that identifies the HLA alleles carried by an individual

(3,4). Initially performed for research projects in immunology, HLA Class I typing appears to be very useful for identification of cell lines (5,6). The genomic typing is performed at the generic (e.g., HLA-A*02) or specific (e.g., HLA-A*02:01) level with the generic typing usually being sufficient to identify cell lines within a dedicated collection. This genomic identification is particularly useful upon the inclusion of new cell lines within a collection and also for the establishment of derivatives such as drug-resistant cell lines, which could indicate the emergence of cryptic contaminating resistant cells within the parental cell lines. Our laboratory currently uses a large number of both human multiple myeloma cell lines (HMCLs, $n = 17$) and mantle cell lymphoma cell lines (MCLCLs, $n = 8$) that we have collected from ATCC, DSMZ, or from academic laboratories (7–9). Multiple myeloma (MM) and mantle cell lymphoma (MCL) are plasma cell and B cell malignancies, respectively. Independently of the global characterization of cell lines (karyotype, gene expression profile, characterization of *TP53*, and *RAS* mutations), the HLA Class I typing shown in Supporting Information Table S1 confirms that the cell lines examined were derived from independent individuals (7). To routinely check their identity using flow cytometry, we generated an algorithm that is based on HLA-A*02 expression and on the mutually exclusive expression of the kappa or lambda light chain of immunoglobulin. We used HLA-A*02 expression because HLA-A*02 is the most frequent allele in the population and because a specific mAb is commercially available. Expression of HLA-A*02, either positive or negative, segregated cell lines into two groups: kappa or lambda expression then segregated the cell lines into 2–3 subgroups (Tables 1 and 2). A minimum of markers with a global, stable, and selective expression (absent/present or low/bright expression) was then defined within each subgroup. As shown in Table 1

Grant sponsor: Actions Cancer 44.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Catherine Pellat-Deceunynck, INSERM, UMR892, Nantes, F-44000, France.

E-mail: catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr
 Sophie Maïga, Carole Brosseau, Géraldine Descamps, Christelle Dousset, and Patricia Gomez-Bougie contributed equally to this work.

Published online 16 February 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22643

© 2015 International Society for Advancement of Cytometry

Table 1. Algorithm for HMCLs.

HMCL	HLA-A*02	c-KAPPA	c-LAMBDA	CD81	CD45	CD137	FGFR3	CD117	CD33	CD9	CD27	CD106	TOTAL
KARPAS620	+++	++	-	++	-	-	-	+	-	++	-	-	2
JIM3	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
U266	+++	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3
KMM1	++	-	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	3
L363	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	4
KMS11	-	++	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	3
NCIH929	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+ ^a	-	-	3
AMO1	-	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	3
JJN3	-	++	-	+++	-	-	-	+ ^a	-	+++ ^a	-	-	3
SKMM2	-	++	-	+++	-	-	-	-	++ ^a	-	-	-	3
OPM2	-	-	++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	3
LP1	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
RPMI8226	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	3
MM1S	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	3
ANBL6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+ ^a	-	-	5
KMS12BM	-	-	- ^b	+	-	-	-	-	-	+++	++	-	4
KMS12PE	-	-	- ^b	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	4

^aExpressed by a subpopulation.

^bKMS12BM and KMS12PE are non-secreting cell lines derived from the same patient and express no detectable level of lambda protein (both are weakly *lambda* positive at the mRNA level).

"Total" indicates the minimum number of markers required for cell line identification (the required markers are indicated by gray shaded areas). Expression was determined using flow cytometry. The monoclonal antibodies (mAbs) used were PE-conjugated, except for CD117 and FGFR3 mAbs (APC conjugated) and for CD45 mAb (FITC conjugated). The level of expression was defined by calculating the ratio of fluorescence (specific staining over matched-conjugated isotype staining).

Ratio <2: -.
 2 < ratio <10: +.
 10 < ratio <50: ++.
 Ratio >50: +++.

and Figure 1A, the HLA-A*02-cytoplasmic kappa/lambda algorithm segregates HMCLs into five groups of 1–7 cell lines. To further identify HMCLs within each group, we looked for surface markers differentially expressed across cell lines. We used gene expression profile to select molecules either acquired or lost by malignant plasma cells and thus heterogeneously expressed by myeloma cells across both patients and cell lines (7,10,11). We found nine markers (CD9, CD27, CD33, CD45, CD81, CD106, CD117, CD137, FGFR3) that were usually absent or present in an entire HMCL population and efficient in segregating cell lines within the groups (Fig. 1A). Of note, some of them (CD27, CD33, CD45, CD117, or FGFR3) are well-known myeloma-related deregulated markers. The use of clonally related markers, such as HLA-A*02 and kappa/lambda, may also help to identify cross-contaminations that may occur after initial genomic authentication. As shown in Table 2 and Figure 1B, the HLA-A*02-surface kappa/lambda algorithm in association with the differential expression of CD28, CD40, or CD5 discriminates the eight MCLCLs (the MAVER-1 and MINO cell lines are discriminated using the differential levels in lambda and CD5 expression). Thus, HMCLs and MCLCLs are identified using at least two (e.g., KARPAS620 or JEKO-1) and at most five markers (ANBL-6).

Our authentication procedure of cell lines can be performed in one half-day and does not require DNA. Moreover,

flow cytometry is powerful for the detection of very low cross-contamination, which might increase during culture time and repetitive freezing and thawing of cells. This algorithm can also be used for STR-certified cell lines for which HLA Class I

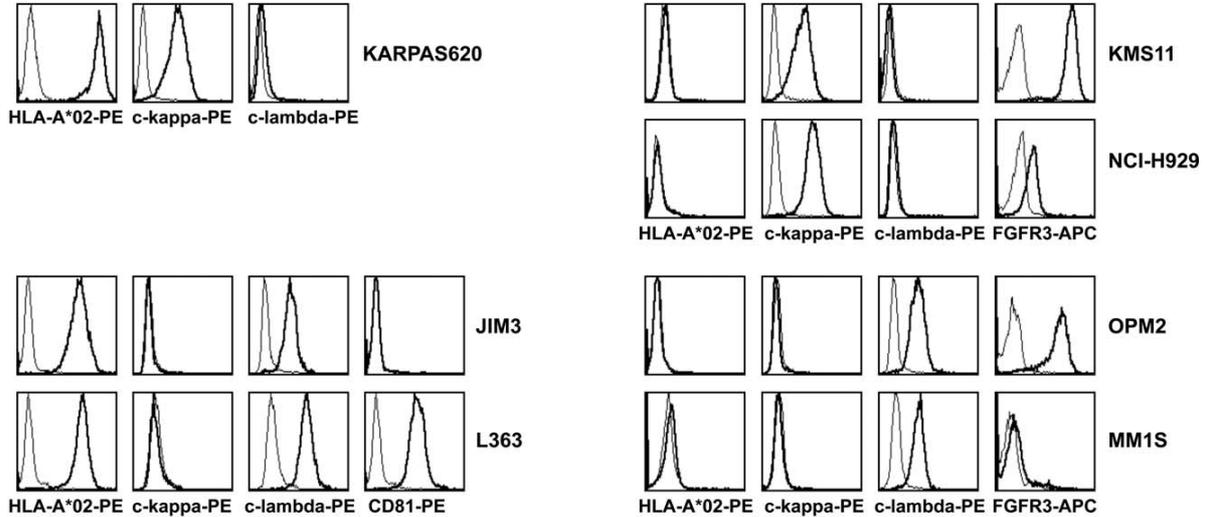
Table 2. Algorithm for MCLCLs

MCLCL	HLA-A*02	KAPPA	LAMBDA	CD28	CD40	CD5	TOTAL
JEKO-1	++	++	-	-	+	+	2
GRANTA-519	+++	-	++	+	+	-	3
JVM2	++	-	+	-	+	-	3
REC-1	-	++	-	-	+	-	3
UPN-1	-	+++	-	-	-	-	3
Z138	-	-	+++	-	+	-	3
MAVER-1	-	-	+++	-	+	+	3
MINO	-	-	++	-	+	++	3

"Total" indicates the minimum number of markers required for cell line identification (the required markers are indicated by gray shaded areas). Expression was determined using flow cytometry. The monoclonal antibodies (mAbs) used were PE-conjugated, except for CD40 mAb (FITC conjugated). The level of expression was defined by calculating the ratio of fluorescence (specific staining over matched-conjugated isotype staining).

Ratio <2: -.
 2 < ratio <10: +.
 10 < ratio <50: ++.
 Ratio >50: +++.

A. HMCLs



B. MCLCLs

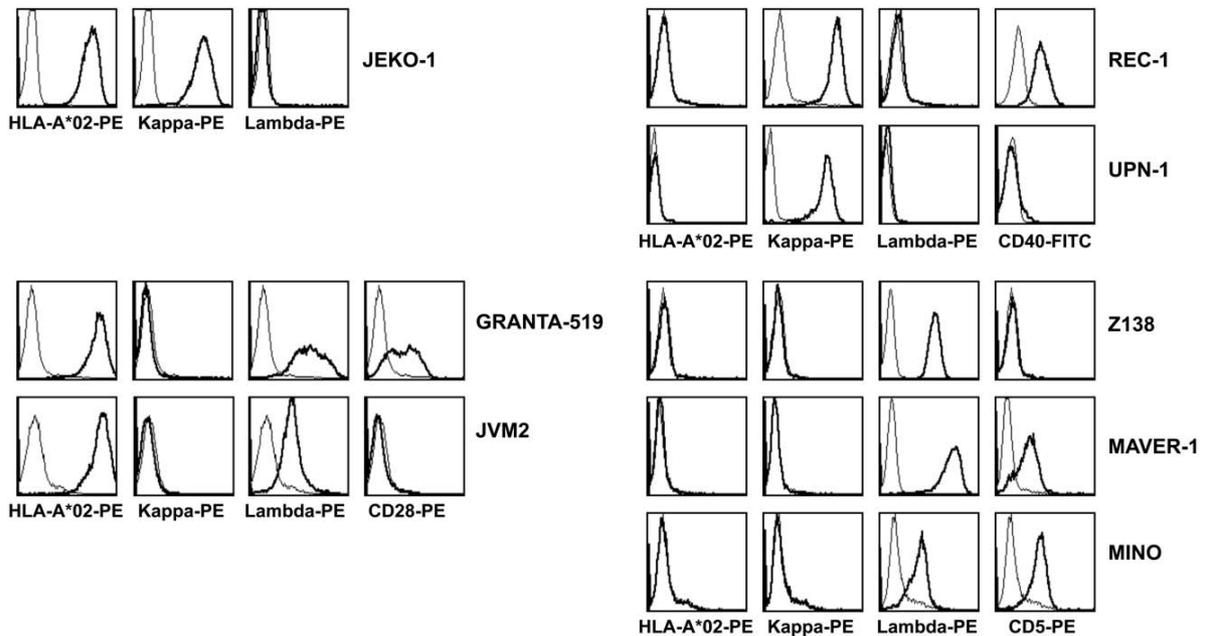


Figure 1. Histograms represent the overlay of specific staining (thick line) over control staining (thin line) in HMCLs (A) or MCLCLs (B). The monoclonal antibodies (mAbs) used were purchased from Beckman Coulter or Becton Dickinson: they were PE-conjugated, except for CD117 and FGFR3 mAbs (APC conjugated) and for CD117 and CD45 mAbs (FITC conjugated). Cytoplasmic kappa (c-kappa) and c-lambda staining was performed after the permeabilization of cells using the Intraprep Permeabilization Reagent Kit (Beckman Coulter). A single color staining was performed for all markers. Fluorescence acquisition (20,000 events were acquired) and analysis were performed using FACScalibur (Becton Dickinson) and Cell Quest software (PT CytoCell, SFR Bonamy, Nantes, France).

typing is unknown because flow cytometry directly assesses HLA-A*02 expression. This HLA-A*02-based algorithm is applicable not only to other types of B-cell malignancies but

also to other types of cell line collections if both type-specific (such as kappa/lambda for B cells) and selective markers are provided.

Sophie Maïga,^{1,2,3,4} **Carole Brosseau**,^{1,2,3,4}
Géraldine Descamps,^{1,2,3}
Christelle Dousset,^{1,2,3,5}
Patricia Gomez-Bougie,^{1,2,3,4} **David Chiron**,^{1,2,3,4}
Emmanuelle Ménoret,⁶
Charlotte Kervoelen,^{1,2,3,6} **Henri Vié**,^{1,2,3,4}
Anne Cesbron,⁷ **Agnès Moreau-Aubry**,^{1,2,3}
Martine Amiot,^{1,2,3,4}
Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2,3,4*}
¹INSERM, UMR892, Nantes F-44000, France
²Université de Nantes, Nantes F-44000, France
³CNRS, UMR 6299, Nantes F-44000, France
⁴CHU Nantes, Nantes F-44000, France
⁵Centre d'investigation Clinique, CHU de Nantes, Nantes F-44000, France
⁶Myelomax SAS, Nantes, France
⁷Laboratoire d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, Nantes F-44000, France

LITERATURE CITED

1. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 2010;127:1–8.

2. Dirks WG, MacLeod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int J Cancer* 2010;126:303–304.

3. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75:291–455.

4. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, et al. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:846–848.

5. Pellat-Deceunynck C, Jegou G, Harousseau JL, Vié H, Bataille R. Isolation of human lymphocyte antigens class I-restricted cytotoxic T lymphocytes against autologous myeloma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:705–709.

6. Adams S, Robbins FM, Chen D, Wagage D, Holbeck SL, Morse HC III, Stronck D, Marincola FM. HLA class I and II genotype of the NCI-60 cell lines. *J Transl Med* 2005;3:11.

7. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, Goldschmidt H, Jauch A, Reme T, Jourdan M, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011;96:574–582.

8. Brosseau C, Dousset C, Touzeau C, Maïga S, Moreau P, Amiot M, Le Gouill S, Pellat-Deceunynck C. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. *Cell Death Dis* 2014;5:e1389.

9. Touzeau C, Dousset C, Bodet L, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Moreau A, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Le Gouill S. ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2high/Mcl-1low profile and synergizes with other antineoplastic agents. *Clin Cancer Res* 2011;17:5973–5981.

10. Bataille R, Jegou G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234–1240.

11. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, et al. Report of the European myeloma network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431–438.

Table S1. Generic HLA-Class I typing of human myeloma and mantle cell lymphoma cell lines

HMCL	A	B	Cw
JIM3	02	27	02
		40	03
KARPAS620	02	44	05
KMM1	02	40	03
	24	52	12
L363	02	07	03
	31	40	07
U266	02	07	03
	03	40	07
AMO1	26	44	01
	33	54	14
ANBL-6	01	51	12
	03	52	12
JJN3	03	07	07
	33	14	08
KMS11	24	51	01
		54	14
KMS12BM	26	35	03
	33	44	14
KMS12PE	26	35	03
	33	44	14
LP1	03	07	07
	24	18	07
MM1S	23	18	12
	24	42	17
SKMM2	30	49	07
	68	51	07
NCIH929	26	18	07
	30	35	07
OPM2	24	07	04
		15	07
RPMI8226	30	15	02
	68	15	03

MCLCL	A	B	Cw
GRANTA-519	02	07	06
	02	50	07
JEKO-1	02	51	14
JVM2	02	07	03
	68	55	07
MAVER-1	24	38	05
	26	44	12
MINO	11	35	04
	68	39	12
REC-1	01	35	04
	03	57	06
UPN-1	24	07	07
	32	18	07
Z138	01	08	05
	23	44	12

2) Caractérisation de la résistance des lignées

A. La résistance à la Dex est persistante dans le temps.

Dans le but d'étudier la résistance acquise des lignées que nous avons établies, MM.1SDR et NAN8DR, nous avons voulu voir si cette résistance est réversible. Pour cela, nous avons cultivé ces lignées sur une longue période en absence de Dex et mesuré l'induction de mort après 72 heures de traitement par la Dex à différents temps (Figure 17).

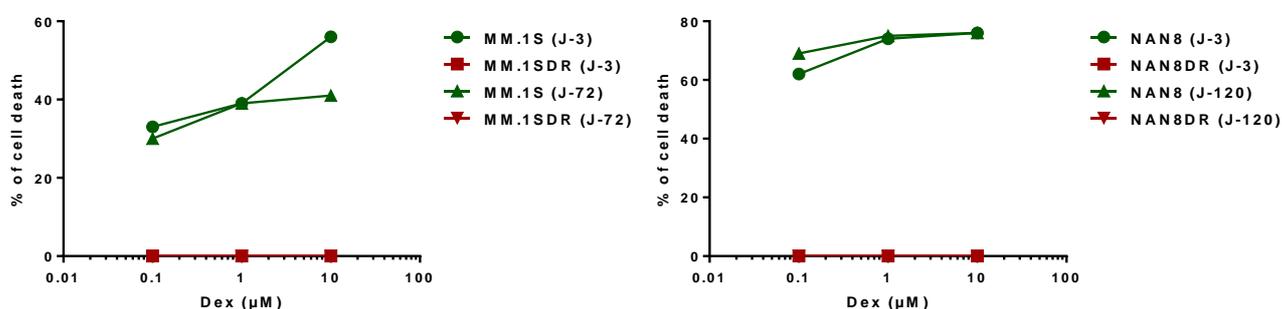


Figure 17 : Les lignées résistantes après une longue exposition à la Dex le sont toujours après 4 mois de culture sans Dex.

La mort induite par des concentrations de 0.1, 1 et 10 μM de Dex a été évaluée par marquage de l'Apo2.7 après 72 heures de traitement sur les lignées parentales ainsi que sur les lignées résistantes après 3 jours (J-3), 72 jours (J-72) ou 120 jours (J-120) de retrait de la Dex de la culture.

Nous observons que malgré l'absence de pression par la Dex durant 72 jours pour MM.1SDR, ou 120 jours pour NAN8DR, le traitement par la Dex n'induit pas de mort cellulaire sur ces lignées, alors que les lignées parentales répondent toujours à la Dex. La résistance acquise par l'exposition prolongée à la Dex de nos lignées MM.1SDR et NAN8DR persiste malgré l'absence de pression, ce phénomène semble donc être irréversible.

B. La diminution irréversible de l'expression du GR inhibe le mécanisme de mort induit par la Dex.

Nous avons déjà montré que la résistance des lignées MM.1SDR et NAN8DR est due à une forte diminution de l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Article 1). Nous avons donc voulu vérifier si la diminution de l'expression du GR est sous le contrôle de

la Dex et donc réversible par la levée de la pression, ou bien, s'il s'agit de la sélection de clones présentant un faible niveau d'expression du GR. Pour cela, nous avons analysé l'expression du gène *NR3C1* à différents temps après le retrait de la Dex de la culture des lignées résistantes (Figure 18).

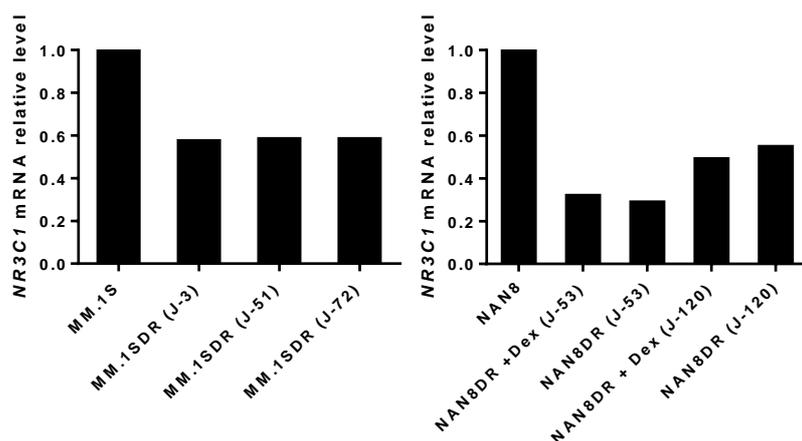


Figure 18 : L'expression de *NR3C1* est fortement et durablement diminuée dans les lignées résistantes.

L'expression du gène codant le GR, *NR3C1*, a été analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport à la lignée parentale. Pour MM.1SDR, les mesures ont été effectuées à 3, 51 et 72 jours après le retrait de la Dex, et pour NAN8DR à 53 et 120 jours après retrait, ou non (+Dex), de la Dex.

Malgré le retrait de la Dex du milieu de culture, le niveau d'expression de *NR3C1* reste fortement diminué par rapport à la lignée parentale dans les deux exemples. Le mécanisme impliqué dans la diminution de l'expression de *NR3C1* n'est donc pas levé par le simple retrait de la pression. De manière intéressante, nous n'observons pas de différence d'expression de *NR3C1* entre la lignée NAN8DR cultivée en présence et celle cultivée en absence de Dex. Ceci nous conduit donc à penser que des clones présentant un faible niveau d'expression du GR ont été sélectionnés lors de l'exposition prolongé à la Dex.

Afin de vérifier que le faible niveau d'expression du GR est le premier facteur limitant la réponse à la Dex, nous avons analysé l'induction de l'expression génique de GILZ et de Bim par la Dex dans la lignée résistante NAN8DR à différents temps après le retrait de la pression de sélection. En guise de contrôle, nous avons en parallèle maintenu des cellules NAN8DR en présence permanente de Dex (NAN8DR + Dex).

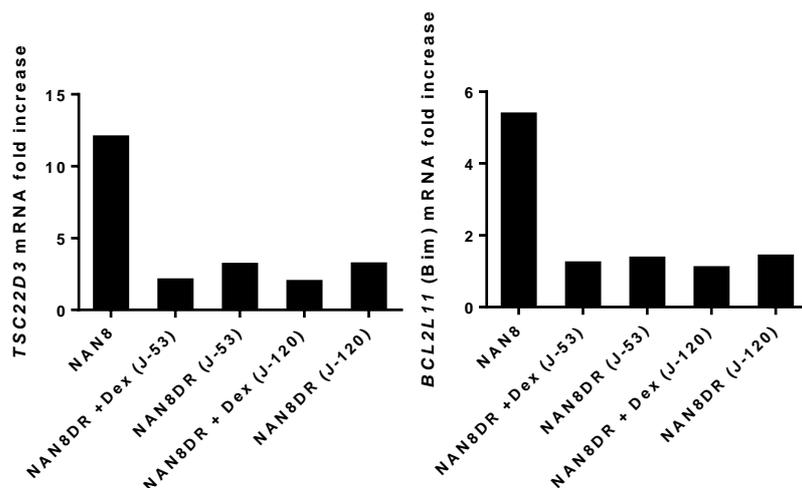


Figure 19 : L'induction de l'expression de GILZ et de l'expression de Bim est inhibée dans le temps.

L'expression des gènes codant pour GILZ, *TSC22D3*, et pour Bim, *BCL2L11*, a été analysée par RT-qPCR dans la lignée NAN8DR après 24h de traitement à 1 μ M de Dex. L'induction de l'expression des gènes a été exprimée par rapport au contrôle non traité. Les mesures ont été effectuées à 53 et 120 jours après retrait, ou non (+ Dex), de la Dex.

Nous observons donc une absence d'induction de l'expression de GILZ ainsi que de Bim même après 120 jours de retrait de la pression par la Dex. Ceci semble donc confirmer que le faible niveau d'expression du GR des cellules sélectionnées après une longue exposition à la Dex est bien le premier facteur limitant dans la réponse à la Dex en ne permettant pas l'induction de l'expression de GILZ et de Bim.

3) Les lignées résistantes à la Dex : Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons donc validé l'identité de nos lignées résistantes à la Dex, mais nous avons également montré que cette résistance serait le résultat de la sélection de clones présentant un faible niveau d'expression du GR et qu'il s'agit d'un phénomène irréversible dans le temps. Il sera alors primordial de suivre le niveau d'expression du GR des cellules de MM provenant de patients traités par les GCs sur une longue période afin de s'assurer qu'une telle sélection ne se produise. Aussi, il sera intéressant d'effectuer de plus amples analyses de la régulation de l'expression du gène *NR3C1* dans nos lignées résistantes. En effet, la compréhension de ce mécanisme aboutira peut être à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de rétablir un niveau d'expression du GR suffisant pour induire une réponse.

III. La dépendance à l'IL-6 des lignées n'a pas d'impact sur la réponse à la Dex.

Au cours de cette étude nous avons évalué l'effet anti-tumoral de la Dex sur un panel de lignées cellulaires de MM dont certaines ont été dérivées en présence d'IL-6. L'analyse de leur réponse en fonction de leur dépendance à l'IL-6 ne montre pas de différence significative (Figure 20).

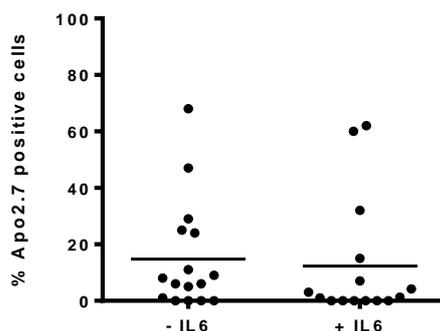


Figure 20 : La dépendance à l'IL-6 des lignées cellulaires de MM n'influence pas la mort cellulaire induite par la Dex.

La mort cellulaire a été évaluée après 72 heures de traitement par 1 μ M de Dex après marquage à l'Apo2.7.

Afin d'évaluer l'effet de la dépendance à l'IL-6 sur la réponse à la Dex, nous avons établi des lignées indépendantes à l'IL-6 à partir de lignées dépendantes. Pour cela, nous avons réduit progressivement les concentrations d'IL-6 de la culture jusqu'à obtenir des lignées complètement indépendantes à l'IL-6. Nous avons ainsi obtenu trois lignées indépendantes à l'IL-6, dont deux à partir de lignées sensibles à la Dex, NAN8 et BCN, appartenant aux sous-groupes MS et MF, respectivement ; et la troisième à partir d'une lignée CCND1 résistante à la Dex, MDN. La réponse à la Dex de ces lignées a été évaluée après 72 heures de traitement par la Dex (Figure 21).

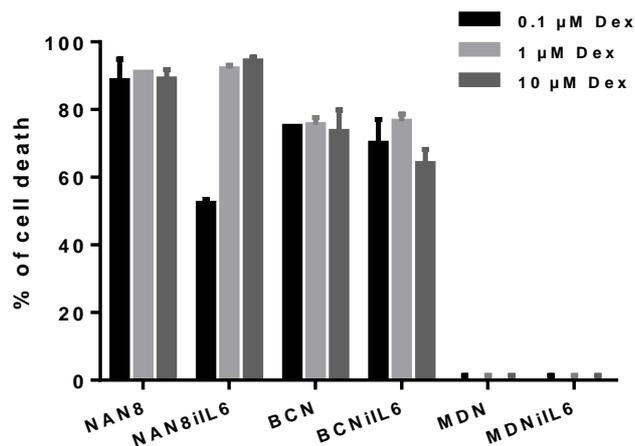


Figure 21 : L'indépendance à l'IL-6 ne modifie pas la réponse à la Dex de lignées initialement dépendantes à l'IL-6.

Les lignées indépendantes à l'IL-6 (iIL6), ainsi que leur lignée parentale respective, ont été traitées par 0,1, 1 et 10 μM de Dex pendant 72 heures. La mort cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après marquage à l'Apo2.7.

Malgré l'indépendance à l'IL-6 acquise par les lignées, celles-ci répondent à la Dex de la même manière que leur lignée parentale dépendante à l'IL-6. La dépendance à l'IL-6 des lignées n'a donc pas d'effet sur la réponse à la Dex que ce soit dans des lignées sensibles des sous-groupes MF ou MS, ou sur la résistance de lignées CCND1.

IV. Effet paradoxal de la Dex dans des cellules du sous-groupe CCND1

Lors de nos travaux pour essayer de comprendre le mécanisme de résistance impliqué dans la lignée CCND1 KMS12-PE, nous avons mesuré l'impact de la Dex sur le cycle cellulaire. Pour cela nous avons effectué une cinétique de traitement par 1 μM de Dex et identifié les cellules dans les différentes phases du cycle après incorporation de la bromodéoxyuridine (BrdU) et marquage à l'iodure de propidium de l'ADN et à l'anti-BrdU-FITC. (Figure 22).

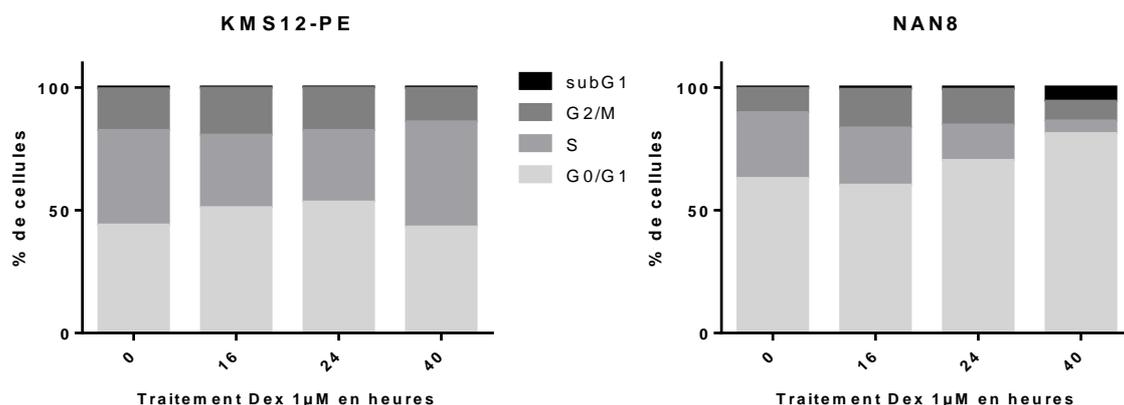


Figure 22 : L'arrêt du cycle en phase G0/G1 est transitoire dans la lignée KMS12-PE.

L'effet de la cinétique d'exposition à la Dex 1 μ M sur les différentes phases du cycle cellulaire a été analysé dans la lignée résistante KMS12-PE et la lignée sensible NAN8 après 30 minutes d'incorporation du BrdU à 37°C et marquage par l'anti-BrdU-FITC et l'iodure de propidium.

La Dex induit dans la lignée sensible NAN8 une augmentation du nombre de cellules en phase subG1 et une diminution de la phase S dès 16h, un arrêt en phase G0/G1 dès 24h et ne présente plus qu'une faible proportion de cellules en phases S et G2/M à 40h de traitement par la Dex. De manière intéressante, dans la lignée résistante KMS12-PE, un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 est visible dès 16h de traitement par la Dex. Cependant, cet arrêt n'est que transitoire car à 40h de traitement par la Dex, nous observons une diminution de la phase G0/G1 et une augmentation de la phase S.

Nous avons ensuite mené des travaux dans le but d'identifier une molécule qui pourrait lever la résistance à la Dex de la lignée KMS12-PE *in vitro*, en effectuant des associations du traitement par la Dex avec des inhibiteurs de différentes voies de signalisation comme l'U0126 qui inhibe la voie MAPK/ERK ou la Wortmannin qui inhibe la voie PI3K/Akt, mais également le Pomalidomide décrit pour avoir un effet antiprolifératif sur les cellules de MM (Figure 23). De manière surprenante, non seulement ces molécules ne permettent pas de lever la résistance à la Dex, mais la faible induction de mort par les inhibiteurs et le pomalidomide (<20%) est totalement inhibée par l'association de la Dex. La Dex semble donc induire un effet anti-apoptotique dans la lignée CCND1 KMS12-PE.

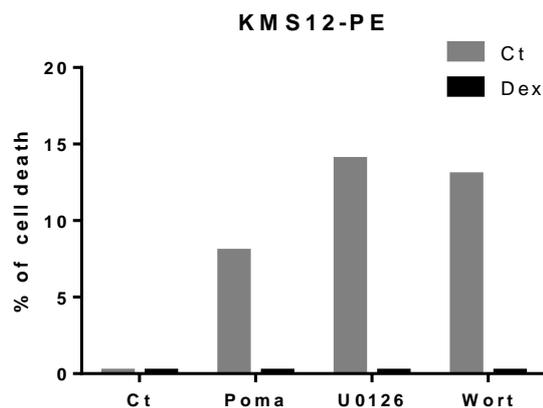


Figure 23 : La Dex inhibe l'induction modérée de la mort cellulaire par d'autres traitements dans la lignée résistante KMS12-PE.

La lignée résistante KMS12-PE a été exposée au traitement par la Dex à 1 μ M associé au Pomalidomide à 0.25 μ M, ou à l'inhibiteur de la voie MAPK/ERK, l'U016 à 10 μ M, ou à l'inhibiteur de la voie PI3K/Akt, la Wortmannin à 5 μ M, pendant 72 heures. La mort cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'Apo2.7.

Aussi, lors de notre étude, nous avons pu observer sur certains prélèvements de patients résistants, une augmentation de la proportion de plasmocytes CD138 positifs suite à l'exposition à la Dex *in vitro* (Figure 24). Nous remarquons également l'apparition de cellules présentant une forte expression du CD138 après le traitement par la Dex.

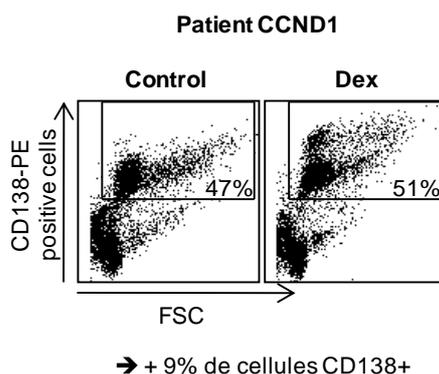


Figure 24 : La Dex augmente le pourcentage de cellules CD138 positives du prélèvement d'un patient CCND1.

Après 48 heures de traitement par la Dex 1 μ M, la mort cellulaire des plasmocytes du patient, *in vitro*, est évaluée après marquage du CD138. Ce patient présente une translocation t(11 ;14).

Il reste à déterminer si l'augmentation du pourcentage de cellules CD138 positives est due à une augmentation de la prolifération des plasmocytes tumoraux, ou à une perte des autres types cellulaires présents dans le prélèvement et sensibles au traitement par la Dex.

L'ensemble de ces données obtenues à partir d'échantillons ou de lignées du sous-groupe CCND1, nous laisse donc penser que la Dex pourrait induire un effet paradoxal dans le MM, et plus particulièrement dans le sous-groupe CCND1.

Discussion et Perspectives

La Dexaméthasone demeure un agent important dans le traitement du myélome, cependant son utilisation clinique est basée sur des études empiriques. Ce travail a donc été entrepris pour évaluer les effets de la Dex en fonction de la classification moléculaire des patients atteints de MM, et pour déterminer les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par la Dex dans le MM.

Nous avons tout d'abord montré qu'il n'y a pas d'effet dose de la Dex sur la réponse pro-apoptotique dans les lignées de MM. Ces résultats semblent être en accord avec les données cliniques. En effet, la toxicité accrue de l'utilisation de la Dex à hautes doses a conduit différents groupes à mener des essais cliniques avec des doses de Dex réduites. Il a ainsi été montré que la réduction des doses de Dex diminue la toxicité des traitements sans impacter leur efficacité (Rajkumar, *et al* 2010).

L'étude sur notre panel de lignées a permis de montrer que l'effet pro-apoptotique de la Dex est restreint aux sous-groupes de lignées MF et MS associés à un mauvais pronostic, alors que toutes les autres lignées sont résistantes à la Dex. On note en particulier, que toutes les lignées CCND1 sont résistantes à la mort induite par la Dex, ainsi que les cellules primaires présentant une translocation t(11 ;14). Enfin, l'hétérogénéité de l'efficacité de la Dex a été confirmée dans le modèle murin *in vivo*. En effet, alors que la Dex réduit la croissance des tumeurs MS, elle n'a aucun effet sur la croissance des tumeurs CCND1, corroborant ainsi les résultats trouvés *in vitro*. Lors de ce travail, l'analyse de la réponse à la Dex a été effectuée sur 19 échantillons provenant de patients, dont 4 présentaient une translocation récurrente. Afin de confirmer les résultats obtenus sur les lignées, il sera intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons de cellules primaires.

Nous avons ensuite montré que le niveau d'expression du GR est le premier facteur limitant la sensibilité des lignées de MM à la Dex. En effet, l'expression de *NR3C1* codant pour le GR est fortement et durablement diminuée lors de la génération de lignées résistantes après une longue exposition à la Dex. Cette observation est renforcée par la corrélation trouvée entre le niveau d'expression de *NR3C1* et la mort cellulaire induite par la Dex sur notre panel de lignées. Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Heuck *et al.*, en 2012, qui associe un mauvais pronostic au faible niveau d'expression de *NR3C1* chez des patients atteints de MM (Heuck, *et al* 2012). De plus, nous avons mis en évidence que le sous-groupe de lignées MF présente le plus haut niveau d'expression de *NR3C1* ce qui pourrait expliquer la sensibilité plus élevée de ce sous-groupe à la Dex. Cette analyse n'a pas été réalisée sur nos échantillons provenant de patients par manque de matériel biologique,

cependant, nous avons bénéficié de la base de données publique de puces d'expression génique de 309 patients au diagnostic. Nous avons ainsi confirmé chez les patients le haut niveau d'expression de *NR3C1* dans le sous-groupe MF. Enfin, nous avons montré une corrélation entre l'expression de l'oncogène *MAF* (*c-MAF* + *MAFB*) et l'expression de *NR3C1* dans notre panel de lignée. Il serait donc fortement intéressant de pouvoir reproduire ces différentes analyses d'expression de *NR3C1*, ainsi que de l'oncogène *MAF* sur une autre cohorte de patients, afin de valider la relation entre l'expression de *NR3C1* et de l'oncogène *MAF*. Une précédente étude a déjà exposé un lien entre les GCs et l'oncogène *MAF* en montrant que les GCs réduisent le niveau d'expression de la protéine c-maf via sa dégradation dépendante de l'ubiquitine (Mao, *et al* 2007). Nous avons confirmé que la régulation de l'expression de c-maf par la Dex ne se fait pas au niveau transcriptionnel. Cependant, du fait des difficultés de détection de la protéine c-maf que nous avons rencontré, nous n'avons pas pu confirmer l'implication du protéasome dans la diminution de son expression. Aussi, ces travaux ne nous permettraient pas d'expliquer le lien entre l'expression du récepteur et de l'oncogène. De nouvelles investigations seront donc nécessaires afin de comprendre cette relation et ainsi expliquer la surexpression de *NR3C1* dans le sous-groupe MF. Pour cela, il sera intéressant d'effectuer des expériences de surexpression de *MAF* dans des lignées de MM et d'observer l'impact sur l'expression du récepteur, et *vice versa*. Ceci nous permettra de montrer s'il existe bien une relation entre l'expression de *MAF* et de *NR3C1*, et d'identifier dans quel sens se fait la régulation entre ces deux acteurs.

Nous avons également observé un niveau d'expression de *NR3C1* dans le sous-groupe de patients HY significativement supérieur à celui des sous-groupes MS et CCND1. Ceci peut être expliqué par la localisation du gène *NR3C1* sur le chromosome 5, chromosome dont la trisomie est couramment retrouvée chez les patients de MM hyperdiploïdes (Kumar, *et al* 2012b) et dont le gain est associé à un pronostic favorable (Avet-Loiseau, *et al* 2009).

Enfin, nous avons démontré que la Dex induit la translocation totale du GR vers le noyau dans les 10 lignées cellulaires testées, y compris les résistantes. Ceci montre que la capacité du GR à transloquer vers le noyau n'est pas une étape limitante conduisant la résistance à la Dex, contrairement au niveau d'expression du GR. Cette étude du GR est la première à être réalisée sur un aussi grand nombre de lignées de MM. En effet, jusqu'à présent seules quelques études, essentiellement réalisées par un groupe du « The Lurie cancer center » de Chicago, ont montré que la résistance aux GCs provenait d'une différence du niveau d'expression du GR entre la lignée sensible MM.1S et la lignée résistante MM.1R, et

non de la mutation du GR ou d'une différence d'expression de ses isoformes (Krett, *et al* 1995, Moalli, *et al* 1993, Sanchez-Vega and Gandhi 2009, Sanchez-Vega, *et al* 2006). Plus récemment, en utilisant le même modèle MM.1S / MM.1R, il a été suggéré que la différence du niveau d'expression du GR entre ces deux lignées résulte de la régulation des transcrits de *NR3C1* par le microARN miR-130b (Tessel, *et al* 2011). Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse sur notre panel de lignées, notamment sur les lignées résistantes que nous avons générées, identifiant ainsi une potentielle cible thérapeutique pour contrecarrer la résistance aux GCs due au faible niveau d'expression du GR.

Plusieurs études ont identifié *GILZ* comme l'un des gènes les plus régulés par les GCs, notamment dans des cellules T et des cellules dendritiques (Ayroldi, *et al* 2001, Cannarile, *et al* 2001, D'Adamio, *et al* 1997). Le promoteur du gène codant pour *GILZ*, *TSC22D3*, comprend 6 GRE permettant la liaison des homodimères de GR activés et donc la transactivation du gène. Lors de ce travail, nous avons mis en évidence que la Dex induit l'augmentation de l'expression de *GILZ* dans toutes les lignées de MM testées, cependant, cette augmentation est significativement plus élevée dans les lignées sensibles. De plus, nous avons trouvé une corrélation entre le niveau d'expression de *NR3C1* et l'augmentation de l'expression des ARNm de *TSC22D3* par la Dex. Ce résultat est en accord avec la proposition faite par Thiagarajah *et al.*, en 2014, indiquant que l'induction de *GILZ* serait une mesure fiable de la fonction du GR (Thiagarajah, *et al* 2014).

Nous avons également démontré que la diminution de l'expression de *GILZ* par ARN interférence provoque une forte inhibition de la mort cellulaire induite par la Dex. Cette implication de *GILZ* dans la mort induite par la Dex a déjà été montrée par l'étude de Grugan *et al.*, en 2008. Cependant, cette précédente étude ne présente qu'une modeste réduction de la mort induite par la Dex suite à la diminution de l'expression de *GILZ* dans la lignée MM.1S (Grugan, *et al* 2008). L'ensemble des résultats obtenus lors de notre étude, ainsi que celle de Grugan *et al.*, permettent de dire que *GILZ* présente un rôle clé dans l'induction de la mort cellulaire par la Dex dans le MM. Nous pouvons donc penser que *GILZ* pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du myélome afin de contrecarrer le faible niveau d'expression du GR chez certains patients. Pour cela, Ayroldi *et al.*, en 2014, ont déjà proposé l'utilisation de la protéine recombinante de *GILZ* comme traitement anti-inflammatoire (Ayroldi, *et al* 2014). En effet, cette proposition s'appuie sur des études montrant qu'à la suite d'injection de la protéine *GILZ* recombinante, ou d'un plasmide contenant une séquence codante pour la protéine *GILZ* recombinante à des souris, *GILZ* peut

entrer dans les cellules de mammifère et induire des effets similaires à ceux produits par de fortes doses de Dex (Delfino, *et al* 2004, Pinheiro, *et al* 2013). La protéine recombinante GILZ présenterait alors des caractéristiques pharmacocinétiques et de biodisponibilité adaptées à un usage pharmacologique. L'effet du traitement par la protéine recombinante GILZ pourrait donc être étudié sur nos lignées de MM *in vitro*, ainsi que son effet sur la croissance tumorale dans notre modèle murin.

Parmi les multiples processus requis pour induire l'apoptose par la Dex, la modulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 a été rapportée comme étant un processus majeur (Almawi, *et al* 2004, Ploner, *et al* 2008). Il a notamment été montré que les membres BH3-only de la famille Bcl-2 sont des médiateurs importants dans la mort induite par la Dex, en particulier Bim dont l'expression est induite dans différents modèles (Abrams, *et al* 2004, Bachmann, *et al* 2005, Erlacher, *et al* 2005, Ploner, *et al* 2008, Schmidt, *et al* 2006, Schmidt, *et al* 2004, Wang, *et al* 2003). Nous avons montré sur notre panel de lignée que le traitement par la Dex induit une forte augmentation de l'expression de Bim associée à une augmentation modérée de l'expression de Puma principalement dans les lignées sensibles, mais également dans la lignée résistante KMS12-PE. De plus, nous avons démontré que l'inhibition de l'expression de Bim par ARN interférence conduit à une forte diminution de l'apoptose induite par la Dex, confirmant ainsi le rôle important de Bim dans l'induction de la mort par la Dex. Cependant, contrairement à l'étude de Ploner *et al.*, dans le modèle de la LAL de l'enfant, l'augmentation de l'expression de Bim n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire, comme nous avons pu le constater dans la lignée résistante KMS12-PE. Simultanément à l'augmentation de l'expression de Bim, nous avons observé une forte diminution de l'expression de Bcl-x_L restreinte aux lignées sensibles. Il se produit donc un déséquilibre entre l'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques, conduisant à la diminution du seuil apoptotique dans les lignées sensibles à la Dex.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence que GILZ contribue à la régulation du réseau des protéines de la famille Bcl-2 en induisant l'augmentation de l'expression de Bim et la diminution de l'expression de Bcl-x_L. La régulation de Bcl-x_L par GILZ est en accord avec de précédents travaux réalisés par Delfino *et al.*, en 2004. En effet, cette étude montre une diminution de l'expression de Bcl-x_L dans des souris transgéniques surexprimant GILZ (Delfino, *et al* 2004). Cependant, le mécanisme par lequel GILZ module l'expression de Bcl-x_L n'est pas encore connu. La littérature nous permet de penser que le mécanisme impliqué pourrait être une régulation indirecte impliquant la voie NF-κB. En effet,

il a été montré que Bcl-x_L est une cible transcriptionnelle de NF-κB (Chen, *et al* 2000, Lee, *et al* 1999), et que GILZ peut interagir directement avec NF-κB et ainsi inhiber son activité transcriptionnelle (Ayroldi, *et al* 2001). Il serait donc intéressant de vérifier si GILZ peut interagir directement avec les acteurs de la voie NF-κB p65 et p52 dans les cellules de MM et ainsi moduler l'expression de Bcl-x_L.

Nous avons montré que la régulation de l'expression de Bim par GILZ se fait au niveau transcriptionnel. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus. La régulation de la transcription de Bim par GILZ pourrait se faire de manière directe ou indirecte. En effet, il a été montré que GILZ peut se lier directement sur deux séquences spécifiques du type CCAAT très proches l'une de l'autre, au niveau de promoteur du gène *PPAR-γ2* et ainsi réprimer sa transcription (Shi, *et al* 2003). Nous avons pu identifier trois motifs CCAAT au niveau du promoteur de Bim, cependant, ces séquences ne sont pas aussi proches que celles décrites dans le promoteur du gène *PPAR-γ2*. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine sur cette région du gène permettraient de vérifier si GILZ peut se lier directement au niveau du promoteur de Bim sur ces séquences et ainsi réguler sa transcription. D'autre part, concernant l'hypothèse « indirecte », il a été décrit que l'expression de Bim peut se faire sous le contrôle du facteur de transcription FoxO3a (Dijkers, *et al* 2000). Or, il a également été suggéré que GILZ pouvait interagir avec le complexe mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), inhibant la voie mTORC2/Akt qui elle-même inhibe FoxO3a, conduisant ainsi à l'augmentation de l'expression de Bim (Joha, *et al* 2012). Lors de nos travaux, des résultats préliminaires n'ont pas mis en évidence l'implication d'Akt dans la réponse à la Dex, suggérant que la première hypothèse serait plus probable. L'étude de l'activation de FoxO3a en fonction du traitement par la Dex serait tout de même nécessaire dans l'éventualité où la Dex impliquerait un autre mécanisme d'activation que la voie Akt.

Bien que les lignées du sous-groupe CCND1 présentent un faible niveau d'expression du GR, ce qui pourrait en parti expliquer leur résistance à la Dex, la lignée KMS12-PE expose un haut niveau d'expression du GR, conduisant à une induction significative de l'expression de GILZ et de Bim sans induire la mort cellulaire. Cependant, la Dex n'induit pas de diminution de Bcl-x_L dans cette lignée, comme observée dans les lignées sensibles. Nous avons donc montré que la diminution forcée de l'expression de Bcl-x_L par ARN interférence associée à l'induction de Bim et de GILZ n'est pas suffisante pour contrecarrer la résistance à

la Dex de la lignée KMS12-PE. Ces résultats suggèrent que d'autres acteurs pourraient être impliqués dans la réponse à la Dex.

Nous avons également montré une induction de l'expression de la protéine BH3-only Puma après traitement par la Dex dans les lignées sensibles qui l'expriment, mais également dans la lignée résistante KMS12-PE. Cependant, cette protéine n'étant pas exprimée par l'ensemble des lignées sensibles à la Dex, contrairement à Bim, nous pouvons supposer qu'elle ne présente qu'un rôle secondaire dans le mécanisme d'induction de la mort cellulaire par la Dex. Seules quelques études ont évoqué le possible rôle de Puma dans la réponse aux GCs. Ces études montraient que l'expression de Puma est induite par la Dex dans les thymocytes et que l'absence d'expression aussi bien de Bim que de Puma protège les cellules lymphoïdes des effets des GCs dans des modèles murins (Erlacher, *et al* 2005, Han, *et al* 2001, Villunger, *et al* 2003). Une étude récente indique que l'expression de Puma est impliqué dans la résistance à la Dex (Zhao, *et al* 2015). Ils montrent que le ciblage des microARN miR-221-222 restaure l'expression de Puma dans MM.1R. Cependant, ces résultats sont hautement contestables car la transfection seule de Puma induit la mort de la cellule et le traitement par la Dex ne modifie pas cette induction de mort. Les auteurs concluent que l'inhibition des miR-221-222 lève la résistance à la Dex indépendamment de l'expression du GR en augmentant l'expression de Puma. Or, il est clairement défini que la résistance à la Dex de la lignée MM.1R est due à la forte diminution de l'expression du GR. Il aurait été fortement intéressant d'analyser l'impact de l'inhibition des miR-221-222 sur l'expression du GR, l'induction de l'expression de GILZ et de Bim. Ceci nous amène à nous interroger sur les modèles d'études utilisés dans le MM. En effet, de nombreuses études sont réalisées sur le couple de lignées MM.1S / MM.1R ou sur un nombre très restreint de lignées, apportant ainsi de nouvelles hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements. Or comme nous avons pu le montrer dans cette étude, il n'existe pas une mais des résistances aux traitements. Les études des mécanismes de résistance devraient donc être systématiquement réalisées sur de plus larges panels de lignées de MM afin de renforcer leur message.

Différents travaux ont mis en évidence que différentes cytokines, dont l'interleukine 6 (IL-6) et les Insulin-growth factors (IGF) de type I et II, induisaient une réversion de l'effet antiprolifératif ainsi qu'une inhibition de la mort induite par la Dex dans des cellules de MM (Hardin, *et al* 1994, Juge-Morineau, *et al* 1995, Xu, *et al* 1997). L'étude de Cheung et Van Ness, en 2001, a montré sur une lignée de MM dépendante à l'IL-6 que l'interaction avec les

cellules stromales de la moelle osseuse ou l'ajout d'IL-6 protègent la lignée de la mort induite par la Dex. Il a également été montré que l'IL-6 sécrétée est l'élément principal conduisant à la protection par les cellules stromales, en induisant une augmentation de l'expression de Bcl-x_L et de la cycline D2 (Cheung and Van Ness 2001). De plus, le prétraitement des cellules avec de l'IL-6 ou de l'IGF1 inhibe en partie l'augmentation de l'expression de GILZ et la mort cellulaire induite par la Dex (Grugan, *et al* 2008). Nous avons montré que la dépendance à l'IL-6 de nos lignées n'a pas d'impact sur la réponse à la Dex. Cependant, nous avons pu constater sur certains échantillons provenant de patients que l'IL-6 inhibe leur réponse à la Dex. La comparaison de la sensibilité à la Dex de notre panel de lignées avec celle obtenue dans un modèle de co-culture *in vitro* mimant le microenvironnement médullaire dans sa globalité serait donc très intéressante. De plus, l'analyse de l'effet du microenvironnement en fonction des différentes entités moléculaires du MM et de son impact sur les acteurs impliqués dans le mécanisme de mort cellulaire induite par la Dex pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Différentes études ont rapporté que les GCs pouvaient avoir un effet délétère en augmentant la survie et la prolifération cellulaire de différentes cellules cancéreuses. En effet, lors du traitement de tumeurs solides, les GCs sont utilisés pour leur effet anti-inflammatoire, mais ils sont également prescrits pour minimiser les effets secondaires des traitements chimiothérapeutiques. De nombreux travaux ont montré que la Dex inhibe la mort cellulaire induite par les traitements chimiothérapeutiques, comme le paclitaxel, dans des tumeurs du sein, du col de l'utérus, des ovaires, mais également sur des lignées cellulaires de cancer du poumon et des modèles de xénogreffes (Stringer-Reasor, *et al* 2015, Wu, *et al* 2004, Zhang, *et al* 2007). Il a notamment été démontré que les GCs augmentent la prolifération cellulaire de lignées provenant de cancers solides de différentes origines (épithéliale, neuroectodermale et mésenchymateuse), et qu'ils favorisent la croissance tumorale dans des modèles murins pré-cliniques de carcinomes du poumon (Al-Wadei, *et al* 2005, Gundisch, *et al* 2012). Enfin, même si la Dex induit l'apoptose d'une grande majorité de cellules primaires provenant d'enfants atteints de leucémie aigüe au diagnostic, elle augmente également la survie d'une partie de ces échantillons de cellules primaires *in vitro* (Gundisch, *et al* 2012). Ces études indiquent que cet effet sur la survie et la prolifération passe par l'activation du GR (Gundisch, *et al* 2012). Nous avons observé que la Dex inhibe la mort cellulaire induite par plusieurs traitements dans la lignée KMS12-PE et qu'elle augmente la proportion de cellules CD138 positives dans certains échantillons de patients *in vitro*. Bien que cet effet paradoxal soit

modéré, nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse s'agir d'un effet délétère de la Dex sur la réponse anti-tumorale des cellules de MM. Il sera donc primordial d'étudier plus précisément l'augmentation de la survie ou de la prolifération cellulaire par la Dex sur les cellules de MM, et plus particulièrement dans le sous-groupe CCND1. Pour cela, nous devons mettre au point une analyse permettant de quantifier précisément les différentes populations cellulaires présentes dans les échantillons provenant de patient, afin d'évaluer si le nombre de cellules CD138 positives augmente après traitement par la Dex ou s'il s'agit de la perte des autres populations cellulaires sensibles à la Dex. D'autre part, il sera intéressant d'approfondir l'analyse du possible effet anti-apoptotique de la Dex sur l'ensemble des lignées du sous-groupe CCND1, mais également sur des cellules primaires résistantes à la Dex.

Enfin, nos résultats indiquent que la Dex n'a pas d'effet pro-apoptotique sur les cellules du sous-groupe CCND1 *in vitro*, mais également *in vivo*, malgré l'expression d'un GR fonctionnel. De manière intéressante, des travaux du laboratoire ont déjà montré que le sous-groupe CCND1 se distingue des autres sous-groupes par son profil d'expression particulier des protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, et par sa réponse spécifique à certains traitements comme l'ABT-199 (Gomez-Bougie and Amiot 2013, Touzeau, *et al* 2014). De plus, les patients ayant une translocation t(11 ;14) présentent une forte prévalence de l'isotype IgM et représentent un sous-groupe biologiquement et cliniquement distinct des autres sous-groupes (Avet-Loiseau, *et al* 2003). Ces données suggèrent que le sous-groupe CCND1 pourrait être une pathologie à part entière et bénéficier d'une approche thérapeutique spécifique. L'identification systématique des patients de ce sous-groupe dès le diagnostic serait nécessaire pour pouvoir analyser non seulement leur réponse à la Dex, mais également l'évolution de la maladie en fonction des différents traitements reçus et ainsi obtenir des informations qui permettraient de mieux adapter leur prise en charge dans le futur. L'absence d'effet anti-tumoral direct de la Dex sur les cellules du sous-groupe CCND1, l'apparition possible d'un effet paradoxal de la Dex sur ces cellules, ainsi que les nombreux effets indésirables du traitement, nous conduisent à s'interroger sur la nécessité d'utiliser la Dex dans le but d'induire une réponse anti-tumorale directe chez des patients CCND1.

Conclusion

L'étude de la Dexaméthasone dans le Myélome Multiple a permis d'identifier des sous-groupes dont la spécificité de la réponse est importante, que ce soit par une sensibilité plus élevée pour le sous-groupe MF, ou au contraire, une résistance pour le sous-groupe CCND1. Ce travail de thèse a également permis de démontrer l'importance des trois acteurs que sont le GR, GILZ et Bim, dans le mécanisme de mort induite par la Dex dans les cellules de MM.

Cette étude s'est inscrite dans un contexte actuel de développement de la médecine personnalisée et des thérapies ciblées. Or, la Dex est largement utilisée dans le traitement du MM, souvent à fortes doses. Aussi, bien qu'elle induise des réponses rapides, l'efficacité de la Dex comme agent simple n'est retrouvée que chez 50% des patients, son usage à hautes doses est associé à de nombreux effets indésirables et il existe des phénomènes de résistance. Les résultats obtenus indiquent donc qu'il serait important à présent de prendre en considération l'hétérogénéité du myélome dans l'analyse de la réponse à la Dex tout au long de la maladie. Il serait également nécessaire d'évaluer le niveau d'expression du récepteur aux glucocorticoïdes des cellules de myélome avant tout traitement, puis au cours de la maladie. Ceci permettra peut-être à terme de réévaluer les bénéfices, mais également les risques, des traitements prolongés contenant des GCs, et ainsi de proposer une optimisation de ceux-ci en fonction des anomalies cytogénétiques des patients atteints de MM.

Enfin, l'étude des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par la Dex offrira de nouvelles perspectives thérapeutiques en permettant d'identifier de nouvelles cibles et de développer de nouveaux traitements afin de contrecarrer les résistances aux GCs et de diminuer les effets indésirables limitant leur usage.

Références Bibliographiques

- Abrams, M.T., Robertson, N.M., Yoon, K. & Wickstrom, E. (2004) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem*, **279**, 55809-55817.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, **26**, 61-66.
- Akgul, C., Moulding, D.A., White, M.R. & Edwards, S.W. (2000a) In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett*, **478**, 72-76.
- Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R. & Edwards, S.W. (2000b) Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 684-691.
- Al-Wadei, H.A., Takahasi, T. & Schuller, H.M. (2005) PKA-dependent growth stimulation of cells derived from human pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelium by dexamethasone. *Eur J Cancer*, **41**, 2745-2753.
- Alexanian, R., Barlogie, B. & Dixon, D. (1986) High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med*, **105**, 8-11.
- Alexanian, R., Dimopoulos, M.A., Delasalle, K. & Barlogie, B. (1992) Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*, **80**, 887-890.
- Alexanian, R., Haut, A., Khan, A.U., Lane, M., McKelvey, E.M., Migliore, P.J., Stuckey, W.J., Jr. & Wilson, H.E. (1969) Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama*, **208**, 1680-1685.
- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K. & Jaoude, M.M. (2004) On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. *J Leukoc Biol*, **76**, 7-14.
- Alnemri, E.S., Fernandes, T.F., Haldar, S., Croce, C.M. & Litwack, G. (1992) Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias. *Cancer Res*, **52**, 491-495.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. & Martinou, J.C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, **277**, 370-372.
- Aouacheria, A., Brunet, F. & Gouy, M. (2005) Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol*, **22**, 2395-2416.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, **2**, 420-430.
- Ashwell, J.D., King, L.B. & Vacchio, M.S. (1996) Cross-talk between the T cell antigen receptor and the glucocorticoid receptor regulates thymocyte development. *Stem Cells*, **14**, 490-500.
- Asselin-Labat, M.L., Biola-Vidamment, A., Kerbrat, S., Lombes, M., Bertoglio, J. & Pallardy, M. (2005) FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol*, **19**, 1752-1764.
- Asselin-Labat, M.L., David, M., Biola-Vidamment, A., Lecoecue, D., Zennaro, M.C., Bertoglio, J. & Pallardy, M. (2004) GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood*, **104**, 215-223.
- Ausserlechner, M.J., Obexer, P., Bock, G., Geley, S. & Kofler, R. (2004) Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ*, **11**, 165-174.

- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J.G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J.L., Facon, T. & Mathiot, C. (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*, **109**, 3489-3495.
- Avet-Loiseau, H., Brigaudeau, C., Morineau, N., Talmant, P., Lai, J.L., Daviet, A., Li, J.Y., Praloran, V., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Facon, T. & Bataille, R. (1999) High incidence of cryptic translocations involving the Ig heavy chain gene in multiple myeloma, as shown by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, **24**, 9-15.
- Avet-Loiseau, H., Garand, R., Lode, L., Harousseau, J.L. & Bataille, R. (2003) Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood*, **101**, 1570-1571.
- Avet-Loiseau, H., Li, C., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.L., Attal, M., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T., Moreau, P., Anderson, K.C., Campion, L., Munshi, N.C. & Minvielle, S. (2009) Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, **27**, 4585-4590.
- Avet-Loiseau, H., Malard, F., Campion, L., Magrangeas, F., Sebban, C., Lioure, B., Decaux, O., Lamy, T., Legros, L., Fuzibet, J.G., Michallet, M., Corront, B., Lenain, P., Hulin, C., Mathiot, C., Attal, M., Facon, T., Harousseau, J.L., Minvielle, S. & Moreau, P. (2011) Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood*, **117**, 2009-2011.
- Ayrolidi, E., Macchiarulo, A. & Riccardi, C. (2014) Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. *FASEB J*, **28**, 5055-5070.
- Ayrolidi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F. & Riccardi, C. (2001) Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood*, **98**, 743-753.
- Ayrolidi, E. & Riccardi, C. (2009) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J*, **23**, 3649-3658.
- Ayrolidi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R. & Riccardi, C. (2007) GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest*, **117**, 1605-1615.
- Ayrolidi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C. & Riccardi, C. (2002) Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol*, **22**, 7929-7941.
- Bachmann, P.S., Gorman, R., Mackenzie, K.L., Lutze-Mann, L. & Lock, R.B. (2005) Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. *Blood*, **105**, 2519-2526.
- Bachmann, P.S., Gorman, R., Papa, R.A., Bardell, J.E., Ford, J., Kees, U.R., Marshall, G.M. & Lock, R.B. (2007) Divergent mechanisms of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **67**, 4482-4490.
- Bae, J., Hsu, S.Y., Leo, C.P., Zell, K. & Hsueh, A.J. (2001) Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis*, **6**, 319-330.

- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. & Korsmeyer, S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, **41**, 899-906.
- Bakkus, M.H., Heirman, C., Van Riet, I., Van Camp, B. & Thielemans, K. (1992) Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood*, **80**, 2326-2335.
- Barlogie, B., Smith, L. & Alexanian, R. (1984) Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med*, **310**, 1353-1356.
- Basu, A., DuBois, G. & Haldar, S. (2006) Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy. *Front Biosci*, **11**, 1508-1521.
- Bataille, R. & Harousseau, J.L. (1997) Multiple myeloma. *N Engl J Med*, **336**, 1657-1664.
- Beaulieu, E. & Morand, E.F. (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, **7**, 340-348.
- Beger, C., Gerdes, K., Lauten, M., Tissing, W.J., Fernandez-Munoz, I., Schrappe, M. & Welte, K. (2003) Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol*, **122**, 245-252.
- Beierle, E.A., Strande, L.F. & Chen, M.K. (2002a) Insulin-like growth factor-I protects neuroblastoma against starvation-induced apoptosis and is associated with increased Bcl-2 expression. *J Pediatr Surg*, **37**, 472-476.
- Beierle, E.A., Strande, L.F. & Chen, M.K. (2002b) VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg*, **37**, 467-471.
- Belvisi, M.G., Brown, T.J., Wicks, S. & Foster, M.L. (2001) New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? *Pulm Pharmacol Ther*, **14**, 221-227.
- Benboubker, L., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J., Belch, A.R., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N., Banos, A., Tiab, M., Delforge, M., Cavenagh, J., Ghalder, C., Lee, J.J., Chen, C., Oriol, A., de la Rubia, J., Qiu, L., White, D.J., Binder, D., Anderson, K., Ferman, J.P., Moreau, P., Attal, M., Knight, R., Chen, G., Van Oostendorp, J., Jacques, C., Ervin-Haynes, A., Avet-Loiseau, H., Hulin, C. & Facon, T. (2014) Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*, **371**, 906-917.
- Bergsagel, P.L. & Chesi, M. (2013) V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol*, **31 Suppl 1**, 38-41.
- Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. (2001) Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, **20**, 5611-5622.
- Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B. & Shaughnessy, J., Jr. (2005) Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, **106**, 296-303.
- Bigelow, R.L., Chari, N.S., Unden, A.B., Spurgers, K.B., Lee, S., Roop, D.R., Toftgard, R. & McDonnell, T.J. (2004) Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem*, **279**, 1197-1205.
- Blagosklonny, M.V. (2001) Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia*, **15**, 869-874.
- Blind, R.D. & Garabedian, M.J. (2008) Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **109**, 150-157.

- Bloomfield, C.D., Smith, K.A., Peterson, B.A. & Munck, A. (1981) Glucocorticoid receptors in adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **41**, 4857-4860.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.
- Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneur, L., Marçais, A. & Marvel, J. (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 159-168.
- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, **39**, 615-647.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M. & Strasser, A. (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, **286**, 1735-1738.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M. & Strasser, A. (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, **415**, 922-926.
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J. & et al. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*, **11**, 1921-1928.
- Boyle, E.M., Davies, F.E., Leleu, X. & Morgan, G.J. (2014) Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*, **99**, 605-612.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2000) Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 1886-1896.
- Brien, G., Debaud, A.L., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M.C., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F.M., Haser, R. & Bonnefoy-Berard, N. (2009) C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J Biol Chem*, **284**, 30257-30263.
- Bringhen, S., Petrucci, M.T., Larocca, A., Conticello, C., Rossi, D., Magarotto, V., Musto, P., Boccadifuoco, L., Offidani, M., Omede, P., Gentilini, F., Ciccone, G., Benevolo, G., Genuardi, M., Montefusco, V., Oliva, S., Caravita, T., Tacchetti, P., Boccadoro, M., Sonneveld, P. & Palumbo, A. (2014) Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a multicenter, phase 2 study. *Blood*, **124**, 63-69.
- Bruscoli, S., Di Virgilio, R., Donato, V., Velardi, E., Baldoni, M., Marchetti, C., Migliorati, G. & Riccardi, C. (2006) Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol*, **529**, 63-70.
- Bruscoli, S., Donato, V., Velardi, E., Di Sante, M., Migliorati, G., Donato, R. & Riccardi, C. (2010) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem*, **285**, 10385-10396.
- Cannarile, L., Zollo, O., D'Adamio, F., Ayroldi, E., Marchetti, C., Tabilio, A., Bruscoli, S. & Riccardi, C. (2001) Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ*, **8**, 201-203.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M. & Juin, P. (2004) The first alpha helix of Bax plays a necessary role in

- its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*, **16**, 807-818.
- Casale, F., Addeo, R., D'Angelo, V., Indolfi, P., Poggi, V., Morgera, C., Crisci, S. & Di Tullio, M.T. (2003) Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*, **22**, 123-128.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, **23**, 2825-2837.
- 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. & Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105-115.
- Cavo, M., Tacchetti, P., Patriarca, F., Petrucci, M.T., Pantani, L., Galli, M., Di Raimondo, F., Crippa, C., Zamagni, E., Palumbo, A., Offidani, M., Corradini, P., Narni, F., Spadano, A., Pescosta, N., Deliliers, G.L., Ledda, A., Cellini, C., Caravita, T., Tosi, P. & Baccarani, M. (2010) Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*, **376**, 2075-2085.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. & Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, **9**, 351-365.
- Chang, H., Sloan, S., Li, D., Zhuang, L., Yi, Q.L., Chen, C.I., Reece, D., Chun, K. & Keith Stewart, A. (2004) The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol*, **125**, 64-68.
- Chang, H.Y. & Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 821-846.
- Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.P., Ahmann, G.J., Adli, M., Anderson, K.C., Ardlie, K.G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P.L., Bernstein, B.E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S.B., Hofmeister, C.C., Jagannath, S., Jakubowski, A.J., Krishnan, A., Levy, J., Liefeld, T., Lonial, S., Mahan, S., Mfuko, B., Monti, S., Perkins, L.M., Onofrio, R., Pugh, T.J., Rajkumar, S.V., Ramos, A.H., Siegel, D.S., Sivachenko, A., Stewart, A.K., Trudel, S., Vij, R., Voet, D., Winckler, W., Zimmerman, T., Carpten, J., Trent, J., Hahn, W.C., Garraway, L.A., Meyerson, M., Lander, E.S., Getz, G. & Golub, T.R. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, **471**, 467-472.
- Charmandari, E., Kino, T., Ichijo, T. & Chrousos, G.P. (2008) Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 1563-1572.
- Chauhan, D., Auclair, D., Robinson, E.K., Hideshima, T., Li, G., Podar, K., Gupta, D., Richardson, P., Schlossman, R.L., Krett, N., Chen, L.B., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. (2002) Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene*, **21**, 1346-1358.
- Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D.W. & Anderson, K.C. (1997) Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood*, **89**, 227-234.
- Chen, C., Edelstein, L.C. & Gelinas, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-2695.

- Chen, H.M. & Boxer, L.M. (1995) Pi 1 binding sites are negative regulators of bcl-2 expression in pre-B cells. *Mol Cell Biol*, **15**, 3840-3847.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M. & Huang, D.C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, **17**, 393-403.
- Chen, M., Guerrero, A.D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T.H. & Wang, J. (2007) Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members. *J Biol Chem*, **282**, 33888-33895.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Civasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K. & Garabedian, M.J. (2008) Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol*, **22**, 1754-1766.
- Chen, W., Rogatsky, I. & Garabedian, M.J. (2006) MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, **20**, 560-572.
- Chen, Z., Sangwan, V., Banerjee, S., Mackenzie, T., Dudeja, V., Li, X., Wang, H., Vickers, S.M. & Saluja, A.K. (2013) miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death. *Mol Cancer*, **12**, 105.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. & Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, **278**, 1966-1968.
- Cheng, E.H., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J. & Korsmeyer, S.J. (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, **301**, 513-517.
- Cheng, Q., Morand, E. & Yang, Y.H. (2014) Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. *Front Pharmacol*, **5**, 169.
- Chesi, M. & Bergsagel, P.L. (2011) Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2011**, 344-353.
- Chesi, M. & Bergsagel, P.L. (2013) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*, **97**, 313-323.
- Cheung, W.C. & Van Ness, B. (2001) The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia*, **15**, 264-271.
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. & Rashmi, R. (2008) BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, **27 Suppl 1**, S20-29.
- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I. & Shin, H.S. (1995) A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, **11**, 1693-1698.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J. & Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, **96**, 615-624.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. & Croce, C.M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13944-13949.
- Clark, A.R. & Belvisi, M.G. (2012) Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther*, **134**, 54-67.
- Cleary, M.L., Galili, N. & Sklar, J. (1986) Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med*, **164**, 315-320.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A. & Hardwick, J.M. (1998) Modulation

- of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 554-559.
- Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiye-robo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M. & Sinclair, D.A. (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*, **13**, 627-638.
- Cohen, J.J. & Duke, R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol*, **132**, 38-42.
- Corre, J., Munshi, N. & Avet-Loiseau, H. (2015) Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood*, **125**, 1870-1876.
- Cosulich, S.C., Savory, P.J. & Clarke, P.R. (1999) Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol*, **9**, 147-150.
- Craig, R.W., Jabs, E.W., Zhou, P., Kozopas, K.M., Hawkins, A.L., Rochelle, J.M., Seldin, M.F. & Griffin, C.A. (1994) Human and mouse chromosomal mapping of the myeloid cell leukemia-1 gene: MCL1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in preneoplastic and neoplastic disease. *Genomics*, **23**, 457-463.
- Cruz-Topete, D. & Cidlowski, J.A. (2015) One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, **22**, 20-32.
- D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G. & Riccardi, C. (1997) A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*, **7**, 803-812.
- Danial, N.N. (2007) BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*, **13**, 7254-7263.
- Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Davids, M.S. & Letai, A. (2012) Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol*, **30**, 3127-3135.
- De Bosscher, K., Beck, I.M., Dejager, L., Bougarne, N., Gaigneaux, A., Chateauvieux, S., Ratman, D., Bracke, M., Tavernier, J., Vanden Berghe, W., Libert, C., Diederich, M. & Haegeman, G. (2014) Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF-kappaB and AP-1. *Cell Mol Life Sci*, **71**, 143-163.
- de Lange, P., Segeren, C.M., Koper, J.W., Wiemer, E., Sonneveld, P., Brinkmann, A.O., White, A., Brogan, I.J., de Jong, F.H. & Lamberts, S.W. (2001) Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res*, **61**, 3937-3941.
- de Mel, S., Lim, S.H., Tung, M.L. & Chng, W.J. (2014) Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *Biomed Res Int*, **2014**, 232546.
- Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, **22**, 8543-8567.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.
- Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P. & Riccardi, C. (2004) Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood*, **104**, 4134-4141.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q. & Cheng, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 193-209.
- Denisov, A.Y., Madiraju, M.S., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C. & Gehring, K. (2003) Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J Biol Chem*, **278**, 21124-21128.

- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L. & Coffey, P.J. (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, **10**, 1201-1204.
- Dimopoulos, M.A. & Terpos, E. (2010) Lenalidomide: an update on evidence from clinical trials. *Blood Rev*, **24 Suppl 1**, S21-26.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J.Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.J., Yang, Y., Lai, C.C., Lee, D.F., Yen, C.J., Chen, Y.J., Hsu, J.M., Kuo, H.P., Lin, C.Y., Tsai, F.J., Li, L.Y., Tsai, C.H. & Hung, M.C. (2008) Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res*, **68**, 6109-6117.
- Distelhorst, C.W., Benutto, B.M. & Bergamini, R.A. (1984) Effect of cell cycle position on dexamethasone binding by mouse and human lymphoid cell lines: correlation between an increase in dexamethasone binding during S phase and dexamethasone sensitivity. *Blood*, **63**, 105-113.
- Dougherty, T.F. & White, A. (1943) INFLUENCE OF ADRENAL CORTICAL SECRETION ON BLOOD ELEMENTS. *Science*, **98**, 367-369.
- Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K. & Schoneich, C. (2004) Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *Biochem J*, **383**, 361-370.
- Egan, J.B., Shi, C.X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., Middha, S., Asmann, Y., Schmidt, J., Braggio, E., Keats, J.J., Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Craig, D.W., Carpten, J.D. & Stewart, A.K. (2012) Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, **120**, 1060-1066.
- Elmas, S.A., Cetin, M., Tuncer, M. & Hicsonmez, G. (2005) Myeloprotective effect of short-course high-dose methylprednisolone treatment before consolidation therapy in children with acute myeloblastic leukemia. *Am J Hematol*, **80**, 1-5.
- Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M. & Strasser, A. (2003) Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med*, **198**, 1119-1126.
- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A. & Villunger, A. (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, **106**, 4131-4138.
- Facon, T., Mary, J.Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J.L., Guillermin, G., Chateleix, C., Dib, M., Voillat, L., Maisonneuve, H., Troncy, J., Dorvaux, V., Monconduit, M., Martin, C., Casassus, P., Jaubert, J., Jardel, H., Doyen, C., Kolb, B., Anglaret, B., Grosbois, B., Yakoub-Agha, I., Mathiot, C. & Avet-Loiseau, H. (2007) Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*, **370**, 1209-1218.
- Facon, T., Mary, J.Y., Pegourie, B., Attal, M., Renaud, M., Sadoun, A., Voillat, L., Dorvaux, V., Hulin, C., Lepeu, G., Harousseau, J.L., Eschard, J.P., Ferrant, A., Blanc, M., Maloisel, F., Orfeuvre, H., Rossi, J.F., Azais, I., Monconduit, M., Collet, P., Anglaret, B., Yakoub-Agha, I., Wetterwald, M., Eghbali, H., Vekemans, M.C., Maisonneuve, H., Troncy, J., Grosbois, B., Doyen, C., Thyss, A., Jaubert, J., Casassus, P., Thielemans, B. & Bataille, R. (2006) Dexamethasone-based regimens versus

- melphalan-prednisone for elderly multiple myeloma patients ineligible for high-dose therapy. *Blood*, **107**, 1292-1298.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. & Henson, P.M. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, **5**, 551-562.
- Fan, F., Tonon, G., Bashari, M.H., Vallet, S., Antonini, E., Goldschmidt, H., Schulze-Bergkamen, H., Opferman, J.T., Sattler, M., Anderson, K.C., Jager, D. & Podar, K. (2014) Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer Lett*, **343**, 286-294.
- Fernandez de Larrea, C., Kyle, R.A., Durie, B.G., Ludwig, H., Usmani, S., Vesole, D.H., Hajek, R., San Miguel, J.F., Sezer, O., Sonneveld, P., Kumar, S.K., Mahindra, A., Comenzo, R., Palumbo, A., Mazumber, A., Anderson, K.C., Richardson, P.G., Badros, A.Z., Caers, J., Cavo, M., LeLeu, X., Dimopoulos, M.A., Chim, C.S., Schots, R., Noeul, A., Fantl, D., Mellqvist, U.H., Landgren, O., Chanan-Khan, A., Moreau, P., Fonseca, R., Merlini, G., Lahuerta, J.J., Blade, J., Orłowski, R.Z. & Shah, J.J. (2013) Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*, **27**, 780-791.
- Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W.M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B.G., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L. & Avet-Loiseau, H. (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, **23**, 2210-2221.
- Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., Bailey, R.J. & Greipp, P.R. (2003) Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, **101**, 4569-4575.
- Fulda, S. (2014) Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins in hematological malignancies: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*, **28**, 1414-1422.
- Fulda, S. & Vucic, D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **11**, 109-124.
- Gallier-Beckley, A.J., Williams, J.G., Collins, J.B. & Cidlowski, J.A. (2008) Glycogen synthase kinase 3 β -mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol*, **28**, 7309-7322.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, **14**, 1237-1243.
- Gibson, L., Holmgren, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M. & Cory, S. (1996) bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, **13**, 665-675.
- Gilley, J., Coffey, P.J. & Ham, J. (2003) FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, **162**, 613-622.
- Gomez-Bougie, P. & Amiot, M. (2013) Apoptotic machinery diversity in multiple myeloma molecular subtypes. *Front Immunol*, **4**, 467.
- Gomez-Bougie, P., Bataille, R. & Amiot, M. (2005) Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. *Eur J Immunol*, **35**, 971-976.

- Gomi, M., Moriwaki, K., Katagiri, S., Kurata, Y. & Thompson, E.B. (1990) Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Res*, **50**, 1873-1878.
- Gong, J., Zhang, J.P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.X., Yuan, Y. & Zhuang, S.M. (2013) MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*, **32**, 3071-3079.
- Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F. & Nunez, G. (1997) Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*, **158**, 4750-4757.
- Grillot, D.A., Merino, R. & Nunez, G. (1995) Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp Med*, **182**, 1973-1983.
- Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999a) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Korsmeyer, S.J. (1999b) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, **274**, 1156-1163.
- Grugan, K.D., Ma, C., Singhal, S., Krett, N.L. & Rosen, S.T. (2008) Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **110**, 244-254.
- Gundisch, S., Boeckeler, E., Behrends, U., Amtmann, E., Ehrhardt, H. & Jeremias, I. (2012) Glucocorticoids augment survival and proliferation of tumor cells. *Anticancer Res*, **32**, 4251-4261.
- Haarman, E.G., Kaspers, G.J., Pieters, R., Rottier, M.M. & Veerman, A.J. (2004) Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia*, **18**, 530-537.
- Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M.C., Prejean, M.V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F.M., Zou, W. & Emilie, D. (2007) Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood*, **110**, 211-219.
- Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu, L. & Chittenden, T. (2001) Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11318-11323.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I., Chang, R., Barlogie, B., Xiao, H. & Epstein, J. (1994) Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*, **84**, 3063-3070.
- Harousseau, J.L., Attal, M., Leleu, X., Troncy, J., Pegourie, B., Stoppa, A.M., Hulin, C., Benboubker, L., Fuzibet, J.G., Renaud, M., Moreau, P. & Avet-Loiseau, H. (2006) Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica*, **91**, 1498-1505.
- Hershko, T. & Ginsberg, D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 8627-8634.
- Heuck, C.J., Szymonifka, J., Hansen, E., Shaughnessy, J.D., Jr., Usmani, S.Z., van Rhee, F., Anaissie, E., Nair, B., Waheed, S., Alsayed, Y., Petty, N., Bailey, C., Epstein, J., Hoering, A., Crowley, J. & Barlogie, B. (2012) Thalidomide in total therapy 2

- overcomes inferior prognosis of myeloma with low expression of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. *Clin Cancer Res*, **18**, 5499-5506.
- Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M. & Anderson, K.C. (2004) Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, **104**, 607-618.
- Hillmann, A.G., Ramdas, J., Multanen, K., Norman, M.R. & Harmon, J.M. (2000) Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **60**, 2056-2062.
- Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C. & Day, C.L. (2007) Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ*, **14**, 128-136.
- Holmgren, S.P., Huang, D.C., Adams, J.M. & Cory, S. (1999) Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind proapoptotic family members. *Cell Death Differ*, **6**, 525-532.
- Hsu, S.Y., Lin, P. & Hsueh, A.J. (1998) BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol*, **12**, 1432-1440.
- Huang, D.C., Adams, J.M. & Cory, S. (1998) The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J*, **17**, 1029-1039.
- Hulin, C., Facon, T., Rodon, P., Pegourie, B., Benboubker, L., Doyen, C., Dib, M., Guillermin, G., Salles, B., Eschard, J.P., Lenain, P., Casassus, P., Azais, I., Decaux, O., Garderet, L., Mathiot, C., Fontan, J., Lafon, I., Virion, J.M. & Moreau, P. (2009) Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *J Clin Oncol*, **27**, 3664-3670.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. & Nunez, G. (1997) harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*, **16**, 1686-1694.
- Ishimaru, D., Zuraw, L., Ramalingam, S., Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Reuben, A., Fernandes, D.J. & Spicer, E.K. (2010) Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1). *J Biol Chem*, **285**, 27182-27191.
- Jaffe, H.L. (1924) THE INFLUENCE OF THE SUPRARENAL GLAND ON THE THYMUS : I. REGENERATION OF THE THYMUS FOLLOWING DOUBLE SUPRARENALECTOMY IN THE RAT. *J Exp Med*, **40**, 325-342.
- Jakubowiak, A.J., Dytfeld, D., Griffith, K.A., Lebovic, D., Vesole, D.H., Jagannath, S., Al-Zoubi, A., Anderson, T., Nordgren, B., Detweiler-Short, K., Stockerl-Goldstein, K., Ahmed, A., Jobkar, T., Durecki, D.E., McDonnell, K., Mietzel, M., Couriel, D., Kaminski, M. & Vij, R. (2012) A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood*, **120**, 1801-1809.
- Joha, S., Nugues, A.L., Hetuin, D., Berthon, C., Dezitter, X., Dauphin, V., Mahon, F.X., Roche-Lestienne, C., Preudhomme, C., Quesnel, B. & Idziorek, T. (2012) GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells. *Oncogene*, **31**, 1419-1430.
- Juge-Morineau, N., Francois, S., Puthier, D., Godard, A., Bataille, R. & Amiot, M. (1995) The gp 130 family cytokines IL-6, LIF and OSM but not IL-11 can reverse the anti-proliferative effect of dexamethasone on human myeloma cells. *Br J Haematol*, **90**, 707-710.
- Keats, J.J., Chesi, M., Egan, J.B., Garbitt, V.M., Palmer, S.E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P.R., Baker, A.S., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S.V., Carpten,

- J.D., Barrett, M., Fonseca, R., Stewart, A.K. & Bergsagel, P.L. (2012) Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, **120**, 1067-1076.
- Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., Belch, A.R. & Pilarski, L.M. (2003) In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*, **101**, 1520-1529.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kfir, S., Sionov, R.V., Zafir, E., Zilberman, Y. & Yefenof, E. (2007) Staurosporine sensitizes T lymphoma cells to glucocorticoid-induced apoptosis: role of Nur77 and Bcl-2. *Cell Cycle*, **6**, 3086-3096.
- Kim, H., Choi, J.Y., Lee, J.M., Park, Y.S., Suh, H., Song, H.R., Jo, S.A. & Jo, I. (2008) Dexamethasone increases angiopoietin-1 and quiescent hematopoietic stem cells: a novel mechanism of dexamethasone-induced hematoprotection. *FEBS Lett*, **582**, 3509-3514.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J. & Cheng, E.H. (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*, **8**, 1348-1358.
- Kim, J.Y., Ahn, H.J., Ryu, J.H., Suk, K. & Park, J.H. (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*, **199**, 113-124.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, **14**, 5579-5588.
- Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M. & Bataille, R. (1989) Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, **73**, 517-526.
- Klein, B., Zhang, X.G., Lu, Z.Y. & Bataille, R. (1995) Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*, **85**, 863-872.
- Kodama, Y., Taura, K., Miura, K., Schnabl, B., Osawa, Y. & Brenner, D.A. (2009) Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*, **136**, 1423-1434.
- Koga, Y., Matsuzaki, A., Suminoe, A., Hattori, H., Kanemitsu, S. & Hara, T. (2005) Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*, **45**, 121-127.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. & Craig, R.W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3516-3520.
- Krett, N.L., Pillay, S., Moalli, P.A., Greipp, P.R. & Rosen, S.T. (1995) A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res*, **55**, 2727-2729.
- Kriegler, A.B., Bernardo, D. & Verschoor, S.M. (1994) Protection of murine bone marrow by dexamethasone during cytotoxic chemotherapy. *Blood*, **83**, 65-71.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, **87**, 99-163.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. & Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **276**, 20633-20640.

- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, **94**, 325-337.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, **384**, 368-372.
- Kumar, S., Flinn, I., Richardson, P.G., Hari, P., Callander, N., Noga, S.J., Stewart, A.K., Turturro, F., Rifkin, R., Wolf, J., Estevam, J., Mulligan, G., Shi, H., Webb, I.J. & Rajkumar, S.V. (2012a) Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*, **119**, 4375-4382.
- Kumar, S., Fonseca, R., Ketterling, R.P., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Gertz, M.A., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Dingli, D., Knudson, R.A., Greenberg, A., Russell, S.J., Zeldenrust, S.R., Lust, J.A., Kyle, R.A., Bergsagel, L. & Rajkumar, S.V. (2012b) Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, **119**, 2100-2105.
- Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Gertz, M.A., Buadi, F.K., Pandey, S., Kapoor, P., Dingli, D., Hayman, S.R., Leung, N., Lust, J., McCurdy, A., Russell, S.J., Zeldenrust, S.R., Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2014) Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, **28**, 1122-1128.
- Kurowska, M., Rudnicka, W., Kontny, E., Janicka, I., Chorazy, M., Kowalczewski, J., Ziolkowska, M., Ferrari-Lacraz, S., Strom, T.B. & Maslinski, W. (2002) Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J Immunol*, **169**, 1760-1767.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, **17**, 525-535.
- Kvansakul, M. & Hinds, M.G. (2013) Structural biology of the Bcl-2 family and its mimicry by viral proteins. *Cell Death Dis*, **4**, e909.
- Kvansakul, M. & Hinds, M.G. (2014) The structural biology of BH3-only proteins. *Methods Enzymol*, **544**, 49-74.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2004) Multiple myeloma. *N Engl J Med*, **351**, 1860-1873.
- Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B. & Vallette, F.M. (2007) Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, **12**, 887-896.
- Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P.G., Harousseau, J.L. & Anderson, K.C. (2004) VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood*, **104**, 2886-2892.
- Lee, D.H., Lim, M.H., Youn, D.Y., Jung, S.E., Ahn, Y.S., Tsujimoto, Y. & Lee, J.H. (2009) hnRNP L binds to CA repeats in the 3'UTR of bcl-2 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **382**, 583-587.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. & Cheng, G. (1999) NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9136-9141.

- Lee, Y.K., Shanafelt, T.D., Bone, N.D., Strege, A.K., Jelinek, D.F. & Kay, N.E. (2005) VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*, **19**, 513-523.
- Lei, K. & Davis, R.J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2432-2437.
- Lessene, G., Czabotar, P.E. & Colman, P.M. (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 989-1000.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. & Korsmeyer, S.J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **2**, 183-192.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, **115**, 2679-2688.
- Lewis-Tuffin, L.J. & Cidlowski, J.A. (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci*, **1069**, 1-9.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C. & Cook, S.J. (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem*, **278**, 18811-18816.
- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., Howes, E., Balmanno, K. & Cook, S.J. (2004) Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. *J Biol Chem*, **279**, 8837-8847.
- Li, J. & Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **27**, 6194-6206.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S. & Prystowsky, M.B. (1993) Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, **151**, 1979-1988.
- Lin, S.S., Bassik, M.C., Suh, H., Nishino, M., Arroyo, J.D., Hahn, W.C., Korsmeyer, S.J. & Roberts, T.M. (2006) PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **281**, 23003-23012.
- Linkermann, A. & Green, D.R. (2014) Necroptosis. *N Engl J Med*, **370**, 455-465.
- Liu, W., Hillmann, A.G. & Harmon, J.M. (1995) Hormone-independent repression of AP-1-inducible collagenase promoter activity by glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, **15**, 1005-1013.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P. & Kappler, J.W. (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*, **19**, 341-352.
- Lopez, H., Zhang, L., George, N.M., Liu, X., Pang, X., Evans, J.J., Targy, N.M. & Luo, X. (2010) Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J Biol Chem*, **285**, 15016-15026.
- Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D. & Nelson, B.H. (2000) The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol*, **164**, 2533-2541.
- Lu, N.Z., Collins, J.B., Grissom, S.F. & Cidlowski, J.A. (2007) Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*, **27**, 7143-7160.
- Luciano, F., Jacquet, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G. & Auberger, P. (2003) Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*, **22**, 6785-6793.
- Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Gouraud, W., Lode, L., Decaux, O., Godmer, P., Garderet, L., Voillat, L., Facon, T., Stoppa, A.M., Marit, G., Hulin, C., Casassus, P., Tiab, M.,

- Voog, E., Randriamalala, E., Anderson, K.C., Moreau, P., Munshi, N.C. & Minvielle, S. (2013) Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*, **27**, 473-481.
- Mahindra, A., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2010) Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Rev*, **24 Suppl 1**, S5-11.
- Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I.M. & Roccaro, A.M. (2012) Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *J Biomed Biotechnol*, **2012**, 157496.
- Mao, X., Stewart, A.K., Hurren, R., Datti, A., Zhu, X., Zhu, Y., Shi, C., Lee, K., Tiedemann, R., Eberhard, Y., Trudel, S., Liang, S., Corey, S.J., Gillis, L.C., Barber, D.L., Wrana, J.L., Ezzat, S. & Schimmer, A.D. (2007) A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate c-maf expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin. *Blood*, **110**, 4047-4054.
- Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Min, D.J., Sweet, S.M., Thomas, P.M., Zamdborg, L., Heffner, A., Will, C., Lamy, L., Staudt, L.M., Levens, D.L., Kelleher, N.L. & Licht, J.D. (2011) The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, **117**, 211-220.
- Mass, R.E. (1962) A comparison of the effect of prednisone and a placebo in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Chemother Rep*, **16**, 257-259.
- Mateos, M.V., Oriol, A., Martinez-Lopez, J., Gutierrez, N., Teruel, A.I., de Paz, R., Garcia-Larana, J., Bengoechea, E., Martin, A., Mediavilla, J.D., Palomera, L., de Arriba, F., Gonzalez, Y., Hernandez, J.M., Sureda, A., Bello, J.L., Bargay, J., Penalver, F.J., Ribera, J.M., Martin-Mateos, M.L., Garcia-Sanz, R., Cibeira, M.T., Ramos, M.L., Vidriales, M.B., Paiva, B., Montalban, M.A., Lahuerta, J.J., Blade, J. & Miguel, J.F. (2010) Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol*, **11**, 934-941.
- Matsuyama, S., Schendel, S.L., Xie, Z. & Reed, J.C. (1998) Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices. *J Biol Chem*, **273**, 30995-31001.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E. & Green, D.R. (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell*, **21**, 749-760.
- McCull, K.S., He, H., Zhong, H., Whitacre, C.M., Berger, N.A. & Distelhorst, C.W. (1998) Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol*, **139**, 229-238.
- McIlwain, D.R., Berger, T. & Mak, T.W. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a008656.
- McIntyre, O.R., Pajak, T.F., Kyle, R.A., Cornwell, G.G., 3rd & Leone, L. (1985) Response rate and survival in myeloma patients receiving prednisone alone. *Med Pediatr Oncol*, **13**, 239-243.
- Meller, R., Cameron, J.A., Torrey, D.J., Clayton, C.E., Ordonez, A.N., Henshall, D.C., Minami, M., Schindler, C.K., Saugstad, J.A. & Simon, R.P. (2006) Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons. *J Biol Chem*, **281**, 7429-7436.
- Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Surget, S., Trichet, V., Oliver, L., Pellat-Deceunynck, C. & Amiot, M. (2010) Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS Lett*, **584**, 487-492.

- Miller, A.L., Garza, A.S., Johnson, B.H. & Thompson, E.B. (2007) Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int*, **7**, 3.
- Miller, A.L., Webb, M.S., Copik, A.J., Wang, Y., Johnson, B.H., Kumar, R. & Thompson, E.B. (2005) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol*, **19**, 1569-1583.
- Ming, L., Sakaida, T., Yue, W., Jha, A., Zhang, L. & Yu, J. (2008) Sp1 and p73 activate PUMA following serum starvation. *Carcinogenesis*, **29**, 1878-1884.
- Mittelstadt, P.R. & Ashwell, J.D. (2001) Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*, **276**, 29603-29610.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. & Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, **9**, 1799-1805.
- Miyashita, T., Nagao, K., Krajewski, S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., Inoue, T. & Yamada, M. (1998) Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ*, **5**, 1034-1041.
- Moalli, P.A., Pillay, S., Krett, N.L. & Rosen, S.T. (1993) Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, **53**, 3877-3879.
- Moreau, P. (2012) The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: emerging agents and novel treatment strategies. *Semin Hematol*, **49 Suppl 1**, S33-46.
- Moreau, P., San Miguel, J., Ludwig, H., Schouten, H., Mohty, M., Dimopoulos, M. & Dreyling, M. (2013) Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, **24 Suppl 6**, vi133-137.
- Moreau, P. & Touzeau, C. (2013) Initial treatment of transplant candidates with multiple myeloma. *Semin Oncol*, **40**, 585-591.
- Moreau, P. & Touzeau, C. (2014) Elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *Future Oncol*, **10**, 949-956.
- Moreaux, J., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maiga, S., Hose, D., Goldschmidt, H., Jauch, A., Reme, T., Jourdan, M., Amiot, M. & Pellat-Deceunynck, C. (2011) A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*, **96**, 574-582.
- Morgan, G.J., Walker, B.A. & Davies, F.E. (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, **12**, 335-348.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F. & Gores, G.J. (2007) mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, **26**, 6133-6140.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-18.
- Nair, B., van Rhee, F., Shaughnessy, J.D., Jr., Anaissie, E., Szymonifka, J., Hoering, A., Alsayed, Y., Waheed, S., Crowley, J. & Barlogie, B. (2010) Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood*, **115**, 4168-4173.
- Nakano, K. & Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F.W. & et al. (1993) Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science*, **261**, 1584-1588.

- Nickson, P., Toth, A. & Erhardt, P. (2007) PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res*, **73**, 48-56.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. & Huang, D.C. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*, **17**, 384-395.
- O'Reilly, L.A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C. & Strasser, A. (2000) The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol*, **157**, 449-461.
- Oakes, S.A., Lin, S.S. & Bassik, M.C. (2006) The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med*, **6**, 99-109.
- Oakley, R.H. & Cidlowski, J.A. (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, **132**, 1033-1044.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Olberding, K.E., Wang, X., Zhu, Y., Pan, J., Rai, S.N. & Li, C. (2010) Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression. *Cancer Biol Ther*, **10**, 918-929.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C. & Korsmeyer, S.J. (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, **426**, 671-676.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **460**, 72-81.
- Palmer, A.E., Jin, C., Reed, J.C. & Tsien, R.Y. (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17404-17409.
- Palumbo, A., Brinchen, S., Rossi, D., Cavalli, M., Larocca, A., Ria, R., Offidani, M., Patriarca, F., Nozzoli, C., Guglielmelli, T., Benevolo, G., Callea, V., Baldini, L., Morabito, F., Grasso, M., Leonardi, G., Rizzo, M., Falcone, A.P., Gottardi, D., Montefusco, V., Musto, P., Petrucci, M.T., Ciccone, G. & Boccadoro, M. (2010) Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*, **28**, 5101-5109.
- Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S.L. & Tarlinton, D.M. (2013) Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol*, **14**, 290-297.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T. & Fesik, S.W. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3012-3017.
- Petros, A.M., Nettesheim, D.G., Wang, Y., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E.D., Zhang, H., Thompson, C.B. & Fesik, S.W. (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci*, **9**, 2528-2534.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T. & Fesik, S.W. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 83-94.
- Pinheiro, I., Dejager, L., Petta, I., Vandevyver, S., Puimege, L., Mahieu, T., Ballegeer, M., Van Hauwermeiren, F., Riccardi, C., Vuylsteke, M. & Libert, C. (2013) LPS resistance of SPRET/Ei mice is mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. *EMBO Mol Med*, **5**, 456-470.

- Pinton, P. & Rizzuto, R. (2006) Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*, **13**, 1409-1418.
- Planey, S.L. & Litwack, G. (2000) Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 307-312.
- Ploner, C., Rainer, J., Niederegger, H., Eduardoff, M., Villunger, A., Geley, S. & Kofler, R. (2008) The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **22**, 370-377.
- Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G. & Stewart, A.K. (2000) Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood*, **95**, 992-998.
- Powers, J.H., Hillmann, A.G., Tang, D.C. & Harmon, J.M. (1993) Cloning and expression of mutant glucocorticoid receptors from glucocorticoid-sensitive and -resistant human leukemic cells. *Cancer Res*, **53**, 4059-4065.
- Prideaux, S.M., Conway O'Brien, E. & Chevassut, T.J. (2014) The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*, **2014**, 864058.
- Pui, C.H. & Costlow, M.E. (1986) Sequential studies of lymphoblast glucocorticoid receptor levels at diagnosis and relapse in childhood leukemia: an update. *Leuk Res*, **10**, 227-229.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C. & Johnson, E.M., Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, **38**, 899-914.
- Putcha, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A. & Johnson, E.M. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, **29**, 615-628.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C. & Strasser, A. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, **293**, 1829-1832.
- Puthier, D., Bataille, R. & Amiot, M. (1999a) IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*, **29**, 3945-3950.
- Puthier, D., Derenne, S., Barille, S., Moreau, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. & Amiot, M. (1999b) Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br J Haematol*, **107**, 392-395.
- Qi, X.J., Wildey, G.M. & Howe, P.H. (2006) Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem*, **281**, 813-823.
- Rajkumar, S.V. (2013a) IV. Initial treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol*, **31 Suppl 1**, 33-37.
- Rajkumar, S.V. (2013b) Multiple myeloma: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, **88**, 226-235.
- Rajkumar, S.V., Blood, E., Vesole, D., Fonseca, R. & Greipp, P.R. (2006) Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*, **24**, 431-436.
- Rajkumar, S.V., Jacobus, S., Callander, N.S., Fonseca, R., Vesole, D.H., Williams, M.E., Abonour, R., Siegel, D.S., Katz, M. & Greipp, P.R. (2010) Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, **11**, 29-37.

- Rajkumar, S.V., Rosinol, L., Hussein, M., Catalano, J., Jedrzejczak, W., Lucy, L., Olesnyckyj, M., Yu, Z., Knight, R., Zeldis, J.B. & Blade, J. (2008) Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol*, **26**, 2171-2177.
- Rathmell, J.C., Lindsten, T., Zong, W.X., Cinalli, R.M. & Thompson, C.B. (2002) Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol*, **3**, 932-939.
- Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I.M. & De Bosscher, K. (2013) How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol*, **380**, 41-54.
- Rautureau, G.J., Day, C.L. & Hinds, M.G. (2010) Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int J Mol Sci*, **11**, 1808-1824.
- Ray, D.W., Davis, J.R., White, A. & Clark, A.J. (1996) Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*, **56**, 3276-3280.
- Redjimi, N., Gaudin, F., Touboul, C., Emilie, D., Pallardy, M., Biola-Vidamment, A., Fernandez, H., Prevot, S., Balabanian, K. & Machelon, V. (2009) Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer*, **8**, 83.
- Reeder, C.B., Reece, D.E., Kukreti, V., Chen, C., Trudel, S., Hentz, J., Noble, B., Pirooz, N.A., Spong, J.E., Piza, J.G., Zepeda, V.H., Mikhael, J.R., Leis, J.F., Bergsagel, P.L., Fonseca, R. & Stewart, A.K. (2009) Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia*, **23**, 1337-1341.
- Richardson, P.G., Moreau, P., Laubach, J.P., Gupta, N., Hui, A.M., Anderson, K.C., San Miguel, J.F. & Kumar, S. (2015) The investigational proteasome inhibitor ixazomib for the treatment of multiple myeloma. *Future Oncol*, **11**, 1153-1168.
- Richardson, P.G., Siegel, D.S., Vij, R., Hofmeister, C.C., Baz, R., Jagannath, S., Chen, C., Lonial, S., Jakubowiak, A., Bahlis, N., Song, K., Belch, A., Raje, N., Shustik, C., Lentzsch, S., Lacy, M., Mikhael, J., Matous, J., Vesole, D., Chen, M., Zaki, M.H., Jacques, C., Yu, Z. & Anderson, K.C. (2014) Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood*, **123**, 1826-1832.
- Richardson, P.G., Weller, E., Lonial, S., Jakubowiak, A.J., Jagannath, S., Raje, N.S., Avigan, D.E., Xie, W., Ghobrial, I.M., Schlossman, R.L., Mazumder, A., Munshi, N.C., Vesole, D.H., Joyce, R., Kaufman, J.L., Doss, D., Warren, D.L., Lunde, L.E., Kaster, S., Delaney, C., Hideshima, T., Mitsiades, C.S., Knight, R., Esseltine, D.L. & Anderson, K.C. (2010) Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, **116**, 679-686.
- Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 405-413.
- Riml, S., Schmidt, S., Ausserlechner, M.J., Geley, S. & Kofler, R. (2004) Glucocorticoid receptor heterozygosity combined with lack of receptor auto-induction causes glucocorticoid resistance in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ*, **11 Suppl 1**, S65-72.
- Rivers, C., Levy, A., Hancock, J., Lightman, S. & Norman, M. (1999) Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 4283-4286.

- Robertson, N.M., Zangrilli, J., Fernandes-Alnemri, T., Friesen, P.D., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1997) Baculovirus P35 inhibits the glucocorticoid-mediated pathway of cell death. *Cancer Res*, **57**, 43-47.
- Rogatsky, I., Hittelman, A.B., Pearce, D. & Garabedian, M.J. (1999) Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, **19**, 5036-5049.
- Rollig, C., Knop, S. & Bornhauser, M. (2015) Multiple myeloma. *Lancet*, **385**, 2197-2208.
- Ross, F.M., Chiecchio, L., Dagrada, G., Protheroe, R.K., Stockley, D.M., Harrison, C.J., Cross, N.C., Szubert, A.J., Drayson, M.T. & Morgan, G.J. (2010) The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica*, **95**, 1221-1225.
- Russell, S.J. & Rajkumar, S.V. (2011) Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol*, **12**, 617-619.
- Salmon, S.E., Shaddock, R.K. & Schilling, A. (1967) Intermittent high-dose prednisone (NSC-10023) therapy for multiple myeloma. *Cancer Chemother Rep*, **51**, 179-187.
- San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K.M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M.V., Anderson, K.C., Esseltine, D.L., Liu, K., Cakana, A., van de Velde, H. & Richardson, P.G. (2008) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*, **359**, 906-917.
- Sanchez-Vega, B. & Gandhi, V. (2009) Glucocorticoid resistance in a multiple myeloma cell line is regulated by a transcription elongation block in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *Br J Haematol*, **144**, 856-864.
- Sanchez-Vega, B., Krett, N., Rosen, S.T. & Gandhi, V. (2006) Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*, **5**, 3062-3070.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. & Fesik, S.W. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**, 983-986.
- Schaaf, M.J. & Cidlowski, J.A. (2002) AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, **67**, 627-636.
- Schendel, S.L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B.L. & Reed, J.C. (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem*, **274**, 21932-21936.
- Schmidt, S., Irving, J.A., Minto, L., Matheson, E., Nicholson, L., Ploner, A., Parson, W., Kofler, A., Amort, M., Erdel, M., Hall, A. & Kofler, R. (2006) Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. *FASEB J*, **20**, 2600-2602.
- Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S. & Kofler, R. (2004) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ*, **11 Suppl 1**, S45-55.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7834-7838.

- Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D.J. & Spicer, E.K. (2004) Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem*, **279**, 10855-10863.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. & Korsmeyer, S.J. (1991) bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, **67**, 879-888.
- Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R.D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P. & Korsmeyer, S.J. (1988) Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J*, **7**, 123-131.
- Shahidi, H., Vottero, A., Stratakis, C.A., Taymans, S.E., Karl, M., Longui, C.A., Chrousos, G.P., Daughaday, W.H., Gregory, S.A. & Plate, J.M. (1999) Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 559-565.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, **22**, 526-539.
- Sharma, S. & Lichtenstein, A. (2008) Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood*, **112**, 1338-1345.
- Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S. & Cao, X. (2003) A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep*, **4**, 374-380.
- Siegel, D.S., Martin, T., Wang, M., Vij, R., Jakubowiak, A.J., Lonial, S., Trudel, S., Kukreti, V., Bahlis, N., Alsina, M., Chanan-Khan, A., Buadi, F., Reu, F.J., Somlo, G., Zonder, J., Song, K., Stewart, A.K., Stadtmauer, E., Kunkel, L., Wear, S., Wong, A.F., Orlowski, R.Z. & Jagannath, S. (2012) A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, **120**, 2817-2825.
- Siegel, R.M., Katsumata, M., Miyashita, T., Louie, D.C., Greene, M.I. & Reed, J.C. (1992) Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in bcl-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7003-7007.
- Sinclair, D., Fullerton, J.M., Webster, M.J. & Shannon Weickert, C. (2012) Glucocorticoid receptor 1B and 1C mRNA transcript alterations in schizophrenia and bipolar disorder, and their possible regulation by GR gene variants. *PLoS One*, **7**, e31720.
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafir, E., Cohen, O., Zilberman, Y. & Yefenof, E. (2006) Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle*, **5**, 1017-1026.
- Sionov, R.V., Spokoini, R., Kfir-Erenfeld, S., Cohen, O. & Yefenof, E. (2008) Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Cancer Res*, **101**, 127-248.
- Smadja, N.V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D. & Fruchart, C. (2001) Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, **98**, 2229-2238.
- Smadja, N.V., Fruchart, C., Isnard, F., Louvet, C., Dutel, J.L., Cheron, N., Grange, M.J., Monconduit, M. & Bastard, C. (1998) Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia*, **12**, 960-969.
- Smith, L.K. & Cidlowski, J.A. (2010) Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res*, **182**, 1-30.
- Son, J.K., Varadarajan, S. & Bratton, S.B. (2010) TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ*, **17**, 1288-1301.

- Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D. & Pearce, D. (2007) Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *J Biol Chem*, **282**, 36303-36313.
- Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Korsmeyer, S.J., Nesterova, M., Cho-Chung, Y.S. & Longo, D.L. (1998) Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*, **18**, 3509-3517.
- Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M. & Medema, R.H. (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol*, **168**, 5024-5031.
- Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-245.
- Stringer-Reasor, E.M., Baker, G.M., Skor, M.N., Kocherginsky, M., Lengyel, E., Fleming, G.F. & Conzen, S.D. (2015) Glucocorticoid receptor activation inhibits chemotherapy-induced cell death in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*.
- Surget, S., Chiron, D., Gomez-Bougie, P., Descamps, G., Menoret, E., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Amiot, M. & Pellat-Deceunynck, C. (2012) Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer Res*, **72**, 4562-4573.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**, 645-654.
- Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P. & Woodman, P. (1999) Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene*, **18**, 1781-1787.
- Tarte, K., Jourdan, M., Veyrune, J.L., Berberich, I., Fiol, G., Redal, N., Shaughnessy, J., Jr. & Klein, B. (2004) The Bcl-2 family member Bfl-1/A1 is strongly repressed in normal and malignant plasma cells but is a potent anti-apoptotic factor for myeloma cells. *Br J Haematol*, **125**, 373-382.
- Tessel, M.A., Benham, A.L., Krett, N.L., Rosen, S.T. & Gunaratne, P.H. (2011) Role for microRNAs in regulating glucocorticoid response and resistance in multiple myeloma. *Horm Cancer*, **2**, 182-189.
- Thiagarajah, A.S., Eades, L.E., Thomas, P.R., Guymer, E.K., Morand, E.F., Clarke, D.M. & Leech, M. (2014) GILZ: Glitzing up our understanding of the glucocorticoid receptor in psychopathology. *Brain Res*, **1574**, 60-69.
- Thomas, L.W., Lam, C. & Edwards, S.W. (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*, **584**, 2981-2989.
- Tissing, W.J., Lauten, M., Meijerink, J.P., den Boer, M.L., Koper, J.W., Sonneveld, P. & Pieters, R. (2005a) Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*, **90**, 1279-1281.
- Tissing, W.J., Meijerink, J.P., den Boer, M.L., Brinkhof, B., van Rossum, E.F., van Wering, E.R., Koper, J.W., Sonneveld, P. & Pieters, R. (2005b) Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, **11**, 6050-6056.
- Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J.D., Souers, A.J., Maiga, S., Bene, M.C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C. & Amiot, M. (2014) The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*, **28**, 210-212.

- Tsujimoto, Y. & Croce, C.M. (1986) Molecular genetics of human B-cell neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol*, **132**, 183-192.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, **226**, 1097-1099.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*, **23**, 1889-1899.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-442.
- Vikstrom, I., Carotta, S., Luthje, K., Peperzak, V., Jost, P.J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S.L. & Tarlinton, D.M. (2010) Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science*, **330**, 1095-1099.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M. & Strasser, A. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, **302**, 1036-1038.
- Vogler, M. (2012) BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*, **19**, 67-74.
- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. (1997) The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*, **7**, 147-154.
- Wakeyama, H., Akiyama, T., Kadono, Y., Nakamura, M., Oshima, Y., Nakamura, K. & Tanaka, S. (2007) Posttranslational regulation of Bim by caspase-3. *Ann N Y Acad Sci*, **1116**, 271-280.
- Wallace, A.D. & Cidlowski, J.A. (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem*, **276**, 42714-42721.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, **10**, 2859-2869.
- Wang, W., Wykrzykowska, J., Johnson, T., Sen, R. & Sen, J. (1999) A NF-kappa B/c-myc-dependent survival pathway is targeted by corticosteroids in immature thymocytes. *J Immunol*, **162**, 314-322.
- Wang, Z., Malone, M.H., He, H., McColl, K.S. & Distelhorst, C.W. (2003) Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 23861-23867.
- Webster, J.C., Jewell, C.M., Bodwell, J.E., Munck, A., Sar, M. & Cidlowski, J.A. (1997) Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem*, **272**, 9287-9293.
- Wei, G., Twomey, D., Lamb, J., Schlis, K., Agarwal, J., Stam, R.W., Opferman, J.T., Sallan, S.E., den Boer, M.L., Pieters, R., Golub, T.R. & Armstrong, S.A. (2006) Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell*, **10**, 331-342.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
- Werner, A.B., de Vries, E., Tait, S.W., Bontjer, I. & Borst, J. (2002) Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem*, **277**, 22781-22788.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E. & Kluck, R.M. (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 521-531.

- Wilson-Annan, J., O'Reilly, L.A., Crawford, S.A., Hausmann, G., Beaumont, J.G., Parma, L.P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M.G., Day, C.L., Adams, J.M. & Huang, D.C. (2003) Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol*, **162**, 877-887.
- Wu, I., Shin, S.C., Cao, Y., Bender, I.K., Jafari, N., Feng, G., Lin, S., Cidlowski, J.A., Schleimer, R.P. & Lu, N.Z. (2013) Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death Dis*, **4**, e453.
- Wu, W., Chaudhuri, S., Brickley, D.R., Pang, D., Karrison, T. & Conzen, S.D. (2004) Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res*, **64**, 1757-1764.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Xu, F., Gardner, A., Tu, Y., Michl, P., Prager, D. & Lichtenstein, A. (1997) Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors. *Br J Haematol*, **97**, 429-440.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285-291.
- Yang, X.F., Weber, G.F. & Cantor, H. (1997) A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity*, **7**, 629-639.
- Yao, Y., Bobkov, A.A., Plesniak, L.A. & Marassi, F.M. (2009) Mapping the interaction of pro-apoptotic tBID with pro-survival BCL-XL. *Biochemistry*, **48**, 8704-8711.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, **369**, 321-323.
- Yokoyama, T., Tanahashi, M., Kobayashi, Y., Yamakawa, Y., Maeda, M., Inaba, T., Kiriya, M., Fukai, I. & Fujii, Y. (2002) The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. *Immunol Lett*, **81**, 107-113.
- Yoon, J.H., Werneburg, N.W., Higuchi, H., Canbay, A.E., Kaufmann, S.H., Akgul, C., Edwards, S.W. & Gores, G.J. (2002) Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover via an epidermal growth factor receptor/Raf-1-dependent mechanism. *Cancer Res*, **62**, 6500-6505.
- Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M. & Mak, T.W. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, **94**, 739-750.
- Youle, R.J. & Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.
- Yu, J. & Zhang, L. (2003) No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, **4**, 248-249.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, **7**, 673-682.
- Yuh, Y.S. & Thompson, E.B. (1989) Glucocorticoid effect on oncogene/growth gene expression in human T lymphoblastic leukemic cell line CCRF-CEM. Specific c-myc mRNA suppression by dexamethasone. *J Biol Chem*, **264**, 10904-10910.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B. & Shaughnessy, J.D., Jr. (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, **108**, 2020-2028.

- Zhang, C., Wenger, T., Mattern, J., Ilea, S., Frey, C., Gutwein, P., Altevogt, P., Bodenmuller, W., Gassler, N., Schnabel, P.A., Dienemann, H., Marme, A., Hohenfellner, M., Haferkamp, A., Pfitzenmaier, J., Grone, H.J., Kolb, A., Buchler, P., Buchler, M., Friess, H., Rittgen, W., Edler, L., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Rutz, H.P. & Herr, I. (2007) Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biol Ther*, **6**, 278-287.
- Zhao, J.J., Chu, Z.B., Hu, Y., Lin, J., Wang, Z., Jiang, M., Chen, M., Wang, X., Kang, Y., Zhou, Y., Ni Chonghaile, T., Johncilla, M.E., Tai, Y.T., Cheng, J.Q., Letai, A., Munshi, N.C., Anderson, K.C. & Carrasco, R.D. (2015) Targeting the miR-221-222/PUMA/BAK/BAX pathway abrogates dexamethasone resistance in multiple myeloma. *Cancer Res*.
- Zilberman, Y., Zafir, E., Ovadia, H., Yefenof, E., Guy, R. & Sionov, R.V. (2004) The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4+8+ thymic lymphoma cells. *Cell Immunol*, **227**, 12-23.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. & Gelinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 382-387.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

Thèse de Doctorat

Charlotte KERVOËLEN

La Dexaméthasone dans le Myélome Multiple : étude des mécanismes de sensibilité et impact de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie sur la réponse.

Dexamethasone in Multiple Myeloma: study of mechanisms of sensitivity and impact of molecular heterogeneity of the disease on response.

Résumé

Le myélome multiple (MM) est une tumeur plasmocytaire incurable malgré des avancées thérapeutiques majeures. Cette pathologie regroupe plusieurs catégories de patients à fort impact pronostique basées sur les principales anomalies génétiques. La Dexaméthasone (Dex) est le glucocorticoïde le plus largement utilisée dans le traitement du MM. Cependant, en monothérapie, seule la moitié des patients répondent à la Dex.

Grâce à notre large collection de lignées de MM, représentative de l'hétérogénéité retrouvée chez les patients, nous avons mis en évidence que l'apoptose induite par la Dex dans les lignées de MM est restreinte aux sous-groupes moléculaires t(4;14) (MMSET) et t(14;16) (MAF) associés à un mauvais pronostic, alors que le sous-groupe t(11;14) (CCND1) de pronostic neutre est résistant. Cette hétérogénéité de la réponse à la Dex a été confirmée *in vivo* dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée.

Afin de comprendre cette hétérogénéité de la réponse, nous avons recherché les mécanismes moléculaires responsables de la sensibilité à la Dex. Nous avons démontré que l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) est un facteur limitant de la réponse à la Dex et que son expression est corrélée avec l'expression de l'oncogène MAF. Nous avons également montré que la protéine GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) est induite par la Dex dans le MM et que cette induction est principalement dépendante du niveau d'expression du GR. Aussi, nous avons mis en évidence que GILZ et Bim sont nécessaires à l'induction dans la mort par la Dex. Enfin, nous avons montré que l'induction de GILZ est impliquée dans la régulation de l'expression de Bim dans le MM.

Mots clés

Myélome multiple, Dexaméthasone, Récepteur aux glucocorticoïdes, GILZ, Bim, MAF, Glucocorticoïde

Abstract

Multiple myeloma (MM) is an incurable plasma cell tumor, despite major therapeutic advances. This disorder includes several categories of patients with high prognostic impact based on the main genetic defects. Dexamethasone (Dex) is the most widely used glucocorticoid in the treatment of MM. However, in monotherapy, only half of patients respond to Dex.

Using our large collection of MM cell lines, representative of the heterogeneity found in patients, we demonstrated that Dex-induced apoptosis in MM cell lines is restricted to t(4;14) (MMSET) and t(14;16) (MAF) molecular subgroups associated with poor prognosis, while the t(11;14) (CCND1) subgroup with neutral prognosis is resistant. This heterogeneity of Dex response is confirmed *in vivo* using a mice model of subcutaneous tumor.

To understand this heterogeneity of response, we searched the molecular mechanisms of Dex-sensitivity. We demonstrated that the glucocorticoid receptor (GR) expression is a limiting factor of the Dex response which is correlated with the expression of MAF oncogene. We also showed that the protein GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) is induced by Dex in MM and that this induction is mainly dependent on the level of GR expression. Then, we showed that GILZ and Bim are necessary for Dex-induced cell death. Finally, we showed that GILZ induction is involved in the regulation of Bim expression in MM.

Key Words

Multiple myeloma, Dexamethasone, Glucocorticoid receptor, GILZ, Bim, MAF, Glucocorticoid