

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

ANNÉE 2010

IMPLICATION DES TOLL-LIKE RECEPTORS DANS LA BIOLOGIE DU MYÉLOME MULTIPLE

ÉTUDE DE LA CLONOGENICITÉ SPONTANÉE DES CELLULES DE MYÉLOME MULTIPLE

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

CHIRON David

Le 18 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs Dr. Cremer Isabelle
Pr. Turhan Ali

Examineur Pr. Vanderkerken Karin
Pr. Moreau Philippe

Directrice de thèse : Dr. Pellat-Deceunynck Catherine
Co-encadrant : Dr. Jegou Gaëtan

SOMMAIRE

<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	05
<u>ABRÉVIATIONS</u>	06
<u>INTRODUCTION : LE MYELOME MULTIPLE</u>	07
<u>A. Définition et épidémiologie</u>	08
<u>B. Oncogenèse</u>	08
→ B1. Différenciation B normale	08
→ B2. Origine de la cellule myélomateuse	10
→ B3. Les étapes de l'oncogenèse du MM	10
<u>B3.1 Le MGUS</u>	11
<u>B3.2 Le myélome indolent</u>	11
<u>B3.3 Le MM symptomatique</u>	11
<u>C. Instabilités génomiques</u>	12
→ C1. Les anomalies primaires dans le MGUS.....	12
<u>C1.1 Les translocations</u>	12
<u>C1.2 L'hyperdiploidie</u>	13
<u>C1.3 Dérégulation des Cyclines D</u>	13
<u>C1.4 Classification moléculaire du MM</u>	14
→ C2. Les anomalies secondaires	14
<u>C2.1 Délétion du chromosome 13 (del(13))</u>	15
<u>C2.2 Anomalies du chromosome 1</u>	15
<u>C2.3 Dérégulation de MYC</u>	15
<u>C2.4 Mutation de Ras</u>	16
<u>C2.5 Mutation de TP53</u>	16
<u>C2.6 Les anomalies de la voie NF-Kb</u>	16
<u>D. Dérégulation de la prolifération et des processus apoptotiques</u>	20
→ D1. Prolifération.....	20
<u>D1.1 Sous population proliférante</u>	20

D1.2 Concept du CD45.....	20
→ D2. Anomalies dans les processus Apoptotiques.....	21
<u>E. Le microenvironnement myélomateux</u>	23
→ E1. La niche médullaire.....	23
→ E2. Les facteurs de croissance et leurs voies de signalisations	25
E2.1 Voie Ras/MAPK et JAK/STAT.....	25
E2.2 Voie Ras/MAPK/Erk et PI3K/AKT.....	27
E2.3 La voie NF-kB.....	29
<u>F. Les facteurs pronostiques</u>	31
<u>G. Traitements</u>	32

PROJET I : IMPLICATION DES TOLL-LIKE RECEPTORS DANS LA BIOLOGIE DU MYELOME MULTIPLE.....34

<u>A. Les senseurs du système immunitaire</u>	35
<u>B. Les TLRs</u>	36
→ B1. Localisation	36
→ B2. Les PAMPs	36
→ B3. Les DAMPs.....	37
<u>C. Les voies de signalisation</u>	38
→ C1. Voies de signalisation dépendantes de MyD88	38
→ C2. Les voies de signalisation dépendante de TRIF	39
<u>D. Expression et fonction des TLRs dans le système immunitaire</u>	41
<u>E. Implication des TLRs dans le développement des LB humains</u>	43
<u>F. Implication des TLR dans les hémopathies B</u>	45
→ F1. Réponses hétérogènes des LB tumoraux	46
→ F2. Immunothérapie.....	47
<u>G. Implication potentielle des TLRs dans la biologie du MM</u>	49
<u>H. Expression des TLRs dans le MM</u>	51

<u>I. Réponses TLRs hétérogènes des cellules de MM</u>	54
→ I1. TLR9 et immunomodulation.....	54
→ I2. Implication des TLRs dans la progression du MM	54
<u>I2.1 Evasion immune</u>	55
<u>I2.2 Induction d'IL6</u>	55
<u>I2.3 Induction de la voie NF-kB</u>	56
PUBLICATIONS	57
- <u>ARTICLE 1</u>	58
Les ligands du TLR3 activent la voie NF-kB dans les cellules de Myélome Multiple mais induisent différentes réponses cellulaires en fonction de la production d'IFN- α	
- <u>ARTICLE 2</u>	64
Les ligands du TLR9 contenant des liaisons phosphorothioate protègent les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par TRAIL	
DISCUSSION	71
 <u>PROJET II : ÉTUDE DE LA CLONOGENICITÉ SPONTANÉE DES CELLULES DE MM</u>	76
A. <u>Cellules souches hématopoïétiques (CSH)</u>	78
→ A1. Hématopoïèse et caractérisation des CSH.....	78
→ A2. Les niches hématopoïétiques.....	80
B. <u>Concept de cellules souches cancéreuses (CSC)</u>	84
C. <u>Cellules initiatrices de cancer et MM</u>	86
→ C1. Découverte des cellules myélomateuses clonogéniques.....	86
→ C2. Caractérisation des cellules initiatrices de MM.....	87
D. <u>La voie Notch</u>	93
→ D1. La signalisation Notch.....	93
<u>D1.1 Les récepteurs</u>	93
<u>D1.2 Les ligands</u>	93
<u>D1.3 Les processus d'activation</u>	95

<u>D1.4 Signalisation bidirectionnelle ?</u>	96
<u>D1.5 Les gènes cibles</u>	97
→ D2. Voie Notch dans le développement des cellules normales	99
<u>D2.1 Voie Notch dans cellules souches hématopoïétiques</u>	99
<u>D2.2 Voie Notch dans les cellules du système immunitaire</u>	101
→ D3. Notch et hémopathies	103
<u>D3.1 Leucémie lymphoblastique aigue T (T-ALL)</u>	103
<u>D3.2 Hémopathies B</u>	104
→ D4. Implication de la voie Notch dans le Myélome Multiple	104
<u>D4.1 Les cellules myélomateuses expriment les différents acteurs de la voie Notch</u>	104
<u>D4.2 Implication de la voie Notch dans la biologie du Myélome multiple</u>	106

PUBLICATION.....110

- ARTICLE 3.....111

La clonogénicité des cellules de myélome multiple est médiée par une autocrinie IGF-1 et/ou SCF et dépend de l'expression de JAG2

DISCUSSION.....116

BIBLIOGRAPHIE.....122

ANNEXES.....144

- ARTICLE 4 :

Toll-like receptors : lessons to learn from normal and malignant human B cells.

- ARTICLE 5 :

Toll-like receptors : Expression and involvement in Multiple Myeloma

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Développement et différenciation des lymphocytes B.....	09
- Figure 2 : Oncogénèse du MM.....	18
- Figure 2B : Oncogénèse du MM : anomalies génomiques.....	19
- Figure 3 : Interactions de cellules myélomateuses avec les différents compartiments de la niche médullaire.....	24
- Figure 4 : Principales voies de signalisation impliquées dans la biologie du MM.....	30
- Figure 5 : Hétérogénéité de la survie des patients en fonction des facteurs pronostics.....	32
- Figure 6 : Structure des TLRs et homologie avec l'IL1R.....	36
- Figure 7 : Voie de signalisation des TLRs.....	40
- Figure 8 : Hétérogénéité d'expression des TLRs et contrôle de l'immunité adaptative.....	42
- Figure 9 : Implication des TLR dans les lymphocytes B humains.....	44
- Figure 10 : Expression et fonction des TLRs dans la différenciation B..... et dans les hémopathies B.....	49
- Figure 11 : Expression du TLR4 sur les cellules primaires de MM.....	53
- Figure 12 : Activation des MAPK et de la voie NF-κB par les TLRs dans le MM.....	56
- Figure 13 : Effet du poly(IC) sur les cellules primaires de MM.....	59
- Figure 14 : Induction des protéines proapoptotiques et clivage de MCL-1 par le poly(IC)...	62
- Figure 15 : Hypothèse sur l'implication du TLR9 dans la résistance à Trail.....	65
- Figure 16 : Modification structurelle des ligands du TLR9.....	66
- Figure 17 : Inhibition de l'apoptose induite par TRAIL-R2..... par les ODN phosphorothioates.....	69
- Figure 18 : Implication de la réponse inflammatoire dans le développement tumoral.....	72
- Figure 19 : Implication des TLRs dans la biologie du MM.....	73
- Figure 20 : Hématopoïèse.....	79
- Figure 21 : Les niches Hématopoïétiques.....	81
- Figure 22 : Complexité de la niche ostéoblastique.....	82
- Figure 23 : Mécanismes de circulation des CSH dans l'organisme.....	83
- Figure 24 : Concept de cellules souches cancéreuses.....	85
- Figure 25 : Hypothèse d'un compartiment initiateur myélomateux CD138-.....	91
- Figure 26 : Hypothèse d'un compartiment initiateur myélomateux CD138+.....	92
- Figure 27 : Ligands et récepteurs de la voie Notch.....	94
- Figure 28 : Sites de clivage nécessaires à l'activation de la voie Notch.....	95
- Figure 29 : Mécanismes d'activation de la voie Notch.....	97
- Figure 30 : JAG2 et induction d'IL6.....	107
- Figure 31 : Clonogénicité spontanée des cellules de MM en milieu semi-solide.....	112
- Figure 32 : Mécanismes impliqués dans la clonogénicité spontanée des cellules..... myélomateuses.....	117
- Tableau I : Localisation et ligands des TLRs humains.....	38
- Tableau II : Expression hétérogène des TLR3, 4, 7 et 9 par les cellules primaires de patients.....	52
- Tableau III : Différentes propriétés des ligands du TLR9 en fonction des modifications structurelles.....	66
- Tableau IV : Effets des pertes et gains de fonctions des acteurs de la voie Notch.....	99

ABRÉVIATIONS

Ag : Antigène	LB : Lymphocytes B
B-CLL : Leucémies lymphoïdes chroniques B	LCL : Lymphomes B diffus à grandes cellules
CD : Cellules Dendritiques	LPS : Lipopolysaccharide
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques	MCL : Lymphome du manteau
CSH-LT : CSH à capacité d'autorenouvellement à long terme	MGUS : Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
CSH-ST : CSH à capacité d'autorenouvellement à court terme	MM : Myélome Multiple
CCND : Cycline D	MMSET : Multiple myeloma SET domain
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MZL : Lymphome de la zone marginale
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène	NICD : Notch IntraCellular Domain
CSC : Cellules Souches Cancéreuses	NOD/SCID : Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns	NK : Natural Killer
GIST : Tumeurs stromales gastro-intestinales	ODN CpG : OligoDéoxyNucléotides CpG
GSI : γ -secretase inhibitor	PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
Hh : Hedgehog	Pré-B-ALL : Leucémies lymphoblastiques aiguës B
Ig : Immunoglobuline	SCF : Stem Cell Factor
IGF-1 : Insulin Growth Factor 1	SLL : Lymphomes lymphocytaires à petites cellules
IFN : Interféron	T-ALL : Leucémie lymphoblastique aiguë T
FGFR3 : Fibroblast growth factor receptor 3	TLRs : Toll-Like Receptors
FL : Lymphome folliculaire	

INTRODUCTION :
LE MYELOME MULTIPLE

A. Définition et épidémiologie

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation de cellules plasmocytaires tumorales dans la moelle osseuse. Les plasmocytes malins sont caractérisés par la sécrétion d'une Immunoglobuline (Ig) monoclonale, fréquemment de type IgG (60% des cas) ou IgA (25% des cas) et plus rarement de type IgD, E ou M. Les plasmocytes peuvent aussi se distinguer par la sécrétion exclusive des chaînes légères Igκ ou Igλ. Enfin quelques cas de myélome « non sécrétant » sont décrits.

Le MM représente 1% de l'ensemble des cancers et 13% des tumeurs hématologiques. C'est la 2^{ème} hémopathie maligne en termes de fréquence après les lymphomes non-Hodgkiniens. Dans les pays occidentaux, le MM est responsable de 2% de la mortalité due aux cancers et son incidence est d'environ 4 cas pour 100000 habitants. Cette incidence varie en fonction des origines ethniques, la population noire américaine étant 2 fois plus affectée que les caucasiens. De plus, le MM affecte plus fréquemment les hommes que les femmes (2/3). L'âge médian au diagnostic se situe aux alentours de 65 ans et la médiane de survie est d'environ 5-7 ans après chimiothérapie à haute dose plus autogreffe de cellules souches (Raab et al., 2009).

B. Oncogenèse

→ B1. Différenciation B normale

Au cours du processus de maturation des lymphocytes B (LB), le réarrangement des gènes des Ig permet la constitution d'un répertoire fonctionnel nécessaire à l'établissement d'une réponse humorale. Trois mécanismes moléculaires majeurs sont impliqués dans ces modifications : la recombinaison VDJ, l'hypermutation somatique et la commutation isotypique.

La recombinaison VDJ survient aux stades pré- et pro-B dans la moelle osseuse et permet l'expression membranaire d'IgM et IgD qui caractérise les LB matures. Ces derniers migrent de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires, les ganglions et la rate, via la circulation sanguine. Les LB matures sont dits naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré l'antigène (Ag). Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, la rencontre avec un Ag va permettre leur survie et leur entrée dans le processus de différenciation.

La différenciation se déroule alors selon deux voies principales, une voie T indépendante et une voie T dépendante. Dans le cas d'une différenciation T indépendante, les

plasmocytes générés sont caractérisés par la sécrétion d'IgM et par une courte durée de vie. La réponse humorale générée est de faible affinité mais reste cependant cruciale étant donné qu'elle permet une réponse rapide, avec un taux d'anticorps suffisant pour pallier la rapide multiplication des pathogènes.

Dans le cas d'une différenciation T dépendante, les LB vont initier la formation de centres germinatifs caractérisés par la présence de cellules présentatrices d'antigènes et de lymphocytes T. À ce stade, les LB sont soumis au processus d'hypermutation somatique des gènes variables des Ig permettant la sélection positive des cellules de forte affinité pour l'Ag. De plus, la commutation isotypique du gène codant pour la chaîne lourde des Ig (14q32) permet la production des IgG, IgA et IgE ayant différentes caractéristiques fonctionnelles. Ces derniers migrent vers la moelle osseuse où ils rencontreront les facteurs de survie et de différenciation permettant leur maturation en plasmocytes sécrétant et à longue durée de vie (Figure 1).

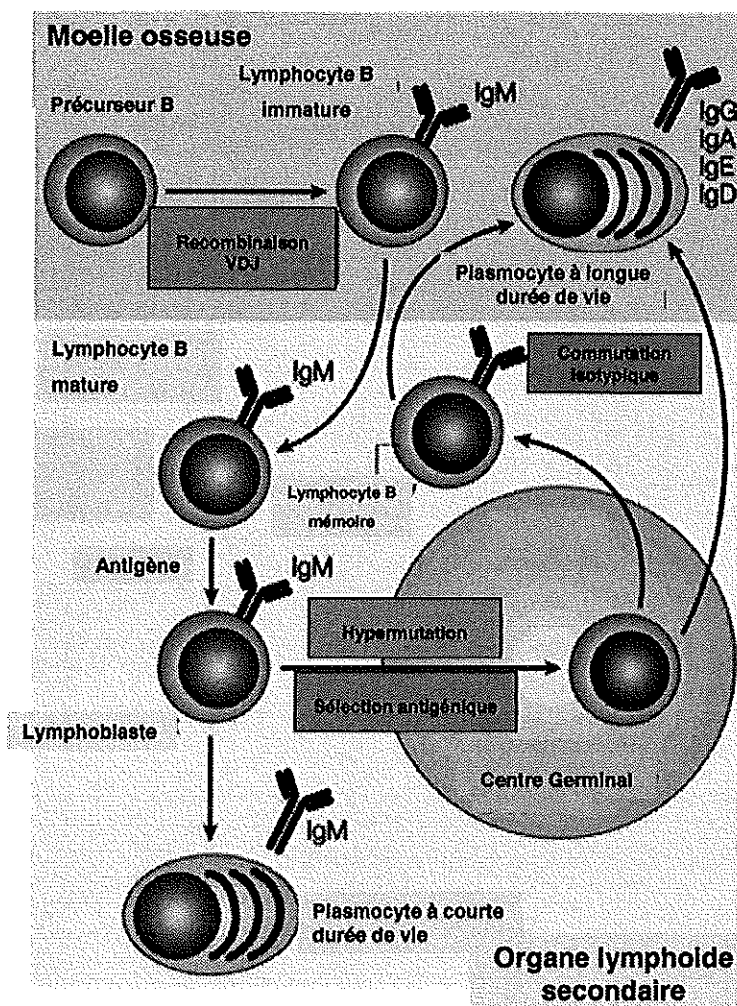


Figure 1 : Développement et différenciation des lymphocytes B
D'après Kuehl et Bergsagel, 2002

Le développement et la différenciation des lymphocytes B nécessite le réarrangement des gènes des Ig via trois mécanismes moléculaires majeurs : la recombinaison VDJ qui a lieu dans la moelle osseuse puis, dans un deuxième temps, les hypermutations somatiques et la commutation isotypique qui sont induites dans le centre germinatif.

Des données récentes montrent que les mutations somatiques et les commutations isotypiques sont des processus aléatoires et que seules les cellules ayant un réarrangement « efficace » survivent (Blink et al., 2005). Ainsi, au décours de la différenciation, les plasmocytes à longue durée de vie sécrétant une Ig de haute affinité gagnent rapidement la moelle osseuse tandis que la dégradation du centre germinale constitue le pool de LB mémoire comprenant des cellules présentant une Ig d'affinité variable. Au cours d'une réexposition à l'Ag, seules les LB mémoire de haute affinité seront activés et généreront une nouvelle vague de plasmocytes.

Le processus de différenciation des LB mémoire en plasmocytes est dépendant de la prolifération. Ces LB, qui ont un seuil d'activation plus bas que les LB naïfs, peuvent être activés de façon spécifique par l'Ag mais aussi de façon non spécifique par le CD40 ou encore les ligands de TLRs. Les LB mémoire activés entrent en cycle et prolifèrent activement. L'arrêt de la stimulation CD40 entraîne une diminution progressive du cycle qui permet leur différenciation. Ainsi, les plasmablastes, qui prolifèrent encore activement, vont se différencier progressivement en précurseurs plasmocytaires puis en plasmocytes non proliférants. *In vitro* et *in vivo*, les plasmocytes meurent massivement s'ils ne trouvent pas un environnement adéquat. De plus, le nombre de plasmocytes médullaires d'un individu est constant (<1% des cellules médullaire) suggérant une régulation fine de leur niche.

→ B2. Origine de la cellule myélomateuse

Bien que la nature exacte du précurseur myélomateux ne soit pas établie, il est défini comme un plasmablaste « post-germinatif » ayant subi les phénomènes d'hypermutations somatiques et de commutation isotopique. En effet l'analyse génétique des chaînes lourdes et légères a démontré que les plasmocytes malins présentent un réarrangement VDJ identique, avec les mêmes hypermutations somatiques et la même commutation isotypique, sans évolution au cours de la maladie.

→ B3. Les étapes de l'oncogenèse du MM

Le MM symptomatique est précédé de 2 stades asymptomatiques appelés Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée ou « MGUS » et Myélome indolent.

B3.1 Le MGUS

Le MGUS est caractérisé par une concentration sérique d'IgG ou IgA monoclonale inférieure à 30g/L, une plasmocytose médullaire inférieure à 10% et par l'absence de symptômes cliniques sévères. Le MGUS est fréquent chez les personnes âgées avec une prévalence supérieure à 3% pour les plus de 50 ans et atteignant 9% pour les plus de 85 ans. Les patients présentant un MGUS ont un risque accru de développer des hémopathies plasmatiques et il a récemment été démontré que tous les patients atteints de MM présentent ce stade asymptomatique en amont (Landgren et al., 2009). Le taux de progression en MM est de 1% par an avec une probabilité de transformation maligne de 26% sur 25 ans.

Bien que l'étiologie du MGUS reste inconnue, l'exposition à des risques environnementaux tels que les radiations ou les pesticides ainsi que certains profils génétiques semblent être impliqués. (Kyle et Kumar, 2009)

B3.2 Le myélome indolent

Le Myélome indolent peut être interprété comme un stade intermédiaire entre le MGUS et le MM. Il est caractérisé par une concentration sérique d'IgG ou IgA monoclonale supérieure à 30g/L, une plasmocytose médullaire supérieure à 10% mais toujours par l'absence de complications symptomatiques. Le taux de progression en MM, beaucoup plus élevé que pour les MGUS, est de 10% par an pendant les 5 premières années suivant le diagnostic.

B3.3 Le MM symptomatique

Comme le Myélome indolent, le MM symptomatique montre un pic monoclonal sérique supérieur à 30 g/L et possède une plasmocytose médullaire supérieure à 10%. Cependant à ce stade de la maladie les patients souffrent de nombreux symptômes cliniques. En effet, l'accumulation progressive des plasmocytes malins dans la moelle osseuse se traduit généralement par des lésions ostéolytiques douloureuses pouvant aboutir à des fractures spontanées. Cet envahissement médullaire s'accompagne d'une forte diminution des Ig normales. Ce défaut de l'immunité humorale va rendre les patients particulièrement susceptibles aux infections. En plus des lésions osseuses, les caractéristiques cliniques majeures du MM sont l'hypercalcémie, l'insuffisance rénale et l'anémie.

Plusieurs stades de MM symptomatiques ont été décrits. En effet le MM originellement intramédullaire peut évoluer en MM extramédullaire défini par la présence de

plasmocytes circulant dans le sang, s'accumulant dans la cavité péritonéale (ascites) ou la plèvre (épanchements pleuraux). Lorsque la plasmocytose circulante est supérieure ou égale à 20 % on parle alors de leucémie à plasmocytes, ce qui constitue le stade le plus avancé de la maladie. Les lignées cellulaires de MM sont majoritairement immortalisées à partir de prélèvements de ce stade terminal et sont de fait représentatives d'un stade avancé de MM.

Il faut cependant distinguer les leucémies à plasmocytes primitives et ce passage leucémique observé secondairement dans certains cas de MM (leucémies à plasmocytes secondaires). En effet, les leucémies à plasmocytes primitives pourraient être une entité séparée des MM (Tiedemann et al., 2008).

C. Instabilités génomiques

L'instabilité génomique est un événement prépondérant dans l'oncogenèse du MM. En effet, le MM résulte de plusieurs étapes impliquant de multiples mutations génétiques successives. Deux étapes d'instabilité génomique sont décrites : les anomalies primaires survenant précocement au stade MGUS et les anomalies secondaires impliquées dans l'émergence ou la progression du MM (Figure 2) (Bergsagel et Kuehl, 2005).

→ C1. Les anomalies primaires dans le MGUS

Deux voies oncogéniques mutuellement exclusives semblent survenir précocement dans le développement du MM :

- une voie non-hyperdiploïde caractérisée par une incidence élevée de translocations au niveau de la zone « switch » du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32).
- une voie hyperdiploïde caractérisée par la présence de multiples trisomies des chromosomes impairs et associée à une faible incidence de translocation en 14q32.

C1.1 Les translocations

Dans 50% des cas, les plasmocytes malins sont caractérisés par la présence d'une translocation illégitime du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32) avec différents partenaires oncogéniques récurrents. Cette anomalie primaire, probablement acquise lors des processus d'hypermutation somatique et de commutation isotopique, est commune au MGUS et au MM ce qui démontre son apparition précoce au cours de l'oncogenèse. De plus, la prévalence de ces translocations augmente en fonction du stade de

la maladie atteignant 85% dans les leucémies à plasmocytes secondaires et 90% dans les lignées de MM. Cinq translocations récurrentes sont décrites : La translocation (t) (11;14) concerne 15 à 21% des patients et induit la dérégulation du gène de la Cycline D1 (*CCND1*). La t(4;14), décrite dans 10 à 15% des cas, entraîne la dérégulation des gènes *FGFR3* et *MMSET*, situés de part et d'autre du point de cassure du chromosome 4. Les translocations t(14;16) et t(14;20) sont détectées dans 5% et 3% des cas. Ces dernières provoquent la dérégulation des gènes codant pour C-MAF et MAFB respectivement. Enfin, la t(6;14), impliquée dans moins de 2% des MM, est associée à la dérégulation du gène *CCND3* (Gonzalez et al., 2007 ; Fonseca et al., 2009).

C1.2 L'hyperdiploidie

Dans 50% des cas, les plasmocytes malins sont caractérisés par une hyperdiploidie chromosomique impliquant multiples trisomies des chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21. De même que pour les translocations du 14q32, la présence d'hyperdiploidie est commune au MGUS et au MM et constitue donc une anomalie primaire. Comme les MM non-hyperdiploïdes, les MM hyperdiploïdes montrent une certaine hétérogénéité. En effet, d'après une étude récente, 4 sous groupes de MM hyperdiploïdes, avec différentes caractéristiques biologiques et cliniques, ont été définis (Chng et Fonseca., 2008). Cependant, ces caractéristiques biologiques sont difficiles à étudier *in vitro* car contrairement aux MM non-hyperdiploïdes, peu de lignées cellulaires hyperdiploïdes ont pu être immortalisées malgré certains progrès récents (Li et al., 2007).

C1.3 Dérégulation des Cyclines D

Malgré l'hétérogénéité génétique acquise lors des différentes anomalies primaires, tous les MGUS et MM sont caractérisés par l'expression dérégulée d'une Cycline D (D1, D2 ou D3) (Bergsagel et al., 2005). Cette expression aberrante des Cyclines D s'explique d'une part par les translocations en 14q32. En effet, la t(11;14) et t(6;14) dérégulent directement les Cyclines D1 et D3 alors que les t(14;16) et t(14;20) induisent indirectement la dérégulation du gène de la Cycline D2. Enfin, les t(4 ;14) sont également associées à une dérégulation de la Cycline D2. D'autre part, environ 40% des MGUS et MM hyperdiploïdes montrent une expression élevée de la Cycline D1.

Bien que les cellules myélomateuses aient une expression aberrante des Cyclines par rapport aux plasmocytes normaux de la moelle osseuse, les conséquences fonctionnelles de

ces dérégulations ne sont pas claires. En effet, aucune corrélation entre ces dérégulations et la prolifération ou encore la progression de la maladie n'a pu être mise en évidence. Cependant les Cyclines D ayant un rôle essentiel dans l'initiation du cycle cellulaire (phase G0/G1), ces dérégulations doivent être impliquées dans la prolifération anormale des cellules myélomateuses. En effet, à l'inverse des plasmocytes normaux, les plasmocytes myélomateux prolifèrent encore malgré leur différenciation. Il est probable que la dérégulation d'une cycline permette l'inhibition de l'arrêt du cycle.

C1.4 Classification moléculaire du MM

L'hétérogénéité génétique caractéristique du MM a récemment été confirmée grâce à la technique des puces ADN à haut débit (Zhan et al., 2006). Dans cette étude, l'analyse des profils moléculaires de 414 patients au diagnostic a permis leur classification en sept groupes. Trois groupes sont représentatifs des MM non-hyperdiploïdes. Les groupes CD-1 et CD-2 (CCND) correspondent aux MM caractérisés par une forte expression des Cyclines D1 et D3 via les t(11;14) et t(6;14). Le groupe MS (MMSET) correspond aux MM caractérisés par la t(4;14). Enfin, le groupe MF (MAF) rassemble les MM ayant une t(14;16) et t(14;20).

La présence d'hyperdiploïdie, caractéristique de 50% des patients, est représentée par le groupe HY (Hyperdiploïde). De façon intéressante, deux nouvelles signatures « fonctionnelles » ont émergées de cette étude. Un premier groupe, nommé LB pour « Low Bone Disease », se caractérise par une faible incidence de lésions osseuses. Enfin, un second groupe, nommé PR est défini par la surexpression de gènes associés à la prolifération. Ce dernier rassemble en fait les patients de chaque groupe avec une forme plus agressive.

En plus de ces 414 patients, 145 ont une signature myéloïde (groupe MY). Malgré le fait qu'elle ait une valeur pronostique, les auteurs n'ont pas pu exclure qu'une contamination de cellules myéloïdes dans les échantillons analysés en soit l'origine.

→ C2. Les anomalies secondaires

Alors que les anomalies primaires sont communes aux MGUS et MM, seul un faible pourcentage de MGUS évolue en MM. Les anomalies primaires, bien que nécessaires, ne sont pas suffisantes à l'établissement d'un MM symptomatique. En effet, un certain nombre d'événements secondaires semble provoquer l'accumulation des anomalies impliquées dans la progression du MM.

C2.1 Délétion du chromosome 13 (del(13))

L'incidence de la del(13) est globalement inférieure dans les MGUS (25%) que dans le MM (47%). Cependant la présence de monosomie 13 est dépendante du contexte génétique. D'une part, la del(13) est plus fréquemment décrite dans les MM non-hyperdiploïdes (66%) que dans les MM hyperdiploïdes (34%). D'autre part, la del(13) semble être une anomalie acquise dès le stade MGUS, pour les patients présentant une t(4;14), t(14;16) ou t(14;20). Concernant les patients présentant une t(11;14) ou t(6;14), cette délétion n'est pas détectée au stade MGUS et serait plutôt impliquée dans la progression de la maladie.

Les conséquences biologiques associées à la del(13) ne sont pas définies mais pourraient provoquer la dérégulation d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un miRNA. (Avet-Loiseau et al., 2002 ; Chiecchio et al., 2009)

C2.2 Anomalies du chromosome 1

Les anomalies du chromosome 1 sont associées à la perte du bras court (1p) et au gain de plusieurs copies du bras long (1q). Les anomalies en 1q semblent provoquer la dérégulation de la protéine CKS1B, dont le rôle oncogénique serait la déstabilisation de p27^{Kip1} (Chang et al., 2010). De façon intéressante, deux autres gènes impliqués dans la pathologie du MM, *MCL1* et *IL6R*, sont localisés en 1q mais les liens entre leur surexpression et leur localisation génique n'ont pas été prouvés. Les anomalies liées au chromosome 1 sont observées chez 1/3 des patients et sont associées à la transformation des MGUS en MM ainsi qu'à la génération de clones particulièrement agressifs.

C2.3 Dérégulation de *MYC*

Les translocations impliquant le gène *MYC* sont décrites dans 15% des MM symptomatiques mais sont indétectables au stade MGUS. De plus l'incidence des ces translocations augmente en fonction du stade de la maladie atteignant 45% dans les tumeurs avancées et 90% dans le lignées de MM. La dérégulation de *MYC* est donc une anomalie tardive dans l'oncogenèse du MM. Un quart de ces réarrangements est dû aux t(8;14) et t(8;22), définies comme des translocations réciproques secondaires. Ces translocations ne sont pas médiées par les mécanismes de remodelage d'ADN spécifique des lymphocytes B tels que la commutation isotopique. En effet, la majorité des dérégulations de *MYC* serait la conséquence de translocations ou insertions plus complexes impliquant de multiples chromosomes. (Chesi et al., 2008)

C2.4 Mutation de Ras

Plusieurs mutations induisent l'activation constitutive des oncogènes N-RAS et K-RAS2. Ces dérégulations, plutôt rares au stade MGUS, sont détectées dans 25% des MM au diagnostic et dans 45% des MM à la rechute et des lignées de MM. Ces mutations sont associées à la progression de la maladie ainsi qu'à la résistance aux thérapies.

La surexpression ectopique de ces oncogènes mutés induit l'indépendance d'une lignée de MM à l'IL6 (Billadeau et al., 1995). De plus, cette surexpression induit une augmentation de la prolifération, de la capacité de migration ou encore de la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Ces phénomènes seraient médiés par l'induction, via RAS, des voies Erk, Akt, mTOR et NF-κB, voies décrites comme essentielles dans la progression et l'agressivité du MM (Hu et al., 2003 ; Hoang et al., 2006 ; Chng et al., 2008).

C2.5 Mutation de TP53

Le gène *TP53*, localisé en 17p13, code pour la protéine p53 qui est un facteur de transcription impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation d'ADN et l'apoptose. Les mutations (ou délétions) de p53 sont détectées dans environ 10% des cas de MM au diagnostic. Cet événement semble donc relativement rare et représenterait une anomalie tardive dans la progression de la maladie (Chng et al., 2007). En effet, les mutations de p53 sont associées avec le stade extramédullaire et nous les avons décrites dans 65% des lignées avec perte d'hétérozygotie.

La perte du bras court du chromosome 17 (17p), qui a un poids pronostic très péjoratif, constitue une anomalie secondaire importante dans l'évolution du MM et est détectée chez environ 10% des patients. Bien que les mutations de p53 soient exclusivement liées à une perte du 17p (Avet-Loiseau et al., 2010), il n'est cependant pas déterminé si le phénotype agressif associé à la perte du 17p est exclusivement dû à la mutation p53. Dans les lignées, nous avons observé que les conséquences de mutations de p53 *in vitro* sont une résistance accrue aux agents chimiothérapeutiques tels que le Melphalan, le Bortezomib, ou encore à Trail.

C2.6 Les anomalies de la voie NF-κB

La voie NF-κB est constitutivement active dans 82% des cas de MM. Les interactions entre le microenvironnement et la tumeur ont un rôle essentiel dans cette activation. Cependant, dans 15 à 20% des cas, elle est la conséquence de diverses anomalies génétiques

impliquant les acteurs clefs de cette voie tels que l'activation NF- κ B1, NF- κ B2, NIK ou encore l'inactivation de TRAF3 ou cIAP1/2. Bien que les conséquences de l'hyperactivation de la voie NF- κ B dans la progression du MM ne soient pas encore définies, elle est considérée comme une anomalie secondaire (Annunziata et al., 2007 ; Keats et al., 2007).

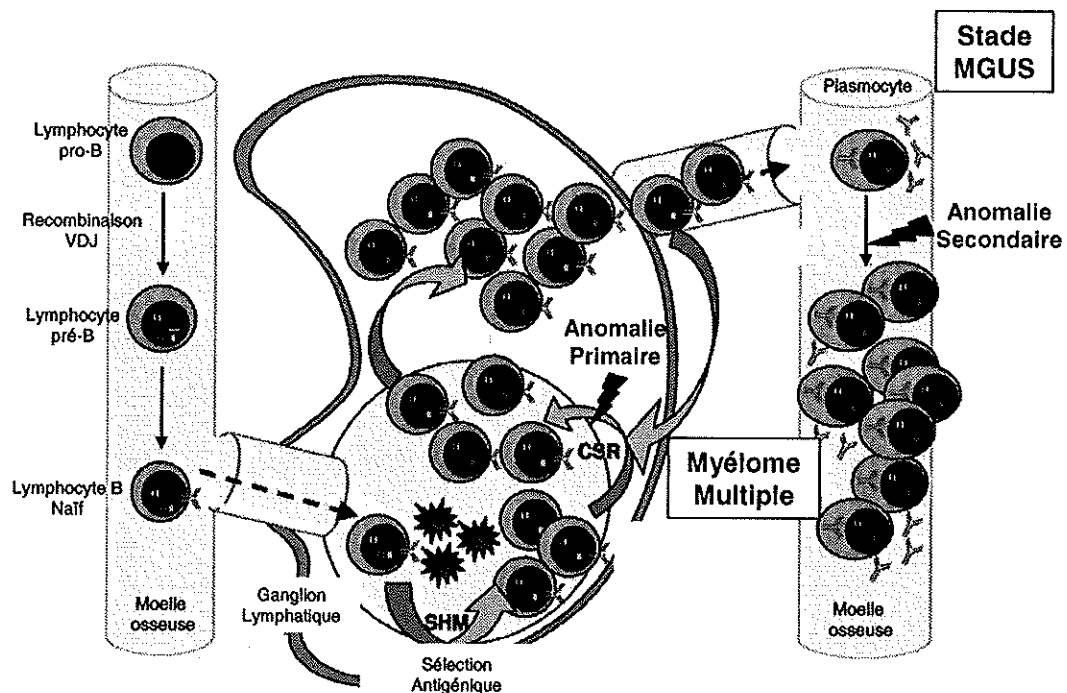


Figure 2A : Oncogenèse du MM
D'après Gonzalez et al. Blood 2007

L'oncogenèse du MM résulte de plusieurs étapes impliquant plusieurs anomalies successives. Deux étapes d'instabilité génomique sont décrites : les anomalies primaires survenant précocement au niveau des ganglions lymphatiques lors des mécanismes d'hypermutations somatiques et de commutation isotypique. Ces anomalies primaires résultent en l'émergence du stade MGUS. Les anomalies secondaires impliquées dans l'émergence ou la progression du MM s'accumulent plus tardivement dans la moelle osseuse.

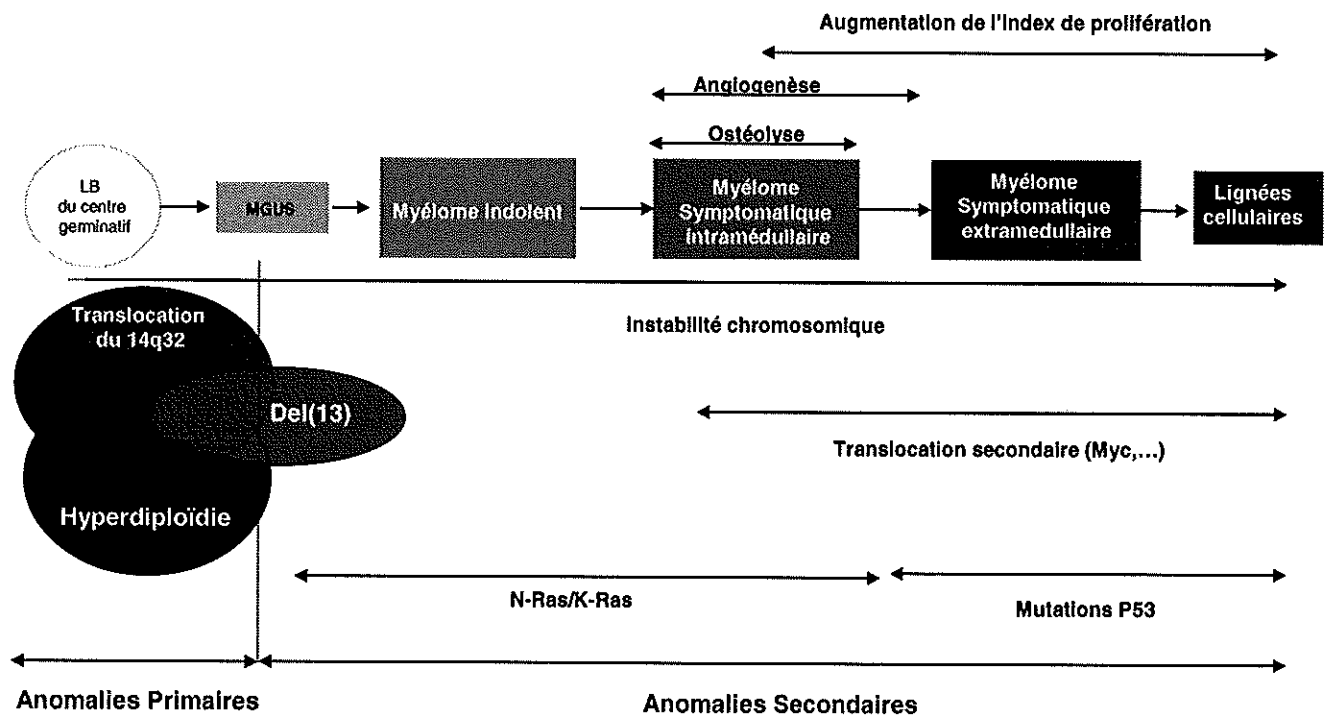


Figure 2B : Oncogénèse du MM : Anomalies Génomiques

D'après Kuehl et Bergsagel, 2002

Deux voies oncogéniques mutuellement exclusives semblent survenir précocement dans le développement du MM :

- une voie non-hyperdiploïde caractérisée par une incidence élevée de translocations au niveau de la zone « switch » du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32).
- une voie hyperdiploïde caractérisée par la présence de multiples trisomies des chromosomes impairs et associée à une faible incidence de translocation en 14q32.

Alors que ces anomalies primaires sont communes aux MGUS et MM, seul un faible pourcentage de MGUS évolue en MM. Les anomalies primaires, bien que nécessaires, ne sont pas suffisantes à l'établissement d'un MM symptomatique. En effet, un certain nombre d'événements secondaires semble provoquer l'accumulation des anomalies impliquées dans la progression du MM. Parmi ces anomalies secondaires les mutations de Ras et de p53, les délétions du chromosome 13 (del(13)) ou encore l'amplification de c-myc par diverse translocations sont des événements majeurs.

D. Dérégulation de la prolifération et des processus apoptotiques

Les plasmocytes normaux ayant achevé leur différenciation ne prolifèrent plus dans la moelle osseuse. Inversement, les cellules de MM sont caractérisées par une prolifération persistante accompagnée d'un défaut d'apoptose résultant en une accumulation dans la moelle osseuse (Witzig et al., 1999).

→ D1. Prolifération

D1.1 Sous population proliférante

L'index de prolifération est une mesure permettant de déterminer le % de cellules en phase S dans la tumeur, selon différentes techniques tel que l'incorporation du BrdU (Robillard et al., 2005) ou le marqueur Ki67 (Gastinne et al., 2007). Le MM est décrit comme une hémopathie peu proliférante, caractérisée par un faible index de prolifération globale, rarement supérieure à 1%. Cet index de prolifération est un fort facteur pronostic et augmente pendant l'évolution de la maladie. En effet, il est estimé à moins de 0,5% dans les MGUS mais peut atteindre 50% dans les stades les plus avancés.

Alors que l'index de prolifération prend en compte la masse tumorale dans sa globalité, seule une faible sous population de cellules malignes est fortement proliférante. Ceci a été montré pour la première fois dans une étude utilisant *in vivo* des injections thymidine tritiée (3H-TdR) chez 17 patients atteints de MM au diagnostic, en rémission ou en rechute (Drewinko et al., 1981). Cette étude a permis de mettre en évidence que la masse tumorale des patients au diagnostic ou en rémission est maintenue par une très faible fraction, généralement inférieure à 1%, de cellules proliférantes. Cette fraction augmente dramatiquement au moment de la rechute, allant de 14% à 83%, particulièrement dans les cas de rechute extramedullaire. Cette sous population proliférante, à l'origine du renouvellement cellulaire impliqué dans la progression tumorale, montre un fort index de prolifération (5 à 25%) et semble morphologiquement immature, de type pro-plasmocytaire. D'un autre côté, la majorité de la masse tumorale semble plus mature avec un faible index de prolifération (0,4-4%) (Greipp et al., 1987).

D1.2 Concept du CD45

Bien que les cellules myélomateuses proviennent d'un même clone, elles semblent donc intraclonalement hétérogènes. Récemment, notre équipe a mis en évidence que ces 2 populations peuvent être discriminées par l'expression du CD45 (Robillard et al., 2005). Le

CD45 est un récepteur transmembranaire à activité phosphatase nécessaire à l'activation et à la différenciation lymphocytaire. Présent à la surface des lymphocytes B proliférant, l'expression du CD45 baisse progressivement au cours de la différenciation plasmocytaire normale (Hermiston et al., 2003).

Dans le MM, le compartiment proliférant est cytologiquement immature, localisé le long des travées osseuses, et caractérisé par une forte expression du CD45. Le reste de la masse tumorale est au contraire constitué de plasmocytes peu proliférants caractérisés par une faible expression du CD45. Tous les patients de MM analysés retiennent cette faible population CD45^{fort} alors que la faible expression du CD45, caractéristique de la fraction majoritaire, est perdue chez 25% des patients au diagnostic. De plus, ces cellules CD45^{neg} sont globalement moins sensibles à l'apoptose (Ishikawa et al., 2006). On distingue donc les MM CD45^{faible} des MM CD45^{neg}, ces derniers sont caractérisés par un mauvais pronostic et représentent 50% des patients à la rechute (Pellat-Deceunynck et Bataille, 2004).

La phosphatase CD45 n'est pas seulement un marqueur des différents compartiments cellulaires impliqués dans le développement du MM. En effet, la présence ou l'absence du CD45 est déterminante dans la réponse à l'IL6 ou l'IGF-1, principaux facteurs de croissance et de survie impliqués dans la biologie du MM. En effet, l'IL6 entraîne la relocalisation du CD45 dans les rafts, localisation essentielle pour l'activation des kinases SRC. L'activation de ces kinases est nécessaire à l'induction de la prolifération cellulaire IL6-dépendante (Ishikawa et al., 2002). Bien que l'activation des voies Jak/Stat et Erk soit commune aux cellules CD45+ et CD45- après stimulation par l'IL6, l'absence d'activation des kinases SRC rend les cellules CD45- moins sensibles. D'un autre côté, la phosphatase CD45 déphosphoryle l'IGF1R, bloquant ainsi l'activation de la voie Pi3k/Akt qui est essentielle dans la réponse des cellules de MM à l'IGF-1 (Descamps et al., 2004). L'expression du CD45 détermine donc le type de signalisation à l'origine de la prolifération des cellules de MM. De plus, la progression des cellules MM hors des travées osseuses serait caractérisée par la transition entre un MM CD45+ dépendant de l'IL6 à un MM CD45- dépendant de l'IGF-1.

→ D2. Anomalies dans les processus Apoptotiques

Le MM est caractérisé par une faible prolifération tumorale mais aussi par un faible index apoptotique *in vivo*. Cette résistance aux stimuli apoptotiques est essentielle à la croissance tumorale ainsi qu'à la résistance aux traitements.

Les caspases sont un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation. Elles peuvent être classées en trois différents groupes :

- certaines caspases, tel que la caspase 1, sont impliquées dans les réponses inflammatoires mais ne semblent pas avoir de rôle primordial dans le processus apoptotique.

Les autres caspases jouent ont un rôle dans l'apoptose et se classent en deux groupes distincts

- les caspases initiatrices telles que les caspases 8 et 9
- les caspases effectrices telles que la caspase 3 et 7

Deux voies majeures d'apoptose conduisent à l'activation des caspases : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale de l'apoptose, est régulée par les protéines de la famille bcl-2 et implique le changement conformationnel des protéines proapoptotiques comme BAX. Dans les cellules myélomateuses, l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et MCL-1 est augmentée par rapport aux plasmocytes normaux. Ces dérégulations sont associées à la survie cellulaire et à la chimiorésistance des cellules myélomateuses (Oancea et al., 2004). De nombreux travaux effectués par notre équipe ont mis en évidence un rôle primordial de MCL-1 dans le MM (Derenne et al., 2002). En effet, il a été démontré que son expression corrèle avec la progression de la maladie (Wuilleme-Toumi et al., 2005), que son accumulation prévient l'apoptose et que son inactivation est requise au déclenchement de l'apoptose par divers agents chimiothérapeutiques (Gomez-Bougie et al., 2005 ; Gomez-Bougie et al., 2007)

La voie extrinsèque est activée par les ligands de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), tels que le TNF α , FasL ou encore TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) ayant respectivement pour récepteurs TNF-R2, CD95 et TRAIL-R1/R2. Tous ces récepteurs possèdent un domaine de mort (DD, death domain) intracellulaire permettant la transduction d'un signal apoptotique (Kimberley et Screaton, 2004).

TRAIL présente un intérêt thérapeutique particulier car il induit l'apoptose de nombreux types de cellules cancéreuses alors que les cellules normales sont relativement résistantes (Van Geelen et al., 2004). En se liant à ses récepteurs, il induit la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le DISC est composé des récepteurs de mort et de la protéine adaptatrice FADD qui assure le recrutement et l'activation de la procaspase-8 (Kischkel et al., 2000). La caspase 8 va activer à son tour les caspases effectrices telles que la

caspase 3 et ainsi induire l'apoptose cellulaire. Il a récemment été mis en évidence que l'activation du récepteur TRAIL par les anticorps à usage thérapeutique Mapatumumab et Lexatumumab, respectivement agonistes de TRAIL-R1 et TRAIL-R2, induit une forte apoptose dans les lignées et les cellules primaires de patients de MM (Ménoret et al., 2006).

E. Le microenvironnement myélomateux

→ E1. La niche médullaire

L'environnement médullaire forme une niche pour les cellules tumorales myélomateuses. Il est composé d'un compartiment hématopoïétique constitué de cellules souches hématopoïétiques, de progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux ou encore de cellules immunes (lymphocytes, cellules NK, macrophages, monocytes, cellules dendritiques). De plus, il est composé d'un compartiment non hématopoïétique constitué de cellules stromales, d'ostéoclastes, d'ostéoblastes et de cellules endothéliales. Enfin, un compartiment non cellulaire comprend la matrice extracellulaire, la fibronectine ou encore le collagène (Figure 3). Les interactions avec ces trois compartiments sont essentielles à la pathogenèse du MM. En effet, elles soutiennent la prolifération, la survie, le recrutement, la migration et la résistance aux drogues des cellules de MM (Podar et al., 2009).

Parallèlement, les cellules myélomateuses vont influencer sur l'équilibre médullaire en participant à l'inhibition de l'ostéoblastogenèse et à la stimulation de l'ostéoclastogenèse. Ce déséquilibre est en parti médié via la modulation par les cellules de MM de l'OPG, RANKL, MIP α , l'IL6, l'IL3 ou encore DKK1. Sur le plan clinique ce déséquilibre va provoquer une hypercalcémie ainsi que de nombreuses lésions ostéolytiques (Giuliani et al., 2001 ; Giuliani et al., 2006 ; Roodman, 2009).

De nombreuses cytokines et facteurs de croissance sont produits et sécrétés par les cellules de MM et les cellules de microenvironnement médullaire. Ainsi, l'IL6, l'IGF-1, le VEGF, les membres de la superfamille du TNF (CD40, TNF α , BAFF, APRIL) ou encore le SCF, SDF1 α , l'IL1b, IL21 ou l'IFN sont impliqués dans la biologie du MM (Lauta et al., 2003 ; Mahtouk et al., 2010).

En plus des facteurs solubles, des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion à la matrice extracellulaire et dans les contacts entre cellules ont un rôle essentiel dans la niche médullaire. Parmi ces récepteurs, certaines intégrines, cadherines, selectines, syndecans ou encore certains membres de la superfamille de Ig ont été décrits (Podar et al., 2009). Les boucles autocrines et paracrines ainsi que les contacts entre cellules vont induire des cascades

de signalisation dans les cellules myélomateuses. Ainsi, de nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des voies Ras/Mapk, Pi3k/Akt, Jak2/Stat3, NF- κ B ou encore Wnt ou Notch.

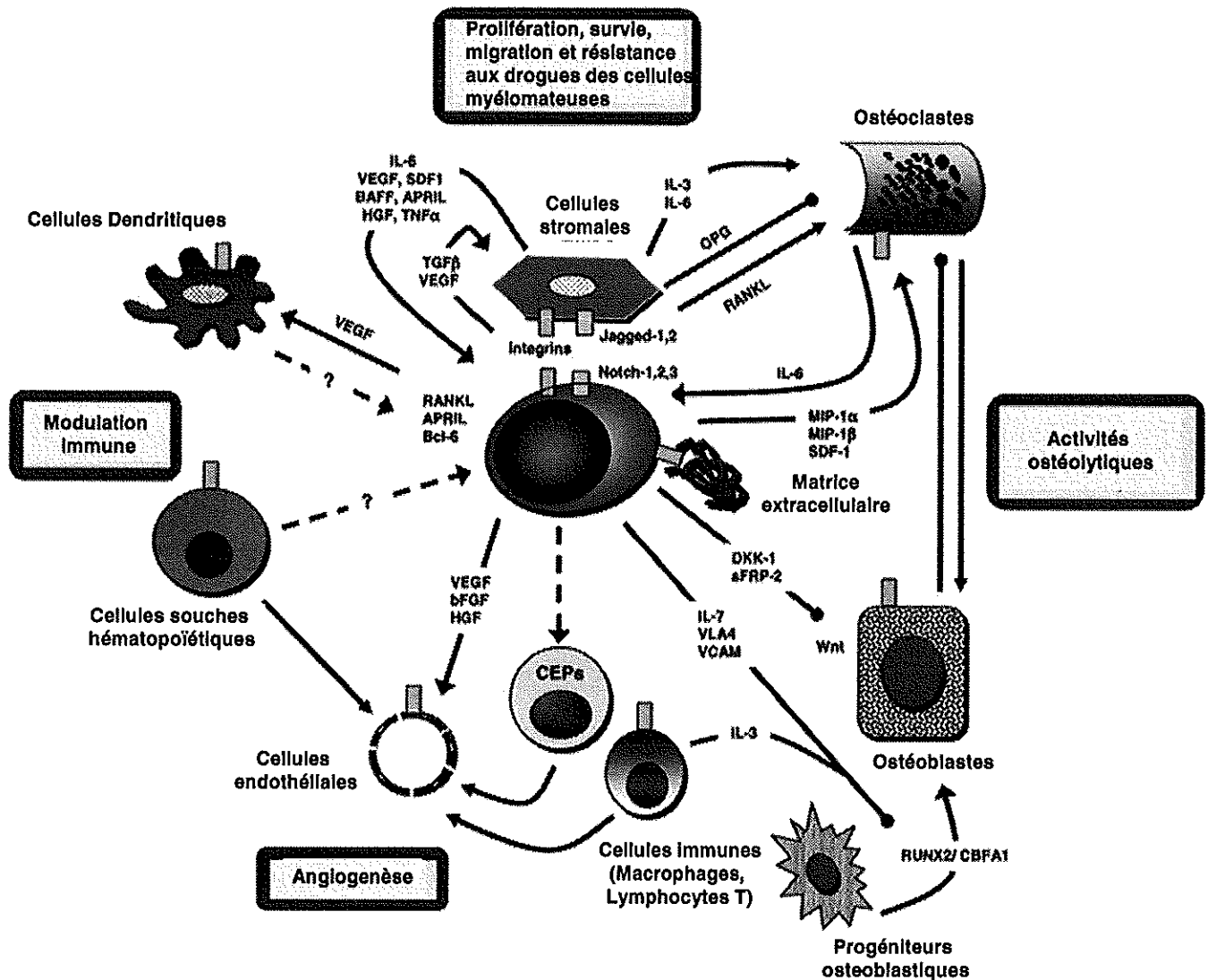


Figure 3 : Interactions de cellules myélomateuses avec les différents compartiments de la niche médullaire
D'après Podar et al., 2009

Les nombreuses interactions entre les cellules myélomateuses et leur microenvironnement sont essentiels à la pathogenèse du MM. En effet, les différentes composantes cellulaires de l'environnement sécrètent de nombreuses cytokines proinflammatoires impliquées dans la survie et la prolifération des cellules myélomateuses. Parallèlement, les cellules myélomateuses vont influencer sur l'équilibre médullaire en participant à l'inhibition des ostéoblastes et à la stimulation des ostéoclastes. CEPs : progéniteurs des cellules endothéliales.

→ E2. Les facteurs de croissance et leurs voies de signalisations

Les principaux facteurs de croissances impliqués dans la biologie du MM peuvent être différenciés en fonction des voies de signalisation qu'ils induisent préférentiellement (Figure 4).

E2.1 Voie Ras/Mapk et Jak/Stat

- L'interleukine 6 (IL6)

L'IL6 est un facteur essentiel pour la différenciation des LB en plasmocytes et est un facteur de prolifération important au stade plasmablastique (Jego et al., 2001 ; Jego et al., 2003). Il est en outre un des facteurs de croissance et de survie les plus importants dans la biologie du MM. L'IL6 est un facteur paracrin pour les cellules myélomateuses car il est produit par les cellules de l'environnement médullaire et plus particulièrement les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules stromales. Une autocrinie IL6 est toutefois détectée dans certains cas et est associée à un phénotype malin sévère (Kawano et al., 1988 ; Klein et al., 1989 ; Bataille et al., 1989). La synthèse d'IL6 est stimulée par des contacts directs entre les cellules de l'environnement et les cellules myélomateuses ainsi que par des facteurs solubles comme le TNF α , l'IL1 β ou encore le VEGF. Les plasmocytes tumoraux expriment le récepteur à l'IL6 (IL6R) et l'augmentation de son expression est corrélée avec l'évolution de la maladie (Barrillé et al., 1999). L'IL6R est composé de 2 chaînes polypeptidiques : une chaîne α spécifique, la gp80 et une chaîne β transductrice commune à plusieurs cytokines, la gp130. L'IL6 s'associe à la gp80 et le complexe ainsi formé va induire l'homodimérisation de la gp130 et permettre la transduction du signal.

Les principales voies de transduction activées sont les voies Jak2/Stat3 et Ras/MAPK/Erk. Ces voies sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de MM. D'une part, les protéines STATs sont des facteurs de transcription et leur translocation vers le noyau va permettre la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération des cellules de MM tels que Bcl-XL, MCL1 ou encore la CyclineD1 (Catlett-Falcone et al., 1999 ; Puthier et al., 1999). D'autre part, l'activation de la voie Ras/Mapk/Erk s'initie par la formation du complexe SHC/GRB2/SOS qui va recruter RAS, lui-même à l'origine de la cascade d'activation des MAPKs telles que MEK-1 puis ERK1/2. Une fois phosphorylé ces dernières activent à leurs tours plusieurs facteurs de transcription essentiels à la survie et à la prolifération de cellules de MM.

L'expression de la protéine RAS mutée (N-RAS/K-RAS) induit l'activation constitutive de cette voie, expliquant en parti l'agressivité particulière des clones myélomateux portant cette mutation. En plus des voies Jak2/Stat3 et Ras/Mapk/Erk, il a été démontré que l'IL6 active la voie Pi3k/Akt dans certaines lignées de MM. Cependant cette activation est faible et transitoire en comparaison à celle observée après stimulation par des cytokines tel que l'IGF-1 (Klein et al., 2003 ; Lentzsch et al., 2004).

De nombreux travaux ont montré la conséquence de l'activation de ces voies par l'IL6. En effet, l'IL6 induit la prolifération *in vitro* des cellules de MM (Zhang et al., 1989) et permet la résistance à certains stimuli apoptotiques induits par la privation de sérum, l'activation de Fas et certaines drogues utilisées en clinique comme la dexaméthasone (Juge-Morineau et al., 1995 ; Xu et al., 1998). *In vivo*, les souris KO IL6-/- ne développent plus de tumeur plasmocytaire (Hilbert et al., 1995). De plus, les taux sériques en IL6 et IL6R soluble ainsi que la forte expression de l'IL6R sont associés à de mauvais pronostics (Bataille et al., 1989). Etant donné l'implication de l'IL6 dans la biologie du MM plusieurs laboratoires évaluent l'utilisation potentielle d'anticorps anti-IL6 dans le traitement du MM.

- Les membres de la famille IL6 ; et l'IL10

Plusieurs cytokines telles que l'OSM, le LIF, le CNTF ou encore l'IL11, partagent la gp130 avec l'IL6 (Zhang et al., 1994a). Ces cytokines sont produites en faible quantité par les cellules myélomateuses et les cellules de l'environnement mais leur implication dans l'émergence de la maladie reste à préciser. L'IL10 est aussi un facteur de croissance des cellules de myélome et sa production autocrine semble être dépendante de l'IL6 (Kovacs, 2010). De plus, l'IL10 induit l'expression de l'OSMR, rendant fonctionnel l'effet autocrin de l'OSM (Klein et al., 1999).

- L'Interféron- α (IFN α)

Dans l'organisme, l'IFN α est principalement produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes lors des réponses immunitaires aux infections virales.

Comme l'IL6, l'IFN α est impliqué dans la différenciation B (Jego et al., 2003) et active les voies Jak/Stat et Ras/Mapk/Erk (Ferlin-Bezombes et al., 1998). Cependant, les conséquences biologiques de l'IFN α dans le MM sont controversées. Alors que plusieurs groupes le décrivent comme un facteur de survie (Jourdan et al., 1991 ; Ferlin-Bezombes et al., 1998) ; d'autres lui imputent un rôle anti-tumoral. En effet, certains groupes ont décrit un

effet antiprolifératif ou encore apoptotique de l'IFN α sur les cellules de MM (Crowder et al., 2005 ; Gomez-Benito et al., 2007). L'IFN α a été utilisé pendant plus de 20 ans en maintenance dans le traitement du MM et une méta-analyse effectuée sur 4000 patients met en évidence un bénéfice de survie significatif, mais faible, des patients traités par ce facteur (Myeloma Trialists' Collaborative Group, 2001).

De nombreuses études ont impliquées différents mécanismes dans l'hétérogénéité de la réponse IFN des cellules myélomateuses (Arora et al., 1998). De façon intéressante, une équipe a récemment mis en évidence l'importance d'un polymorphisme du facteur de transcription NF- κ B1 dans la réponse des patients à une thérapie IFN. D'après ces résultats, seuls les sujets portant l'allèle normal de ce facteur bénéficient d'une telle thérapie. La découverte de ce facteur pronostic de la réponse IFN chez les patients atteints de MM, pourrait relancer le débat sur son utilisation dans le traitement de la maladie (Vangsted et al., 2009).

E2.2 Voie Ras/Mapk/Erk et Pi3k/Akt

- L'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1)

Comme l'IL6, l'IGF-1 est un facteur majeur dans la biologie du MM. Il est produit par le foie mais aussi par certaines cellules de l'environnement médullaire telles que les ostéoblastes, les cellules endothéliales ou encore les cellules stromales. Contrairement à l'IL6, l'IGF-1 est un facteur autocrin pour la majorité des lignées et cellules primaires de MM. L'IGF-1 favorise la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration et la résistance aux drogues des cellules de MM *in vitro* (Descamps et al., 2004 ; Qiang et al., 2004 ; Descamps et al., 2006) et *in vivo* (Mitsiades et al., 2004).

Tout comme l'IL6, l'IGF-1 va induire la voie Ras/Mapk mais la voie Pi3k/Akt est la voie majeure de régulation de l'apoptose et de la prolifération induite. Suite à sa ligation avec l'IGF-1, L'IGF-1R, récepteur à activité tyrosine kinase, va activer la PI3K qui induit la génération de PIP3 (phosphatidylinositol-3 phosphate) et la phosphorylation d'AKT. La voie Pi3k/Akt régule la croissance cellulaire via l'activation de mTOR/p70S6K et influence le cycle cellulaire en agissant directement sur les inhibiteurs de CDK p21^{WAF1} et p27^{Kip1} ou encore, indirectement sur p53 et la Cycline D1. Un anticorps antagoniste du récepteur à l'IGF-1 entraîne un blocage du cycle cellulaire des cellules myélomateuses CD45^{neg} qui deviennent alors sensibles à différents stimuli apoptotiques (Descamps et al., 2006 ; Descamps et al., 2009).

La perte d'expression de PTEN, fréquente dans les cancers, conduit à une activation constitutive de la voie Pi3k/Akt. Cependant, une étude effectuée sur les lignées de MM met en évidence que l'expression de PTEN est conservée dans 90% des cas. Bien que l'on ne puisse pas exclure la présence de mutations inactivatrices de PTEN dans le MM, la perte d'expression du CD45 semble plus importante pour la suractivation de cette voie (Descamps et al., 2004).

Une étude comparative du phénotype des plasmocytes de patients au diagnostic et en rechute a mis en évidence une expression aberrante de l'IGF-1R (CD221). L'expression de l'IGF-1R par les cellules de MM est associée à un génotype non-hyperdiploïde, majoritairement aux t(4 ;14), et corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients (Sprynski et al., 2009). De plus, les taux sériques en IGF-1 sont aussi un facteur de mauvais pronostic (Standal et al., 2002).

D'autres facteurs de croissance tels que l'IL21, le HGF, HB-EGF, le FGF ou encore le VEGF activent la voie Pi3k/Akt et ont été impliqués dans la prolifération, la survie ou encore l'angiogénèse. Cependant, l'IL21, le HGF ou encore le HB-EGF agiraient principalement via l'induction d'une boucle autocrine IGF-1 (Ménoret et al., 2008 ; Klein et al., 2009).

- C-KIT (CD117) et le Stem Cell Factor (SCF)

Le récepteur à tyrosine kinase C-KIT, est exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs myéloïdes, les cellules dendritiques ou encore les cellules proB et proT et semble avoir un rôle essentiel dans le développement et la survie des progéniteurs hématopoïétiques (Ray et al., 2008). D'autre part, la dérégulation de ce récepteur, notamment par la présence de mutations activatrices, a été décrite dans plusieurs cancers tels que les tumeurs stromales gastro-intestinal (GIST) et le mélanome (Corless et al., 2004 ; Miettinen et Lasota, 2005).

Deux différents isoformes de C-KIT, caractérisés par la présence ou l'absence d'un tétrapeptide extracellulaire (GNNK), sont décrites dans le MM. L'absence de ce tétrapeptide permet une réponse plus rapide et plus prononcée des cellules de MM au SCF. Il a été mis en évidence dans une lignée de MM, transfectée par ces différentes isoformes, que le SCF induit la phosphorylation des MAPK ERK1/2, ERK5 ainsi que l'activation de la voie Pi3k/Akt et protège partiellement de l'apoptose induite par la dexaméthasone (Montero et al., 2008) .

L'imatinib mesylate a un effet anti prolifératif ou apoptotique (à forte dose) sur certaines lignées de MM (Pandiella et al., 2003 ; Bai et al., 2010). L'imatinib mesylate n'est

pas spécifique du récepteur C-KIT mais est un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant la protéine ABL, C-KIT et le PDGFR. Il a cependant montré une bonne efficacité dans le traitement des GIST caractérisées par une activation constitutive du récepteur C-KIT (Joensuu et al., 2001). De plus, certains travaux montrent des effets non spécifiques de l'imatinib mésylate sur le remodelage osseux via une inhibition osteoclastique accompagnée d'une activation osteoblastique (Vandyke et al., 2010)

Les cellules de MM, contrairement aux plasmocytes normaux, expriment C-KIT. Il est détecté dans 50% des MGUS et des MM au diagnostic mais dans seulement 8% des MM à la rechute. De façon surprenante, l'expression de C-KIT est un facteur de bon pronostic. En effet, il est fortement associé aux MM hyperdiploïdes et son expression s'oppose à celle de l'IGF-1R qui est de très mauvais pronostic (Bataille et al., 2008). Enfin, un essai de phase 2 sur une série de patients en rechute n'a pas montré d'intérêt thérapeutique à l'utilisation de l'imatinib mésylate dans le MM (Dispenzieri et al., 2006).

E2.3 La voie NF- κ B

NF- κ B est composé d'une famille de facteurs de transcription assemblés à travers la combinaison de protéines de type Rel : p50, p52, c-Rel, p65/RelA et Rel B (Moynagh et al., 2005). Ces dimères sont séquestrés et inactivés dans le cytoplasme grâce à la présence des inhibiteurs I κ B. Certains stimuli extracellulaires vont activer la voie NF- κ B via l'activation des kinases IKK qui assurent à leur tour la phosphorylation de I κ B, alors dégradé par le protéasome. Deux voies NF- κ B sont décrites, la voie classique et la voie alternative. Les cellules de MM montrent une activation constitutive de cette voie qui participe à la résistance à certaines drogues telles que le bortézomib ou encore Trail. De plus, les cellules myélomateuses sont très sensibles à son inhibition qui induit un arrêt de prolifération ainsi qu'une forte apoptose (Romagnoli et al., 2007). Une étude des profils d'expression génique a révélé la présence d'une signature NF- κ B pour 82% des patients au diagnostic. Dans la majorité des cas, l'impact du microenvironnement sur la tumeur serait à l'origine de cette activation. En effet, il a été mis en évidence que les contacts entre cellules, l'adhérence à la matrice extracellulaire ainsi que de nombreux facteurs solubles induisent l'activation de cette voie dans les cellules myélomateuses (Li et al., 2008). Parmi ces facteurs, les membres de la superfamille du TNF tels que le TNF α , CD40L, LT $\alpha\beta$, BAFF, APRIL ou encore RANKL sont de puissants activateurs de la voie NF- κ B (Tai et al., 2006 ; Romagnoli et al., 2007). Cependant, dans 15 à 20% des cas, des anomalies génétiques ont été impliquées et concernent

la surexpression d'activateur de cette voie tel que NIK ou encore l'inactivation d'inhibiteurs tel que TRAF3 ou C-IAP (Annunziata et al., 2007 ; Keats et al., 2007).

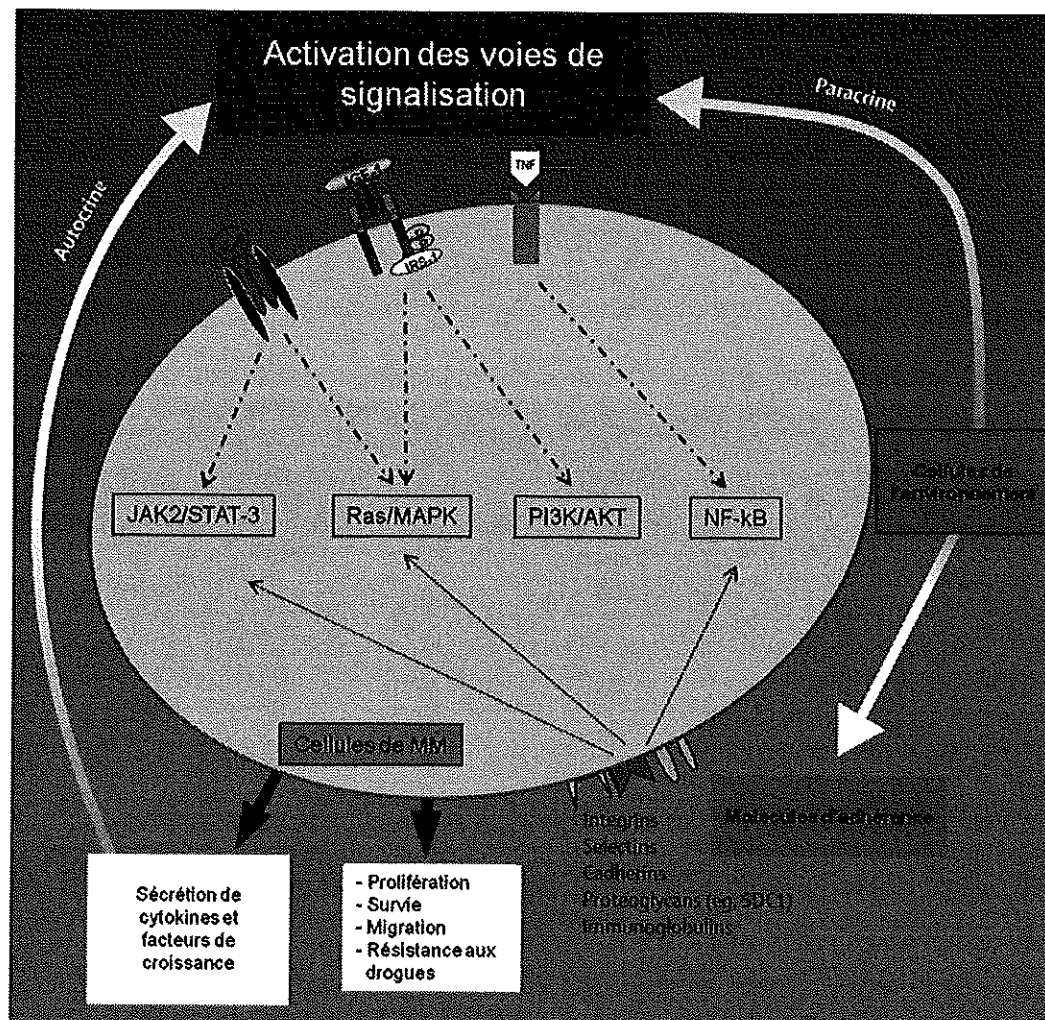


Figure 4 : Principales voies de signalisation impliquées dans la biologie du MM
D'après Raab et al. 2009

Les voies Jak2/Stat3, Ras/Mapk, Pi3k/Akt et NF-κB sont induites par les principaux facteurs de croissance décrits dans le MM tels que l'IL6, l'IGF-1 ou encore les membres de la famille du TNF. Ils sont sécrétés de façon paracrine par les cellules de l'environnement ou encore de façon autocrine par les cellules myélomateuses.

F. Les facteurs pronostiques

Les patients atteints de MM montrent une grande hétérogénéité en termes de survie. Cette variabilité est reliée aux caractéristiques du patient, tel que l'âge, mais aussi aux caractéristiques intrinsèques à la tumeur. La définition de facteurs pronostics permettant de déterminer la survie des patients et d'adapter le traitement est au centre des recherches effectuées sur le MM depuis 40 ans (Carbone et al., 1967). Aujourd'hui, les facteurs pronostics les plus pertinents sont liés à la masse tumorale ou aux caractéristiques phénotypes et génotypiques du clone myélomateux.

Pendant de nombreuses années, le taux sérique de $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2M$) a été le facteur pronostic le plus important, ce taux étant d'autant plus élevé que la masse tumorale est importante (Bataille et al., 1983). L'index pronostique prenant en compte la $\beta 2M$ associée au taux d'albumine reste d'ailleurs le standard international. Les cellules de MM sont caractérisées par l'expression importante d'héparane sulfate (syndecan1/CD138) à leur surface (Pellat-Deceunynck et al., 1994). Récemment, le taux sérique de CD138 soluble a été mis en relation avec un mauvais pronostic (Lovell et al., 2005). D'autre part, la présence de plasmocytes circulant au diagnostic (Billadeau et al., 1996) ou encore la détection de maladie résiduelle, après chimiothérapie à haute dose et autogreffe, sont des facteurs de mauvais pronostics (Paiva et al., 2008).

De nombreuses caractéristiques phénotypiques telles que l'expression du CD45, CD56, CD221, CD117 ou encore CD27 par les clones myélomateux sont aussi liées à la survie des patients (Figure 5). Enfin, les caractéristiques cytogénétiques déterminées par la technique du FISH ou encore la classification moléculaire ont permis de déterminer des indicateurs pronostics importants (Zhan et al., 2008 ; Avet-Loiseau, 2007). Ainsi, ces techniques de cytogénétique mettent en évidence que les $t(4;14)$, $t(14;16)$, $t(14;20)$, mais aussi la délétion du chromosome 17p et le gain du 1q sont associés à une survie plus courte des patients traités par Melphalan à haute dose suivi d'une autogreffe de cellules souches. D'un autre côté la $t(11;14)$ serait de pronostic neutre et l'hyperdiploidie globalement de bon pronostic. Concernant la classification moléculaire, Zhan et al ont mis en évidence que les patients ayant un profil HY, CD-1, CD-2 et LB avaient une survie à 36 mois relativement supérieure à celle des patients ayant un profil PR, MS ou encore MF (Figure 5).

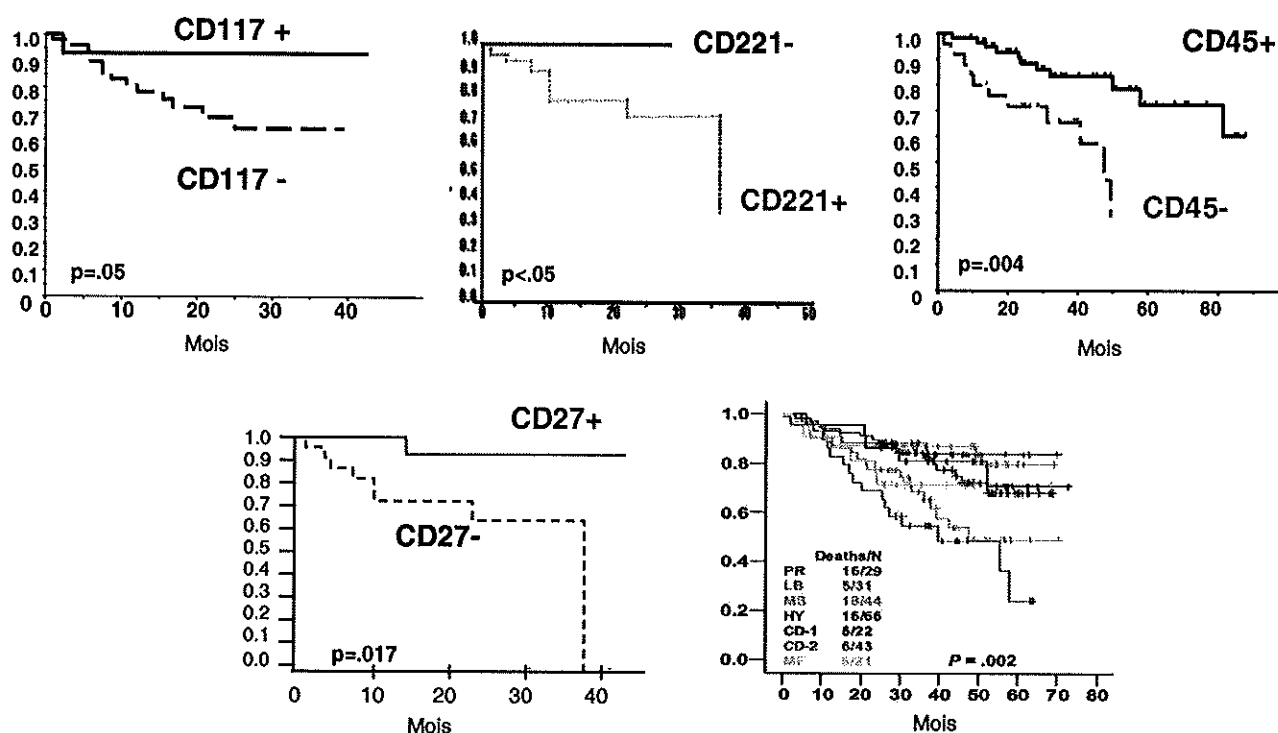


Figure 5 : Hétérogénéité de la survie des patients en fonction des facteurs pronostics

D'après Moreau et al., 2004; Bataille et al., 2005; Moreau et al., 2006;

Bataille et al., 2007 ; Zhan et al., 2006.

Impact pronostic de différents marqueurs phénotypiques (CD117, CD221, CD45, CD27) ou génétiques (défini par la classification moléculaire d'après Zhan et al.) sur la survie globale des patients atteints de MM.

G. Traitements

Grâce aux nombreux travaux sur les mécanismes impliqués dans la pathogenèse du MM et à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, les traitements proposés aux patients de MM sont en constante évolution (Kyle et Rajkumar, 2008). Les traitements font appel à différentes modalités en fonction du type de MM, de son stade d'évolution ou encore en fonction de l'âge du patient. Les méthodes utilisées sont principalement la chimiothérapie, la corticothérapie ou encore les greffes de moelle osseuse.

Depuis 1998, le traitement s'est enrichi de deux nouvelles classes de molécules actives permettant un allongement significatif de l'espérance de vie des patients : les imides (thalidomide, lénalidomide, pomalidomide) et les inhibiteurs du protéasome (bortézomib, carfilzomib).

La Thalidomide cible directement les cellules myélomateuses mais montre aussi un effet sur l'environnement médullaire en inhibant les interactions, la sécrétion de facteurs solubles et l'angiogenèse. Le lénalidomide est un analogue structural de la thalidomide avec un profil d'action similaire. Cependant, contrairement à la thalidomide, cette molécule n'est pas tératogène et provoque une moindre toxicité neurologique. Enfin, le bortézomib est un inhibiteur du protéasome, il inhibe la prolifération et induit une forte apoptose des cellules de MM *in vitro* (Hideshima et al., 2001). Son efficacité impressionnante a permis son développement rapide dans le traitement du MM.

En France, les patients de plus 65 ans ont aujourd'hui pour traitement de référence un cocktail associant le Melphalan (agent alkylant), la Prednisone (corticostéroïde) et le Thalidomide. Pour les patients de moins de 65 ans, une phase d'induction à base de Bortezomib et Dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse) ainsi qu'une phase de conditionnement, par l'utilisation de Melphalan à haute dose, précèdent une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CD34+). A la fin du traitement de première ligne, on peut proposer un traitement d'entretien (Thalidomide, Lénalidomide ou Bortezomib) dont l'objectif est de retarder la survenue d'une rechute.

Malgré les avancées médicales, les phénomènes de rechute sont constants. Ainsi, de nouvelles associations d'agents thérapeutiques sont continuellement en essai afin d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients. De nouvelles stratégies doivent à présent être envisagées pour obtenir une guérison des patients atteints de MM. Le développement des nouvelles technologies telles que la cytométrie en flux multiparamétriques et les techniques à haut débit, permettant la classification moléculaire des cellules de MM, pourrait permettre d'envisager des thérapies plus ciblées. En effet, malgré l'hétérogénéité connue et caractérisée du MM, aujourd'hui tous les patients sont traités de façon similaire. Enfin, la caractérisation des cellules initiatrices de cancer devrait permettre l'émergence de traitements ciblant la maladie résiduelle responsable des rechutes (Paiva et al., 2008).

**PROJET I : IMPLICATION DES TOLL-
LIKE RECEPTORS DANS LA BIOLOGIE
DU MYELOME MULTIPLE**

A. Les senseurs du système immunitaire

Le système immunitaire inné est un mécanisme de défense essentiel à la mise en place des processus inflammatoires nécessaires à la lutte contre les infections microbiennes. Le déclenchement de l'immunité innée permet dans un deuxième temps la mise en place d'une réponse immune adaptative plus spécifique médiée par les lymphocytes B et T. Ainsi, certaines cellules immunitaires telles les neutrophiles, monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK participent à la défense de l'organisme via la reconnaissance immédiate des pathogènes. Cette reconnaissance s'effectue grâce à une famille de récepteurs appelée « Pattern Recognition Receptors » ou PRRs. Quatre différentes classes de PRRs ont été identifiées : des récepteurs membranaires tels que les « Toll-like Receptors » (TLRs), et les « C-type lectin receptors » (CLRs) mais aussi des protéines cytoplasmiques telles que les « Retinoic acid-inducible gene (RIG)-1-like receptors » (RLRs) et les NOD-like receptors (NLRs). Bien que l'expression de ces PRRs ait dans un premier temps été décrite sur les cellules du système immunitaire, ils sont aujourd'hui caractérisés sur d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, endothéliales ou encore les fibroblastes. Les PRRs reconnaissent les « Pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) qui sont des motifs moléculaires très conservés chez les microorganismes. Des études récentes ont mis en évidence que les PRRs sont aussi responsables de la reconnaissance de certaines molécules endogènes issues des tissus endommagés. Ces dernières sont alors appelées « Damage-associated molecular patterns » (DAMPs).

Parmi les PRRs, les TLRs sont les mieux caractérisés. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type 1 constitués d'une partie extracellulaire formée de répétitions riches en leucine (LRRs) et, d'une partie cytoplasmique appelée Toll-IL-1R (TIR) pour ses homologies avec la partie cytoplasmique de l'IL-1R (Figure 6). La partie extracellulaire est impliquée dans la reconnaissance microbienne alors que la partie cytoplasmique a un rôle de transduction du signal. Dix TLRs ont été identifiés chez l'homme et chacun d'entre eux est spécifique d'une certaine gamme de PAMPs et de DAMPs.

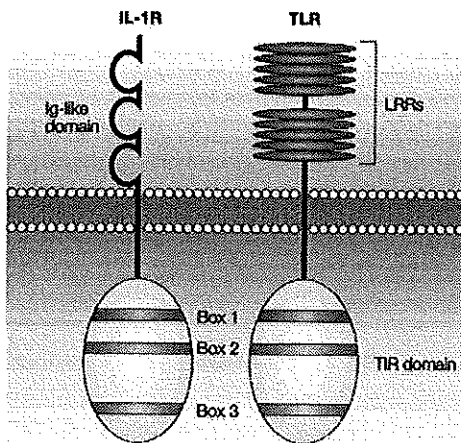


Figure 6 : Structure des TLRs et homologie avec l'IL-1R
D'après Akira et al., 2004

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires composés d'une partie extracellulaire riche en répétition leucine (LRRs) responsable de la reconnaissance des ligands et d'une partie intracellulaire, appelée domaine TIR, responsable de la transduction des signaux et présentant de nombreuses homologies avec l'IL1R.

B. Les TLRs

→ B1. Localisation

Les TLRs peuvent être discriminés en deux catégories en fonction de leur localisation cellulaire. En effet, les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés à la membrane plasmique alors que les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés au niveau des endolysosomes. Cette distribution cellulaire est déterminante dans le type de ligands reconnus par les TLRs. Ainsi, les TLRs exprimés à la surface vont être spécifiques de molécules présentes sur les parois cellulaires microbiennes alors que les TLRs intracellulaires, vont être stimulés par des acides nucléiques uniquement accessibles après endocytose. L'expression intracellulaire de certains TLRs est essentielle pour limiter les interactions avec les acides nucléiques du soi et de fait, éviter les phénomènes auto-immuns.

→ B2. Les PAMPs

Le TLR2 reconnaît différents composants exprimés par les bactéries (lipoprotéines), les virus (hemagglutinin), les mycoplasmes (lipoarabinomannan) ou encore les champignons (zymosan). Le TLR2 a pour propriété de s'associer avec le TLR1 ou le TLR6. Les hétérodimères ainsi formés, TLR1/TLR2 et TLR6/TLR2, vont respectivement être activés par les triacyls et les diacyls des lipoprotéines (Hajjar et al., 2001 ; Takeuchi et al., 2002). Le TLR4 reconnaît principalement les lipopolysaccharides (LPS) (Takeuchi et al., 1999) des bactéries GRAM(-) bien que son implication dans la réponse inflammatoire contre certains virus ait récemment été mis en évidence (Imai et al., 2008). La protéine extracellulaire MD2 est un cofacteur essentiel à l'activation du TLR4 par le LPS (Kobayashi et al., 2006). Le

TLR5 permet la reconnaissance de la flagelline exprimée par les bactéries flagellées (Hayashi et al., 2001). Bien que le TLR10 semble fonctionnel, ses agonistes restent inconnus à ce jour.

Les TLR3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques d'origine bactérienne ou virale. Le TLR3 détecte l'ARN double brin produit durant le cycle de réplication de la plupart des virus (Alexopoulou et al., 2001). Les TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin des virus à ARN, le TLR7 reconnaissant aussi l'ARN de certaines bactéries (Mancuso et al., 2009). Enfin, le TLR9 est activé par les îlots CpG de l'ADN hypométhylé bactérien ou viral. Cependant, des études récentes sur les ligands du TLR9 montrent que la partie structurelle de l'ADN (groupement phosphate + sucre) est plus importante que les motifs CpG dans le processus d'activation (Haas et al., 2008).

→ B3. Les DAMPs

Dans les conditions physiologiques, la discrimination des composants du soi et des composants microbiens par les TLRs est essentielle. Toutefois, dans un contexte auto-immun ou en présence de tissus endommagés (stress ou mort cellulaire, dégradation de la matrice extracellulaire), les TLRs sont activés par des molécules endogènes appelées DAMPs (Beg et al., 2002).

Les acides nucléiques du soi sont rapidement dégradés par les nucléases en condition physiologique. Cependant, dans certaines conditions ils peuvent être stabilisés par des protéines endogènes telles que HMGB1 (High-mobility group box-1) ou encore des auto-anticorps. Ces complexes sont alors reconnus par les TLR7 ou 9 qui vont déclencher une réponse inflammatoire participant au développement de certaines maladies telles que le lupus systémique érythémateux ou encore le psoriasis (Ganguly et al., 2009 ; Guiducci et al., 2010). De plus, les ARN messagers endogènes, résultant par exemple de la nécrose cellulaire, stimulent fortement le TLR3 *in vitro* (Karikó et al., 2004 ; Cavassani et al., 2008).

Les TLR2 et 4 sont aussi responsables de l'induction de réponses inflammatoires après activation par des ligands endogènes. Ainsi, il a été mis en évidence que HMGB1, en plus d'être un co-ligand pour les TLR intracellulaires, est un agoniste du TLR4. Enfin, d'autres composants tels que la fibronectine, le hyaluronane soluble, les héparanes sulfates ou encore les Heat Shock Proteins (HSPs) sont aussi des agonistes de ces TLRs (Apetoh et al., 2007 ; Yanai et al., 2009). Néanmoins, ces données sont à prendre avec précaution car il est difficile d'exclure une contamination des protéines recombinantes utilisées dans ces études, majoritairement produites chez *E. coli*, par le LPS.

	Localisation	PAMPs	Origine des Ligands	DAMPs	Agonistes <i>in vitro</i>
TLR1/2	membrane plasmique	Triacyls des lipoprotéines	Bactéries	ND	Pam3CSK4
TLR2	membrane plasmique	Lipoprotéines, LTA	Bactéries, virus, parasites	oui	LTA, PGN
TLR3	endolysosome	ARN double brin	Virus	oui	Poly(IC)
TLR4	membrane plasmique	LPS	Bactéries, virus	oui	LPS
TLR5	membrane plasmique	Flagelline	Bactéries	ND	Flagelline
TLR6/2	membrane plasmique	Diacyls des lipoprotéines	Bactéries, virus, mycobactéries	ND	Pam2CSK4
TLR7	endolysosome	ARN simple brin	Virus, bactéries	oui	Imidazoquinoline
TLR8	endolysosome	ARN simple brin	Virus	oui	Poly(U)
TLR9	endolysosome	ADN	Virus, bactéries, parasites	oui	Oligodeoxynucleotides
TLR10	membrane plasmique	ND	ND	ND	ND

Tableau I : Localisation et ligands des TLRs humains

*ND : non déterminé, LPS = lipopolysaccharide ; PGN = Peptidoglycane ;
LTA = Acide Lipoteichoic*

C. Les voies de signalisation

La liaison des ligands à leur TLR provoque une dimérisation et un changement conformationnel de celui-ci, induisant le recrutement sélectif de molécules adaptatrices spécifiques. La reconnaissance des PAMPs va induire la transcription de différents gènes en fonction du TLR activé et du type cellulaire qui l'exprime. La capacité des TLRs à induire différentes voies de signalisation peut en partie s'expliquer par l'utilisation de différentes molécules adaptatrices (TIR domain-containing adaptator). Cinq adaptateurs sont décrits : MyD88, TRIF (ou TICAM-1), TIRAP/Mal, TRAM et SARM. MyD88 s'associe à tous les TLRs à l'exception du TLR3 tandis que TRIF permet la transduction des signaux initiés par les TLR3 et 4. TIRAP/Mal est requis pour les voies de signalisation initiées par les TLR2 et 4 via sa capacité à recruter MyD88 et, TRAM permet le recrutement de TRIF par le TLR4. Enfin, SARM semble avoir un rôle d'inhibition des voies induites par MyD88 et TRIF (O'Neill et Bowie, 2007).

Sur la base de l'existence de ces différents adaptateurs, les voies de signalisation des TLRs sont de deux types : la voie MyD88 dépendante et la voie TRIF dépendante.

→ C1. Voies de signalisation dépendantes de MyD88

MyD88 interagit avec la kinase IRAK4 qui à son tour va activer d'autres kinases tels que IRAK1 et IRAK2. Le complexe IRAK ainsi formé va induire l'activation de l'E3 ubiquitine ligase TRAF6. A l'aide d'un complexe enzymatique comprenant les Ubc13 et Uev1A, TRAF6 va catalyser la formation d'une chaîne poly-ubiquitinilée (K63) permettant l'activation d'un complexe composé des protéines TAK1 et TAB1, 2 et 3. S'en suit la

phosphorylation des kinases (IKK)- β et MKK6 qui permettent d'activer les MAPKs ERK, JNK ou encore p38 ainsi que des facteurs de transcription, NF- κ B et AP-1, impliqués dans l'induction de nombreuses cytokines proinflammatoires.

En plus de ces facteurs de transcription, les TLR7 et 9 induisent la production d'IFN de type I (IFN α ou IFN β) via une signalisation MyD88. En effet, MyD88 a la capacité de former un complexe, composé de IRAK-1, TRAF6, TRAF3 et IKK- α , qui va entraîner la phosphorylation et la translocation nucléaire de IRF7. Ce dernier active l'expression des gènes impliqués dans la réponse IFN (Figure 7).

→ C2. Les voies de signalisation dépendante de TRIF

Après stimulation des TLR3 ou 4, TRIF s'associe à TRAF3 et TRAF6 ainsi qu'à RIP1 et RIP3. Via le recrutement de TRAF6, la voie TRIF va induire l'activation des MAPK et de la voie NF- κ B. De plus, TRADD, adaptateur clé de la voie du TNFR, est impliqué dans la voie TRIF dépendante (Ermolaeva et al., 2008). TRADD en s'associant à FADD (Fas-associated death domain-containing protein) et RIP1 participe à l'activation de la voie NF- κ B. Cette activation est notamment médiée par le recrutement des caspases 8 ou 10 par FADD, leur forme clivée ayant la capacité d'induire la voie NF- κ B (Takahashi et al., 2006).

TRAF3 est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'activation des kinases TBK-1 et IKK- ϵ . TRAF3 a un rôle déterminant dans le type de réponse obtenue après stimulation des TLR3 ou 4 étant donné qu'il régule négativement la sécrétion de cytokine proinflammatoire et positivement la sécrétion d'IFN de type 1 (Tseng et al., 2010). TBK-1 et IKK- ϵ vont permettre la phosphorylation et la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 et l'induction d'une réponse IFN (Figure 7).

Ces voies de signalisation sont hautement régulées afin de mettre fin rapidement aux réponses inflammatoires et d'éviter les réponses immunitaires délétères. Ainsi de nombreux régulateurs négatifs des voies de signalisation des TLRs ont été décrits incluant différents variants d'épissage des adaptateurs, des ubiquitines ligases et déubiquitinases, des régulateurs transcriptionnels et des microRNAs. Un grand nombre de ces régulateurs sont induits par les TLRs eux mêmes ce qui permet la mise en place rapide de rétrocontrôles négatifs (Sheedy et al., 2010).

Les voies de signalisation induites par les TLRs vont donc permettre l'activation des facteurs de transcription NF κ B, AP1 et IRF. Ces derniers régulent la transcription de nombreux gènes codant pour des facteurs essentiels à la réponse inflammatoire tels des

cytokines (IL6, IL12p40, TNF α , l'IL10), des chimiokines (IL18, MIP1 α , RANTES) et les membres de la famille de l'IFN (Type I ou IFN γ). Cependant, les gènes induits par les TLRs ne sont pas encore tous décrits et dépendent largement du type cellulaire concerné. Ainsi, la stimulation des TLRs sur les macrophages semble induire l'expression de plusieurs centaines de gènes dont la majorité est impliquée dans la défense antimicrobienne, le métabolisme ou encore la réparation tissulaire.

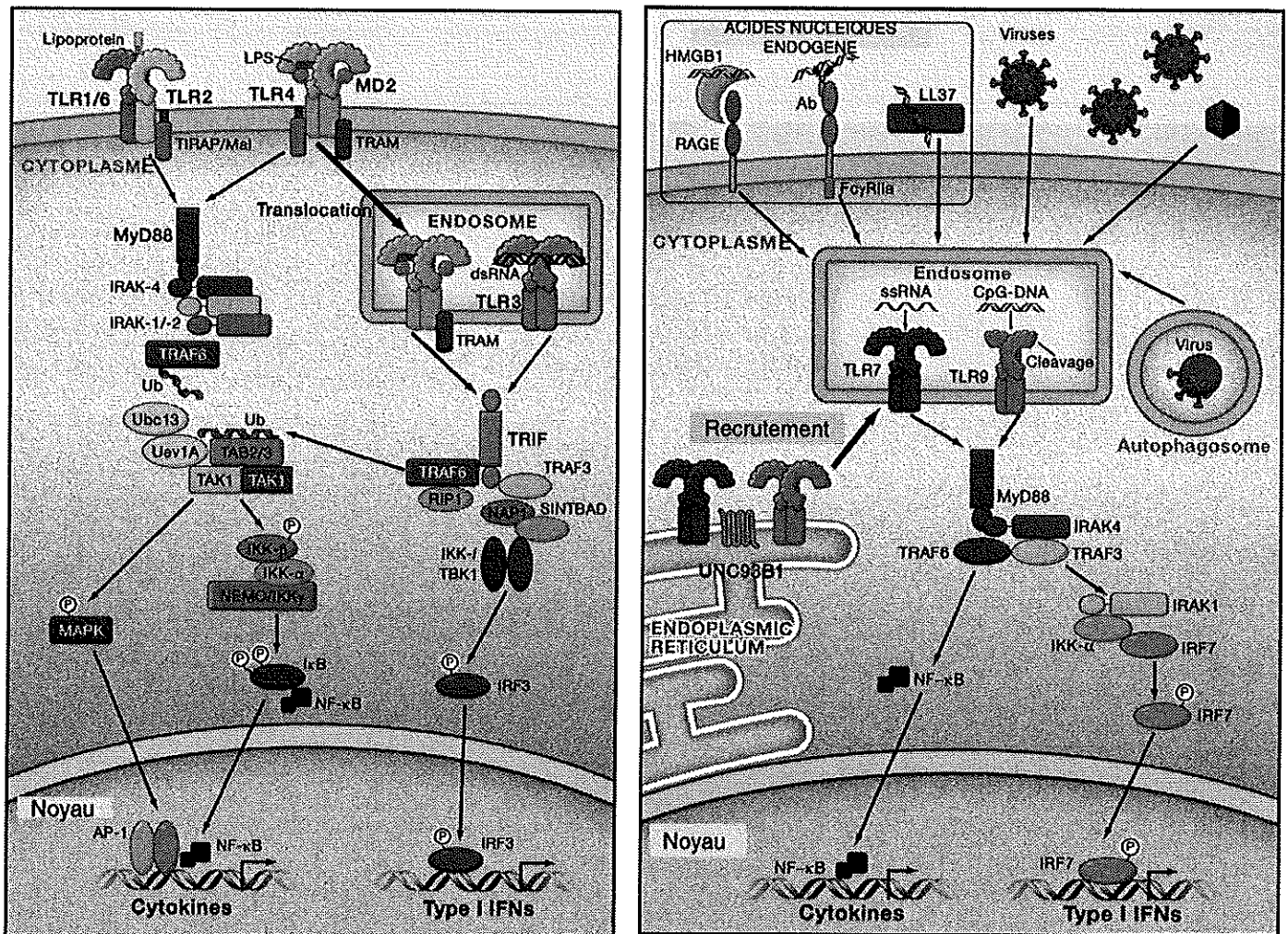


Figure 7 : Voie de signalisation des TLRs
D'après Takeuchi et Akira, 2010

Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par les TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR3 (à gauche) ou encore par les TLR7 et TLR9 (à droite). Ces voies de signalisation vont permettre la translocation nucléaire de plusieurs facteurs de transcription (NF- κ B, IRF) qui vont mener à la synthèse de cytokines proinflammatoires ou encore à la sécrétion d'Interférons (IFNs) de type I.

D. Expression et fonction des TLRs dans le système immunitaire

Les TLRs sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires participant à la mise en place de l'immunité. Ces derniers ont un profil hétérogène et restreint de TLRs ce qui permet une certaine spécialisation. De nombreuses études se sont intéressées à l'expression des TLRs ainsi qu'à la conséquence de leur activation sur les principaux acteurs de l'immunité. Cependant, l'hétérogénéité d'expression des TLRs entre les espèces (de la souris à l'homme par exemple), ou encore les différences d'expression observées entre les cellules différenciées *in vitro* et celles récoltées *in vivo* complexifient la caractérisation de l'expression des TLRs sur les cellules immunes humaines.

Les neutrophiles répondent aux ligands des TLR4, 6 et 7 (Hayashi et al., 2003) et les monocytes/macrophages expriment les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 8. D'autre part, les cellules NK (Natural Killer) peuvent être stimulées par les ligands du TLR3. Les TLRs sont aussi présents sur les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Leur activation induit la production de cytokines immuno-stimulatrices (IFN γ , IL6, IL8) ainsi que l'expression de molécules d'adhérence impliquées dans le recrutement, l'activation et la migration des cellules immunes au site de l'infection.

Les TLRs jouent un rôle prépondérant dans l'activation des cellules de l'immunité innée et constituent aussi une interface essentielle entre l'immunité innée et adaptative (Iwasaki et Medzhitov, 2004). En effet, les TLRs sont impliqués dans l'activation et la différenciation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui permettent l'activation des lymphocytes T et B. Les principales CPA de l'organisme sont les cellules dendritiques (CD). Ces dernières endocytent l'Ag, s'activent et migrent vers les tissus lymphoïdes où elles présentent les peptides antigéniques via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Ce processus implique des mécanismes de phagocytose, l'induction de molécules de costimulation (CD80 et 86) et de CMH ainsi que la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Tous ces processus sont induits par la reconnaissance des pathogènes via les PRRs exprimés par les CD ainsi que par le microenvironnement où elles résident. Plusieurs sous groupes de CD ont été décrits (Figure 8). Ceux-ci présentent des répertoires de TLRs différents qui influent sur leurs propriétés et leurs implications dans le système immunitaire. Ainsi les TLRs 7 et 9 sont fortement exprimés par les CD plasmacytoïdes mais pas sur les CD myéloïdes qui expriment préférentiellement les TLR2, 3, 4, 5 et 8. D'autres sous types tels que les CD de la lamina propria ou encore les CD CD141+ expriment fortement les TLR5 et 3 respectivement (Jongbloed et al., 2010). Grâce à cette expression hétérogène, ils vont être des acteurs

importants à tous les stades du processus immunitaire. Par exemple, le répertoire TLR des CD plasmacytoïdes va leur permettre, malgré leur rareté, d'être la source majeure d'IFN α lors d'une infection virale. De plus, en fonction des TLRs activés les CD vont sécréter différentes cytokines (IL12p70, IL10, TNF α , IL6, IL23,...) et présenter l'Ag par divers mécanismes. Cette hétérogénéité permet l'induction de différentes réponses T telles que la réponse CD4+ (Th1, Th2, Th17 ou Treg) ou CD8+ (lymphocytes T cytotoxique/CTL). (Manicassamy et Pulendran, 2009).

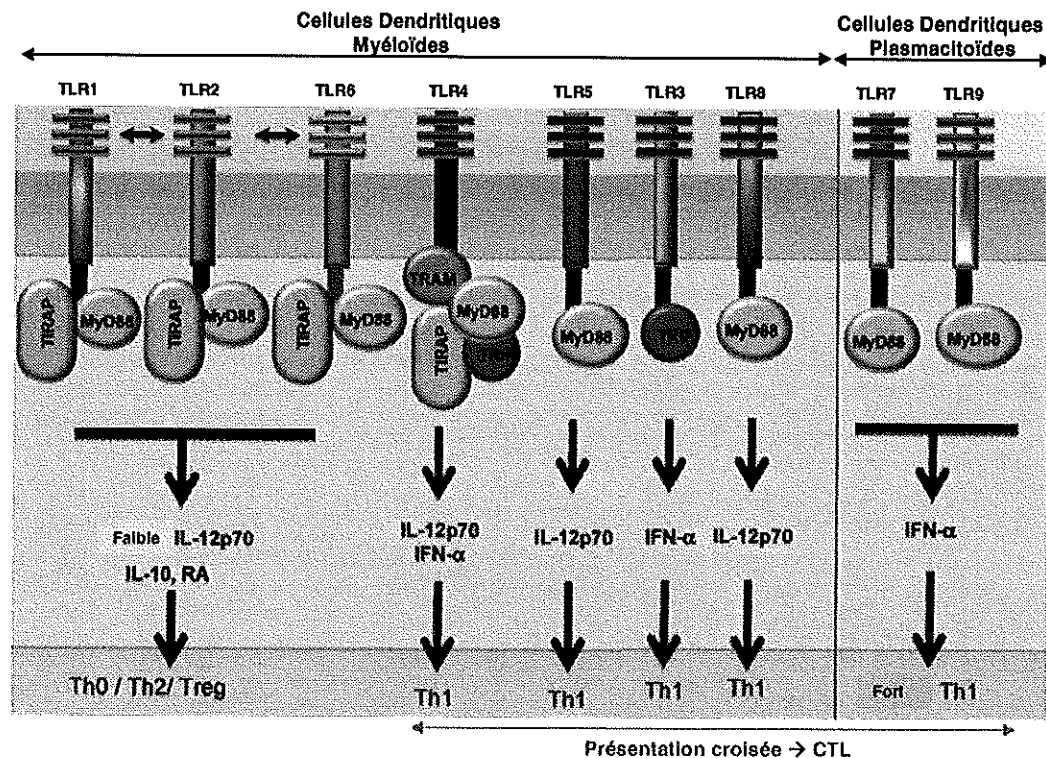


Figure 8 : Hétérogénéité d'expression des TLRs et contrôle de l'immunité adaptative
D'après Manicassamy et Pulendran, 2009

Les différents sous-types de cellules dendritiques expriment des répertoires spécifiques de TLRs. Cette expression hétérogène influence leurs propriétés et leur implication dans le système immunitaire, notamment sur la nature des cytokines sécrétées (IL12p70, IL-10, IFN- α) et le type de réponse T induite (Th0, Th2, Treg, Th1 ou encore CTL).

Treg : Lymphocyte T régulateur, CTL : Lymphocyte T cytotoxique

Les TLRs ont aussi un rôle direct sur les lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T et B expriment et répondent à plusieurs TLRs. Par exemple, l'activation des lymphocytes T humains naïfs et mémoires par les agonistes des TLR2, 3, 5 et 8 potentialisent leur prolifération et leur production d'IFN γ (Caron et al., 2005). De plus, l'activation du TLR8 sur les lymphocytes T régulateurs reverse leurs fonctions suppressives (Wang et al., 2008).

De nombreuses études concernant l'implication des TLRs dans la réponse B ont été effectuées chez la souris. Cependant, le répertoire TLR exprimé par les LB humains et murins est fondamentalement différent. En effet, les LB murins expriment des niveaux plus importants de TLRs et sont plus sensibles à la stimulation de ces récepteurs que leurs homologues humains. En outre, les LB humains sont caractérisés par un défaut d'expression du TLR4, et de fait une insensibilité au LPS, contrairement au modèle murin où tous les sous-types de LB expriment fortement le TLR4. Pour ces raisons, seules les connaissances sur le rôle des TLRs dans LB humains seront abordées dans le paragraphe suivant.

E. Implication des TLRs dans le développement des LB humains

Les LB humains sont caractérisés par l'expression des TLR1, 6, 7, 9 et 10. Une faible expression des TLR2 et 5 a aussi été décrite (Hornung et al., 2002). Les LB naïfs et mémoire expriment différents niveaux de TLRs. En effet, les TLR6, 7, 9 et 10 sont peu exprimés par les LB naïfs circulants, qui répondent donc faiblement à leurs ligands respectifs, tandis que les LB mémoire montrent une plus grande sensibilité (Bernasconi et al., 2003). La localisation des LB influence aussi leur profil d'expression, par exemple les LB présents dans les amygdales expriment plus de TLRs que les LB du sang périphérique. De nombreuses modulations d'expression des TLRs ont été mises en évidence. Ainsi, l'activation par le BCR (B-cell receptor), le CD40L, ou encore les oligodéoxynucléotides CpG (ODN CpG, ligands synthétiques du TLR9) augmente l'expression des TLR7, 9 et 10 sur les LB au repos (Bernasconi et al., 2003 ; Bourke et al., 2003). De plus, l'IFN de type 1 induit l'expression du TLR7 et de MyD88 sur les LB naïfs du sang périphérique (Bekeredjian-Ding et al., 2005). Cette expression est aussi variable en fonction des différentes sous-populations étudiées ; l'expression de TLR2, 3 et 5 fonctionnels semble être restreinte à certains sous-types (Månsson et al., 2006 ; Ganley-Leal et al., 2006).

Les PAMPs ont un rôle d'activateur polyclonal et l'engagement des TLRs sur les LB participe à de multiples mécanismes telles que la prolifération, l'expression de molécules de

costimulation (CD54, CD80, CD86, CMH), la sécrétion de cytokines (IL1 β , IL2, IL10, IL6, TNF α , IL8), la commutation isotypique, la différenciation ou encore le maintien des LB mémoire dans l'organisme (Figure 9) (Bekeredjian-Ding et Jego, 2009 ; Annexe-1). Les conséquences de l'activation des TLRs varient en fonction de la nature du LB impliqué. En effet, contrairement aux LB mémoire, l'activation des LB naïfs est plus difficile et leur stimulation par les seuls TLRs est rarement suffisante. Leur activation nécessite 3 différents signaux (Ruprecht et Lanzavecchia, 2006) : l'activation du BCR, une costimulation par les lymphocytes T (principalement via l'interaction CD40/CD40L) et enfin par un engagement des TLRs. Cependant, différents modèles d'activation de LB ont été décrits dont certains indépendants des lymphocytes T. Par ailleurs, des études ont également montrées une activation directe de certaines sous populations de LB naïfs par les TLRs, principalement par l'utilisation de CpG (Bekeredjian-Ding et Jego, 2009).

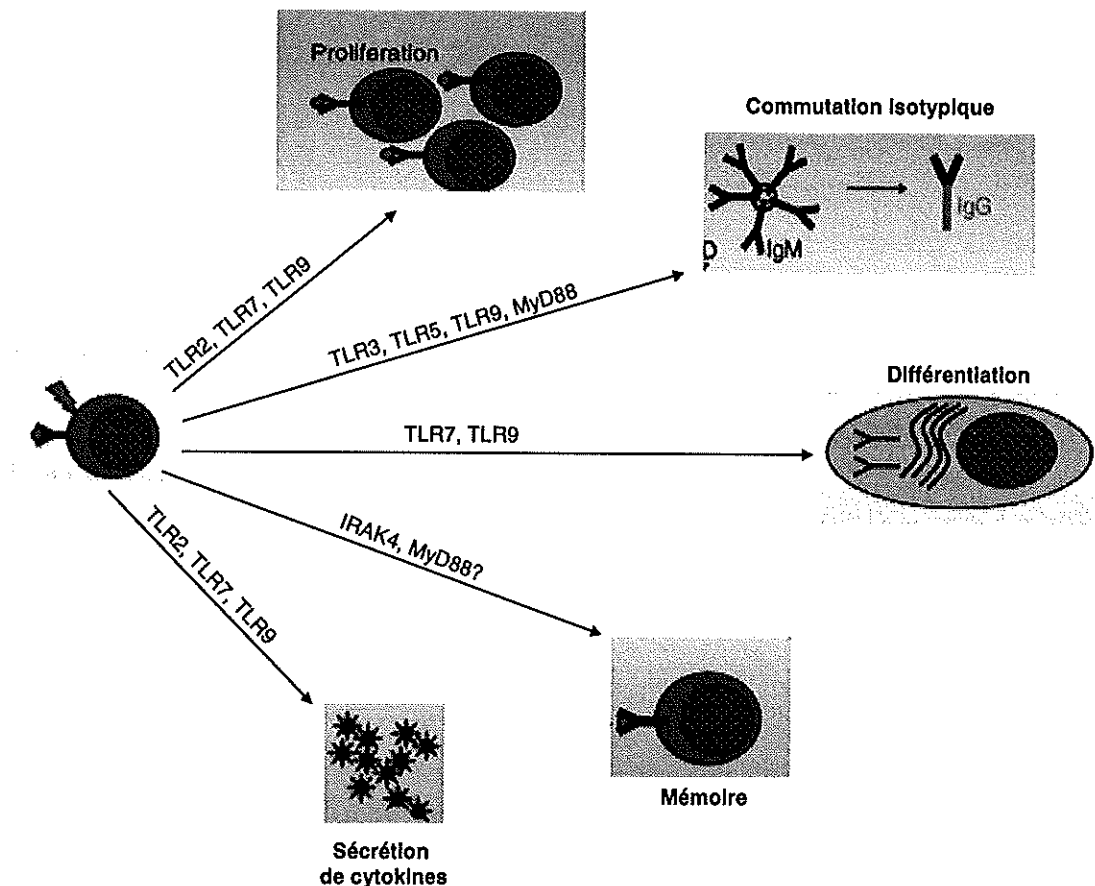


Figure 9 : Implication des TLR dans les lymphocytes B humains
D'après Bekeredjian-Ding et Jego Immunology 2009

Représentation des mécanismes majeurs induits par les TLRs dans les LB humains. (?) indique que la fonction n'a pas été directement démontrée dans les LB humains mais dans d'autres systèmes cellulaires.

Les TLRs impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques tel que les TLR7 et 9 permettent une stimulation plus importante des LB que les TLRs impliqués dans la reconnaissance des molécules exprimées à la surface des pathogènes tel que le TLR2. Ainsi, l'activation des LB par les ligands du TLR2 nécessite une co-stimulation par activation du BCR ou encore par la présence de facteurs de virulence (SpA). Cette réponse limitée permet d'éviter toute réponse immunitaire délétère envers les bactéries commensales. Ces résultats montrent un rôle essentiel des TLRs dans la mise en place d'une réponse humorale efficace. Cependant, l'engagement des TLRs ont différentes conséquences en fonction des sous populations ciblées, du stade de différenciation ou encore de l'environnement.

L'étude des mécanismes qui mènent à une immunité humorale robuste et durable est importante dans le développement des nouvelles stratégies de vaccination. L'efficacité de certains vaccins tels que le vaccin contre la fièvre jaune est ainsi probablement due à sa capacité d'activer plusieurs TLRs sur les CD (Querec et al., 2006). En plus du rôle établi des ligands des TLRs dans l'activation des CD, l'activation potentielle des LB et l'amplification de la réponse T par ces mêmes ligands en font des candidats intéressants en tant qu'adjuvants dans les stratégies d'induction de l'immunité par les vaccins.

F. Implication des TLR dans les hémopathies B

La majorité des néoplasies lymphoïdes dérivent de LB à différents stades de différenciation. Certains sont la conséquence d'une transformation maligne des précurseurs B et incluent les leucémies lymphoblastiques aiguës (pre-B-ALL). Celles dérivées des LB matures naïfs englobent les leucémies lymphoïdes chroniques (B-CLL), les lymphomes lymphocytaires à petites cellules (SLL) ou encore les lymphomes du manteau (MCL). Les lymphomes folliculaires (FL) et les lymphomes B diffus à grandes cellules (LCL) dérivent des LB des centres germinatifs. Enfin, les LB mémoire peuvent se transformer en lymphomes de la zone marginale (MZL) ou en sous-type de B-CLL.

Les hémopathies B retiennent certains marqueurs spécifiques de leurs précurseurs normaux tels que le CD19, le CD20, le CD5 ou encore le CD10. Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence que l'expression de TLRs fonctionnels est aussi conservée dans la majorité des hémopathies B. Ainsi, les cellules des pre-B-ALL expriment de façon hétérogène les TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9. Cependant, il reste à déterminer si l'expression aberrante des TLR3, 4 et 5 est une conséquence de la différenciation maligne de la maladie ou encore, un héritage du précurseur normal de la pathologie (Corthals et al., 2006). Les B-CLL expriment

les TLR1, 2, 6, 7, 9 et 10 et malgré les variations observées entre les patients et les lignées cellulaires, une expression faible du TLR7 et forte du TLR9 est détectée dans la majorité des cas (Liang et al., 2010 ; Annexe-1). Bien que peu d'études aient évalué l'expression des TLRs sur les autres hémopathies, la présence d'un TLR9 fonctionnel est décrite pour les SLL, MCL, FL, LCL et MZL (Figure 10) (Jahrsdorfer et al., 2005).

→ F1. Réponses hétérogènes des LB tumoraux

L'activation du TLR9 induit une augmentation de la prolifération dans le MCL, le SLL, le FL, le LCL et le MZL. La plus forte prolifération est observée dans le MZL, ceci est peut être la conséquence de l'origine de cette maladie qui a pour précurseur un LB mémoire. En effet, les LB mémoires sont plus sensibles aux ligands du TLR9 que les LB naïfs (Jahrsdorfer et al., 2005). Plusieurs équipes se sont intéressées aux conséquences de l'activation des TLRs sur les B-CLL et montrent des réponses hétérogènes. En effet, les échantillons de patients caractérisés par l'absence de mutations somatiques, associée à un mauvais pronostic, répondent par une augmentation de la prolifération après stimulation par le CpG. Au contraire, les patients plus stables et caractérisés par la présence de ces mutations somatiques, les LB tumoraux sont induits en apoptose, notamment via l'induction de la sécrétion d'IL10 et la phosphorylation de STAT1 (Jahrsdorfer et al., 2005 ; Liang et al., 2010). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence que le CpG réduit la fréquence de cellules clonogéniques de MCL *in vitro* en induisant leur différenciation, ce qui limiterait leur potentiel de formation de tumeur *in vivo* et les sensibiliserait au Bortezomib (Brennan et al., 2010).

La stimulation des LB malins par les ligands des TLRs induit des changements fonctionnels et phénotypiques pouvant augmenter leur sensibilité à certaines substances pharmaceutiques. Par exemple, le CD20 est induit faiblement dans les MCL, LCL et FL et fortement dans les SLL, MZL et B-CLL après activation du TLR9 (Jahrsdorfer et al., 2005). La combinaison du Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) avec le CpG a de fait été envisagée. De plus, la combinaison de ligands du TLR7 avec différents agents chimiothérapeutiques est en cours d'évaluation dans plusieurs essais cliniques (Spaner et al., 2010).

L'activation des TLRs a donc des conséquences hétérogènes selon les hémopathies mais aussi selon les patients d'une même maladie. D'une part, comme leurs homologues normaux, certains LB tumoraux prolifèrent après stimulation par les TLRs. Dans ce contexte, l'activation des TLRs dans l'émergence leucémique a été envisagée. En effet, l'activation

polyclonale répétée des LB tumoraux lors d'infections ou d'inflammations chroniques pourrait favoriser leur développement. Par exemple, les infections microbiennes, telles que *Helicobacter pylori* ou le virus hépatite C, sont connues pour avoir un rôle dans le MZL (Ferrerri et Zucca, 2007). De plus, des polymorphismes du TLR2 sont des facteurs de risque pour différents lymphomes et des variations dans les régions codant pour les TLR10-TLR1-TLR6 sont associées avec un risque de lymphome non hodgkinien (Purdue et al., 2009).

D'un autre côté, étant donné les effets anti-tumoraux observés dans certains cas, les ligands des TLRs sont envisagés comme outils potentiels dans les stratégies d'immunothérapie.

→ F2. Immunothérapie

Pendant longtemps des extraits de bactéries tel que le Bacille Calmette-Guérin (BCG) ou encore les toxines de Coley (mélange de bactérie GRAM(-) et GRAM(+)) ont été utilisés comme adjuvants dans les thérapies antitumorales (Starnes, 1992 ; Kleef et al., 2001). Récemment, les ligands de TLRs ont été identifiés comme étant les éléments actifs de ces thérapies en permettant de « casser » la tolérance immune envers la tumeur. Par exemple, le BCG qui active les TLR2 et 4, a été utilisé pendant 30 ans dans le traitement de tumeurs localisées de la vessie et l'imiquimod, ligand du TLR7, est prescrit dans le traitement local de certains cancers de la peau (Okamoto et al., 2004 ; Tsuji et al., 2000). Aujourd'hui, de nombreux composants synthétiques activateurs des TLRs, surtout du TLR9, sont développés par les firmes pharmaceutiques et sont évalués dans plusieurs essais cliniques de cancer solides (colon, sein, mélanome, poumons, glioblastoma) et de cancers hématologiques (Krieg, 2008 ; Hennesy et al., 2010).

Bien que l'activité antitumorale des TLRs soit due à plusieurs mécanismes, un des mieux caractérisé est leur capacité de stimulation des effecteurs de l'immunité adaptative tels que les CD et les LB (voir p.43). De plus, l'activation des TLRs a une propriété immunomodulatrice directe sur les LB tumoraux. Ces derniers sont généralement caractérisés par une faible capacité de présentation antigénique et par une incapacité à stimuler la réponse T, notamment via la faible expression de molécules de costimulation (Dazzi et al., 1995). Les ligands des TLR7 et 9 peuvent induire certaines de ces molécules telles que les CD40, CD54, CD80, CD86 et les CMH de classe I et II dans plusieurs hémopathies (Jahrsdorfer et al., 2005 ; Spaner et al., 2006 ; Decker et al., 2000). Cependant, malgré plusieurs résultats prometteurs obtenus *in vitro* et dans certaines études de phase I (Brody et al., 2010), la

majorité des essais cliniques montrent des résultats décevants (Link et al., 2006 ; Spaner et al., 2010).

Ceci pourrait en partie s'expliquer par l'induction de cytokines telles que l'IL10, connue pour avoir des fonctions immunosuppressives en absence d'IL12p70, par les cellules tumorales après activation des voies des TLRs (Reid et al., 2005). Il semble donc nécessaire de combiner ces approches visant à augmenter les capacités immuno-stimulatrices des LB tumoraux avec des outils thérapeutiques neutralisant les effets protumoraux induits.

D'autre part, beaucoup de patients atteints d'une hémopathie B sont immunodéprimés du fait de la maladie ou encore des traitements chimiothérapeutiques. De plus, le nombre de lymphocytes T régulateurs et de CD sécrétant des hauts niveaux de cytokines immunosuppressives augmente chez les patients atteints d'hémopathies B (Yang et al., 2006). La stratégie d'utilisation des ligands de TLRs étant de sensibiliser la tumeur aux effecteurs de l'immunité, les caractéristiques d'immunodépression observées chez les patients ne sont pas favorables à une réponse optimale. Enfin, l'environnement tumoral caractérisé par un milieu hypoxique ou encore des processus glycolytiques semble être défavorable à une stimulation par les ligands de TLRs (Spaner et al., 2008). Etant donné le nombre de régulateur négatif des voies de signalisation des TLRs dans le microenvironnement tumoral, il n'est pas surprenant que l'efficacité clinique des agonistes de TLRs soit modeste.

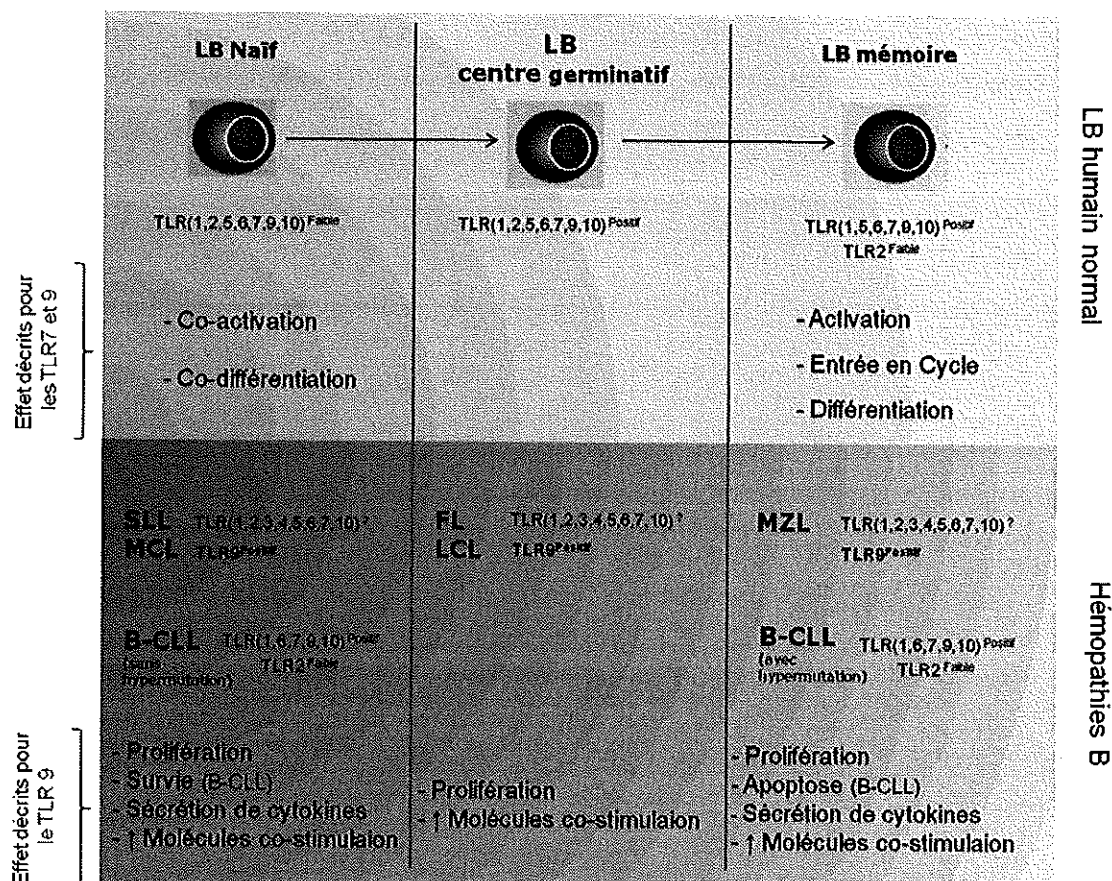


Figure 10 : Expression et fonction des TLRs dans la différenciation B et dans les hémopathies B

D'après Chiron et al., 2008 (voir Annexe 1)

SLL : lymphome lymphocytaire à petites cellules, MCL : lymphome à cellules du manteau, B-CLL : leucémie lymphoïdes chroniques de type B, FL : lymphome folliculaire, LCL : lymphome B diffus à grandes cellules, MZL : lymphomes de la zone marginale.

A cause de l'hétérogénéité des réponses et des effets protumoraux observés *in vitro*, l'utilisation thérapeutique des ligands de TLRs dans les hémopathies B doit être faite avec prudence sur des patients sélectionnés. Les futurs essais cliniques devraient prendre en compte cette hétérogénéité et l'évaluation de marqueurs prédictifs de la réponse ainsi que la neutralisation des effets protumoraux induits semblent indispensables (Conforti et al., 2010).

G. Implication potentielle des TLRs dans la biologie du MM

En plus des caractéristiques cliniques classiques décrites dans le MM (voir p.11), les patients sont très susceptibles aux infections bactériennes, fongiques ou virales. En effet, l'expansion clonale des plasmocytes malins est associée à une baisse dramatique du nombre de plasmocytes normaux et donc à un défaut de production d'Ig normales. De plus, les

traitements chimiothérapeutiques ainsi que les greffes utilisés dans le traitement du MM amplifient l'immunodéficience. Ces défauts immunitaires rendent les patients atteints de cette pathologie particulièrement vulnérables face aux infections (Gang et al., 2010).

Des études épidémiologiques récentes mettent en évidence une association entre plusieurs maladies auto-immunes, infectieuses et inflammatoires et un risque plus élevé de développer un MGUS ou un MM (Brown et al., 2008). Plus particulièrement, un nombre élevé de pneumonies a été mis en évidence dans les 5 années qui précèdent le développement d'un MM (Landgren et al., 2006). Bien qu'on ne puisse exclure le fait que ces patients aient déjà développé un MGUS ou un MM non détecté au moment du diagnostic de ces maladies inflammatoires, les auteurs de ces études mettent en évidence leurs rôles potentiels dans l'initiation ou encore la progression du MM.

Les pathogènes associés aux MM incluent des bactéries GRAM(+) (*Streptococcus pneumoniae*, staphylococcal infections), des bactéries GRAM(-) (*Pseudomonas*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*), certains virus (hépatite C, Zona) ou encore des infections fongiques invasives (*Aspergillus*). (Nucci et Anaissie, 2009 ; Kalambokis et al., 2009).

Parmi les composantes de la niche médullaire (voir p.23), la fibronectine, les hyaluronanes solubles, les HSPs ou encore les ARN endogènes, principalement accessibles en cas de dommages tissulaires, de dégradation de la matrice extracellulaire ou encore de mort cellulaire, sont des ligands endogènes (DAMPs) pour les TLRs (voir p.37). Ainsi, HMGB1, agoniste du TLR4 et co-activateur des TLR3, 7 et 9, est relâché par les cellules osseuses telles que les ostéoblastes ou les ostéoclastes (Apetoh et al., 2007 ; Yanai et al., 2009). Enfin, plusieurs études suggèrent que les héparanes sulfates solubles activent le TLR4 (Johnson et al., 2002). Les cellules de MM sont caractérisées par une forte expression du CD138 qui appartient à la famille des héparanes sulfate. Le CD138 soluble, dont le niveau corrèle à un mauvais pronostic (Lovell et al., 2005), pourrait donc activer le TLR4 de façon autocrine.

Etant donné le contexte infectieux caractéristique du MM, la présence éventuelle de ligands endogènes dans le microenvironnement mais aussi l'utilisation potentielle de ligands synthétiques des TLRs dans les hémopathies, nous avons étudié l'expression et le rôle des TLRs dans la biologie du MM.

H. Expression des TLRs dans le MM

Les cellules primaires et les lignées de MM expriment un vaste répertoire de TLRs (Bohnhorst et al., 2006 ; Jeco et al., 2006). Bien que l'expression des TLRs par les lymphocytes B humains soit à présent bien définie (voir p.43), leur expression sur les plasmocytes n'est pas clairement décrite. En effet, deux études montrent une expression relativement rare des TLRs sur les plasmocytes normaux issus de la moelle osseuse (Bohnhorst et al., 2006 ; Xu et al., 2010) tandis qu'une troisième met en évidence une forte expression de tous les TLRs sur les plasmocytes des amygdales et du sang périphérique (Dorner et al., 2009). Afin de confirmer ou infirmer ces résultats contradictoires, la réévaluation de l'expression des TLRs sur les plasmocytes normaux par des approches protéiques telles que la cytométrie en flux semble nécessaire. Cette étude permettrait de déterminer si l'expression des TLRs par les cellules de MM est un héritage de leurs équivalents normaux ou une caractéristique inhérente à la pathologie. Cette approche a très récemment été effectuée pour les TLR2, 4 et 9 et a démontré une expression protéique supérieurs des TLR4 et 9 sur les plasmocytes des patients de MM en comparaison avec les patients sains (Xu et al., 2010). Enfin, l'évaluation des TLRs sur les plasmocytes présents lors d'un contexte infectieux comme lors une plasmocytose réactionnelle ou encore sur les plasmocytes présents au stade MGUS pourrait mettre en évidence l'origine de l'expression des TLRs dans le MM.

Sur un panel de 25 lignées, nous avons mis en évidence, par RT-PCR, une expression fréquente des TLR1, 7 et 9 (96%, 68% and 64%, respectivement). Les TLR3 et 4 sont exprimés par la moitié des lignées étudiées alors que les TLR2 et 8 sont détectés dans 28% et 24% des lignées respectivement.

Des analyses par RT-PCR, sur un petit nombre d'échantillons, ont aussi mis en évidence l'expression de TLRs sur les cellules myélomateuses des patients (CD138+) (Jeco et al., 2006 ; Xu et al., 2010). Afin de déterminer de façon plus représentative les profils d'expression des TLRs dans le MM, nous avons utilisé une base de données publiques comprenant le profil d'expression génique de 414 patients au diagnostic :

Le TLR1 est exprimé par la quasi totalité des patients alors que le TLR2 est absent ou très faiblement exprimé. Le TLR8 est exprimé dans 50% des cas mais avec un niveau d'expression faible comparé à un témoin positif tel que l'expression monocyttaire (valeur médiane 20 fois inférieur).

TLR3					TLR4			
	Pos % (n)	p	Médiane (rang)	p	Pos % (n)	p	Médiane (rang)	p
PR (47)	15 (7)	NS	223 (137-1654)	NS	17 (8)	NS	203 (77-742)	NS
LB (58)	12 (7)	0.014	273 (137-556)	NS	12 (7)	0.002	98 (53-339)	0.007
MS (68)	32 (22)	NS	259 (76-751)	NS	42 (29)	0.024	161 (61-837)	NS
HY (116)	38 (44)	<0.001	311 (84-1566)	NS	16 (19)	<0.001	103 (53-888)	<0.001
CD (88)	19 (17)	NS	233 (107-904)	NS	31 (27)	NS	172 (44-419)	NS
MF (37)	30 (11)	NS	465 (168-834)	NS	97 (36)	<0.001	1447 (195-9266)	<0.001
All (414)	26 (108)		296 (76-1654)		30 (126)		201 (44-9266)	

TLR7					TLR9			
	Pos % (n)	p	Médiane (rang)	p	Pos % (n)	p	Médiane (rang)	p
PR (47)	47 (22)	NS	923 (212-4590)	0.018	79 (37)	NS	706 (241-2454)	NS
LB (58)	14 (8)	<0.001	433 (102-1493)	NS	74 (43)	NS	724 (302-1902)	NS
MS (68)	15 (10)	<0.001	194 (121-1320)	0.009	87 (59)	NS	1228 (360-5422)	0.003
HY (116)	46 (54)	<0.001	613 (68-6167)	0.042	77 (90)	NS	587 (228-2071)	<0.001
CD (88)	39 (35)	NS	375 (99-7584)	NS	86 (76)	NS	797 (319-5050)	NS
MF (37)	32 (12)	NS	232 (92-2436)	0.036	65 (24)	0.031	665 (299-1632)	NS
All (414)	34 (141)		450 (68-7584)		79 (329)		744 (228-5422)	

Tableau II : Expression hétérogène des TLR3, 4, 7 et 9 par les cellules primaires de patients.
D'après Chiron et al., 2010 (Annexe 2)

Expression des TLR3, 4, 7 et 9 sur les cellules myélomateuses de patients en fonction de la classification moléculaire défini par Zhan et al (voir p.14). p = valeurs significatives déterminées par le test du CHI2 pour les % d'expression et par le test de Wilcoxon pour le niveau d'expression (médiane). Les surexpressions et sousexpressions significatives sont représentées en gras et italique respectivement. NS = non significatif

Les TLR3, 4 et 7 sont exprimés dans environ 30% des cas analysés et le TLR9 dans 79%. L'expression des TLR est hétérogène si on l'adresse en fonction de la classification moléculaire du MM définie par Zhan et al. (voir p.14). Les patients hyperdiploïdes (HY) (pronostic le plus favorable) expriment plus fréquemment les TLR3 et 7 et sous-expriment les TLR4 et 9 (Tableau II). Au contraire, les patients de type MS (MMSET) (pronostic le moins favorable) sous-expriment le TLR7 mais surexpriment le TLR9. Cependant, la plus forte association est mise en évidence chez les patients de type MAF (MF) caractérisés par une très forte surexpression du TLR4 par rapport aux autres groupes (Figure 11). De façon intéressante, l'expression de MAF et du TLR4 est directement corrélée chez ces patients laissant suggérer un lien direct entre ces 2 protéines (Spearman test $p < 0,05$). Cette forte association est conservée dans les lignées. En effet, toutes celles qui présentent une dérégulation de C-MAF ou MAFB expriment le TLR4 (n=7) alors que seul 33% des lignées sans ces dérégulations l'expriment (n=18). MAF est un facteur de transcription mais aucun lien entre MAF et le TLR4 n'a été rapporté. Il paraît cependant intéressant d'étudier cette

relation afin de comprendre l'implication du TLR4 dans la pathogenèse de ce groupe de patients.

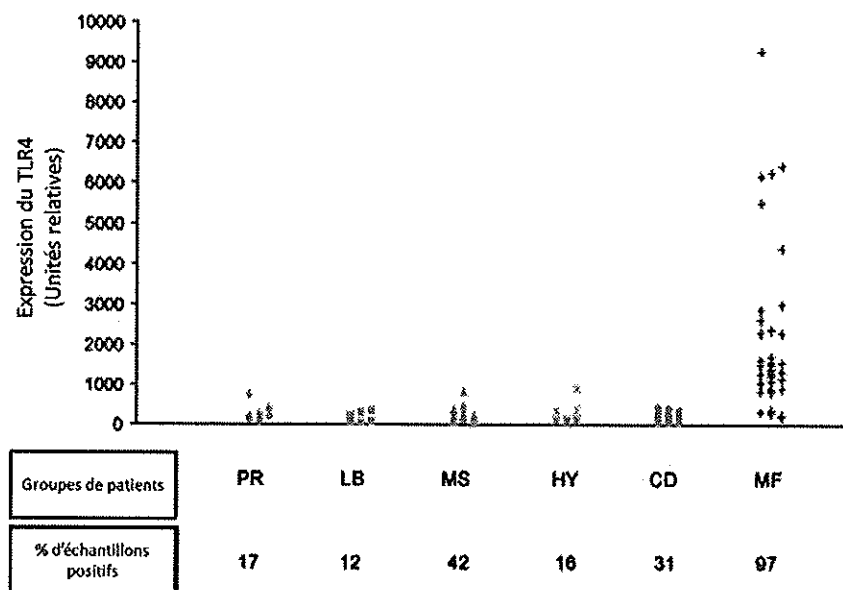


Figure 11 : Expression du TLR4 sur les cellules primaires de MM

D'après Chiron et al., 2010 (Annexe 2)

Hétérogénéité de l'expression du TLR4 sur les cellules primaires de MM selon les groupes définis par la classification moléculaire (Zhan et al, 2006). PR: "Prolifération", LB: "Low Bone Disease", MS: "MMSET", HY: "Hyperdiploïdy", CD: "CyclinD", MF: "MAF".

Les protéines nécessaires aux voies de signalisation des TLRs sont exprimées dans la majorité des lignées de MM étudiées. Ainsi, MyD88, TRIF et TRAF6 sont exprimés dans toutes les lignées évaluées (n=8) (Chen et al., 2006 ; Liu et al., 2007). L'expression de TRAF3 est plus hétérogène et des travaux récents ont mis en évidence que cette protéine est fréquemment mutée ou délétée dans les lignées et les cellules primaires de MM (17% et 12,3% respectivement). Bien que son rôle de suppresseur de tumeur soit bien défini (Annunziata et al., 2007 ; Keats et al., 2007), son implication dans les voies de signalisation des TLRs doit encore être précisée dans le MM.

Les cellules de MM expriment donc une large gamme de TLRs et les voies de signalisation associée semblent être fonctionnelles. Elles semblent donc équipées pour répondre aux PAMPs et DAMPs potentiellement présents dans le microenvironnement tumoral.

I. Réponses TLRs hétérogènes des cellules de MM

→ I1. TLR9 et immunomodulation

Comme les autres hémopathies B décrites auparavant (voir p.45), de nombreux défauts du système immunitaire ont été décrits dans le MM. On retrouve des dysfonctionnements aux niveaux de nombreuses cellules immunitaires telles les lymphocytes T, les lymphocytes T régulateurs, les cellules NK, les LB ou encore les CD (Pratt et al., 2007). Un rapport récent met en évidence que les CD plasmacytoïdes présentes dans la moelle osseuse des patients de MM sont au repos et ont une capacité réduite d'induction de prolifération des lymphocytes T. D'autre part, ces cellules induisent la prolifération, la survie et la résistance aux drogues des cellules myélomateuses, principalement via l'activation de la voie NF-kB (Chauhan et al., 2009). De façon intéressante, l'activation de ces CD plasmacytoïdes par le CpG a pour conséquence de restaurer leur habilité à sécréter de l'IFN α et à induire la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, cette activation réduit leur capacité d'induction de prolifération des cellules de MM.

Une autre étude montre que le CpG induit l'expression de molécules impliquées dans le recrutement des leucocytes, tel que le CD54, et augmente l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 ainsi que celles nécessaires à la présentation antigéniques (CMH-II) sur une lignée TLR9 positive (Assaf et al., 2009). Ces régulations ont pour conséquences d'augmenter la capacité de cette lignée à induire la prolifération de lymphocytes T allogéniques. Ces résultats suggèrent que la stimulation des cellules de MM par le CpG peut les rendre plus sensibles aux effecteurs du système immunitaires. Donc l'utilisation des ligands du TLR9 pourrait être théoriquement efficace dans le but d'augmenter la réponse immunitaire dans le microenvironnement tumoral du MM.

→ I2. Implication des TLRs dans la progression du MM

Comme décrit auparavant pour les lymphomes et leucémies B, l'activation des TLRs va induire des effets protumoraux dans le MM. En effet, l'hétérogénéité des réponses aux TLRs est retrouvée dans le MM et, malgré les effets d'immunomodulation, les TLRs semblent être impliqués dans la progression de cette pathologie via l'induction de mécanismes participant à l'évasion immune ou encore via la sécrétion de cytokine et l'activation de voie de survie.

I2.1 Evasion immune

Les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques peuvent être inhibés par certaines molécules de surface exprimées sur les cellules tumorales. Parmi ces molécules, B7H1, ligand de PD-1, est principalement induit par l'IFN γ dans les cellules normales et peut mener à l'inactivation des lymphocytes T (Dong et al., 2002). B7H1 est surexprimé sur les cellules de MM, contrairement aux plasmocytes normaux ou de MGUS, faisant de cette protéine un candidat potentiel pour expliquer les réponses T anormales dans le MM. De façon intéressante, l'IFN γ mais aussi les ligands de TLRs tels que le PGN, le LPS ou le CpG, augmentent l'expression de B7H1. Cette induction est médiée par les protéines MyD88 et TRAF6 (Liu et al., 2007). L'activation de MyD88 permet la phosphorylation des MAPKs ERK1/2 responsables de la surexpression de B7H1. L'implication de la protéine adaptatrice MyD88 dans la signalisation de l'IFN γ est en accord avec des travaux récents démontrant que l'association entre MyD88 et le récepteur à l'IFN γ est nécessaire pour l'induction de la réponse (Sun et al., 2006). Il est important de noter que l'IFN γ et le LPS ont la même efficacité d'inhibition de la génération de lymphocytes T cytotoxiques contre la lignée RPMI-8226 et les cellules primaires de patients testés dans cette étude. Les TLRs pourraient donc induire des mécanismes d'autoprotection participant à l'évasion immune du MM.

I2.2 Induction d'IL6

Trois rapports ont récemment mis en évidence que les ligands des TLR2, 4, 5, 6, 7 et 9 induisent la sécrétion d'IL6 par les cellules primaires et les lignées de MM (Bohnhorst et al., 2006 ; Jegou et al., 2006 ; Xu et al., 2010). Cette induction autocrine d'IL6, facteur majeur dans la biologie du MM (voir p.25), a pour conséquence d'augmenter la prolifération et la survie des cellules myélomateuses. De plus, l'IL6 induit la résistance des cellules de myélome à la privation en sérum ou encore, à l'apoptose induite par la dexaméthasone, agent corticothérapeutique utilisé dans le traitement des patients. Dans le microenvironnement tumoral, l'IL6 est principalement produit par les cellules stromales, les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'activation des TLRs pourrait donc fournir une source autocrine d'IL6 aux cellules myélomateuses et contribuer à la pathologie en augmentant la prolifération, la survie et la résistance des cellules aux traitements. Il est important de noter que les lignées caractérisées par une dérégulation de MAF, et donc une surexpression du TLR4, utilisées dans ces études répondent aux LPS. Les ligands du TLR4, PAMPs ou DAMPs, résultant des infections chroniques ou de la dégradation matricielle pourraient avoir une implication dans l'émergence ou la progression de ce groupe de MM.

12.3 Induction de la voie NF- κ B

Les cellules de myélome sont caractérisées par une activation constitutive de la voie NF- κ B et sont très sensibles aux inhibiteurs de cette voie qui induisent un arrêt de prolifération ainsi qu'une forte induction en apoptose (Romagnoli et al., 2007). Cette activation constitutive est la conséquence de mutations activatrices fréquemment présente dans les cellules myélomateuses mais aussi de l'impacte du microenvironnement (voir p.29). Les TLRs sont de puissants inducteurs de la voie NF- κ B que se soit par la voie MyD88 ou TRIF dépendante (Kawai et Akira, 2007). Par exemple, certains travaux ont démontré que le CpG induit la sécrétion de TNF α , une forte activation de la voie NF- κ B ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire (Assaf et al., 2009). De plus, une étude récente met en évidence que l'induction de la sécrétion d'IL6, la prolifération, la survie et la résistance aux drogues observées après stimulation des TLR4 et 9 sur les cellules myélomateuses sont en grande partie dépendante de l'activation de la voie NF- κ B (Xu et al., 2010). Les PAMPs et les DAMPs pourraient donc participer *in vivo* à la progression du MM via l'activation chronique de la voie NF- κ B (Figure 12).

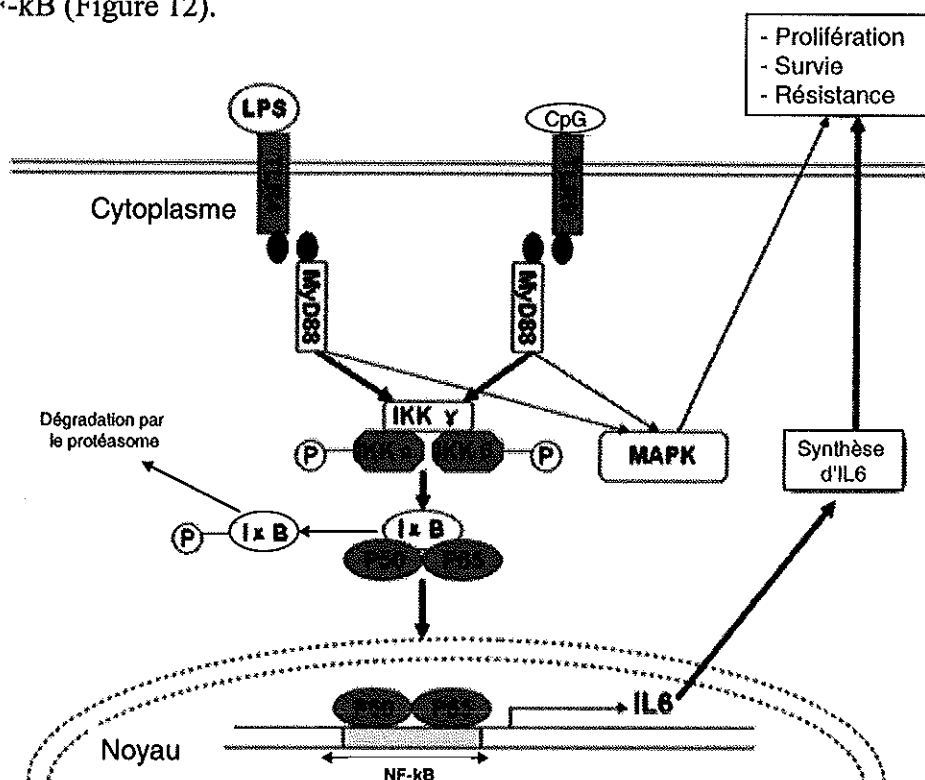


Figure 12 : Activation des MAPK et de la voie NF- κ B par les TLRs dans le MM
D'après XU et al., 2010

Illustration schématique de l'activation du TLR4 et du TLR9 par leur ligand respectif, le LPS et le CpG. L'activation de ces récepteurs va induire la production d'IL6 via l'activation de la voie NF- κ B ce qui induit une augmentation de la prolifération et une protection des cellules de MM contre l'apoptose.

PUBLICATIONS

ARTICLE 1 :

Les ligands du TLR3 activent la voie NF- κ B dans les cellules de Myélome Multiple mais induisent différentes réponses cellulaires en fonction de la production d'IFN- α

→ Introduction et résultats

Le Toll-like récepteur 3

Dans cette étude, nous avons évalué le rôle du TLR3 dans les cellules de MM. Contrairement à tous les autres membres de la famille des TLRs, le TLR3 va exclusivement induire une voie de signalisation MyD88-indépendante et TRIF-dépendante (Figure 7). Via sa reconnaissance des ARN double brins, il a tout d'abord été décrit pour son rôle essentiel dans la réponse immunitaire antivirale. Ce récepteur intracellulaire induit la sécrétion d'IFN α/β , de cytokines et de chimiokines par les fibroblastes, les cellules épithéliales ou encore les CD myéloïdes. Les ligands synthétiques du TLR3, tels que le poly(IC), sont aussi décrits pour leur capacité d'activation des cellules NK (Sivori et al., 2004), pour favoriser la présentation antigénique croisée par les CD et par conséquent la réponse T cytotoxique (Schulz et al., 2005). Ces caractéristiques font des ligands du TLR3 des adjuvants potentiels pour l'activation du système immunitaire (Jasani et al., 2009).

En plus de leurs propriétés immuno-stimulatrices, certains TLRs ont la capacité d'induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, ce mécanisme étant notamment important dans les processus d'élimination de cellules infectées (Salaun et al., 2007a). De façon intéressante, l'expression du TLR3 a été soulignée dans de nombreux modèles cancéreux et son activation induit l'apoptose dans les mélanomes, les cancers du sein, des reins, de la prostate ou encore dans les carcinomes hépatocellulaires (Salaun et al., 2006 ; Khvalevsky et al., 2007 ; Morikawa et al., 2007 ; Salaun et al., 2007b ; Paone et al., 2008). Bien que les mécanismes impliqués diffèrent selon les modèles cellulaires étudiés, l'activation de la voie NF- κ B et/ou la sécrétion d'IFN de type I sont déterminantes dans les effets pro-apoptotiques observés.

Expression du TLR3 dans le MM

Afin de déterminer si les voies de signalisation induites par le TLR3 sont fonctionnelles dans le MM, nous avons dans un premier temps étudié son expression dans les lignées et les cellules de patients. Sur un panel de 25 lignées de MM nous avons montré que

l'ARN du TLR3 est présent dans 50% des cas. De plus, comme décrit dans le tableau II (voir p.51), 26% des patients expriment ce récepteur.

Induction de la voie NF-kB associée à une réponse hétérogène

La première réponse observée après stimulation du TLR3 sur les cellules de MM est l'activation de la voie NF-kB, caractérisée dans cette étude, par la phosphorylation d'IkB et la translocation nucléaire de la sous unité p65. La réponse NF-kB est classique après l'activation des TLRs, notamment dans le MM (voir p.56 et Figure 12). En accord avec les études décrivant le rôle protumoral de la voie NF-kB dans le MM, le poly(IC) induit une augmentation de la prolifération de la lignée KMM1. Cependant de façon surprenante, une inhibition de la prolifération, accompagnée d'une induction en apoptose, est observée sur 2 autres lignées, NCI-H929 et RPMI8226. L'activation du TLR3 induit donc un effet cellulaire hétérogène. Cet effet proapoptotique, est indépendant de l'activation de la voie NF-kB observée. De plus, il est confirmé sur les cellules primaires de patients, 2 des 4 échantillons testés répondant aux poly (IC) par une réduction dramatique du nombre de plasmocytes tumoraux (CD138+).

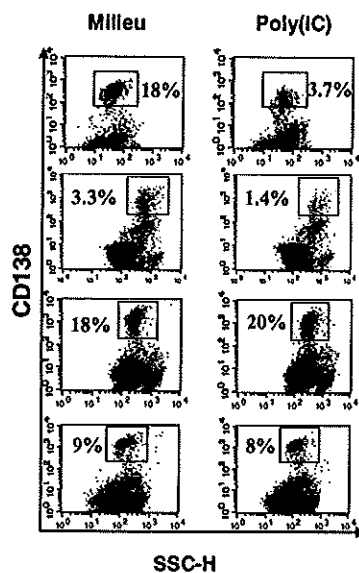


Figure 13 : Effet du poly(IC) sur les cellules primaires de MM

Les cellules mononuclées du sang périphérique sont marquées par un anticorps anti-CD138 ciblant les cellules myélomateuses. L'effet du poly(IC) est caractérisé dans 2 cas sur 4 par une baisse conséquente du nombre de cellules myélomateuses.

Induction de la sécrétion d'IFN α et d'IL6

Etant donné que le poly(IC) induit la sécrétion de cytokines proinflammatoires mais aussi celle d'IFN α/β dans plusieurs types cellulaires, nous avons évalué la présence de ces facteurs après activation du TLR3 sur les lignées de MM. Nous avons alors constaté une forte sécrétion d'IFN α et d'IL6 après stimulation par le poly(IC) mais exclusivement sur les lignées

induites en apoptose. Grâce à la neutralisation de la boucle autocrine d'IFN α , par des anticorps spécifiques, nous avons démontré que l'apoptose induite par le poly (IC) sur les lignées est exclusivement dû à un effet proapoptotique de l'IFN α .

Implication des MAPK p38 et ERK1/2 dans le processus apoptotique

Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par la poly(IC). Nous avons observé une activation précoce de la MAPK p38 et des protéines STAT1 et 3 ainsi qu'une activation tardive des MAPK ERK1/2. Nous avons démontré, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, que l'activation de la MAPK p38 est nécessaire à l'induction de la sécrétion d'IFN α par la poly(IC) et que les MAPK p38 et ERK1/2 sont impliquées dans le processus apoptotique.

TLR3 Ligand Induces NF- κ B Activation and Various Fates of Multiple Myeloma Cells Depending on IFN- α Production¹

David Chiron,*[†] Catherine Pellat-Deceunynck,*[†] Martine Amiot,*[†] Régis Bataille,*[†] and Gaëtan Jégou^{2*†}

Multiple myeloma (MM) cells express TLR. It has been shown that TLR ligands induce the proliferation, survival, and immune surveillance escape of MM cells through MyD88-TLR pathways. Deciphering TLR function in MM cells will help in understanding the mechanisms of tumor cell growth. In this study, we examined the response of MM cells to the MyD88-independent/TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β -dependent TLR3. Deregulation of NF- κ B pathway is a feature of MM cells, and we wondered whether TLR3 activation could mobilize the NF- κ B pathway. We show that five of seven human myeloma cell line (HMCL) cells expressed TLR3. In the presence of the synthetic TLR3 ligand (poly(I:C)), activation of NF- κ B pathway was observed in three of five selected TLR3⁺ HMCL, NCI-H929, RPMI 8226, and KMM1. In agreement with NF- κ B activation, only these three HMCL responded to poly(I:C), although by either an increase (KMM1) or a decrease (NCI-H929, RPMI 8226) of proliferation. We show that KMM1 increase of proliferation was prevented by NF- κ B inhibitor. In contrast, inhibition of proliferation in both NCI-H929 and RPMI 8226 was due to IFN- α -induced apoptosis. We next demonstrated that p38 MAPK pathway controlled both IFN- α secretion and IFN- α -mediated cell death. Moreover, cell death also involved activation of ERK1/2 pathway. In conclusion, our results show that TLR3 ligand induces NF- κ B pathway activation in MM and support a switching function of type I IFN in the functional outcome of TLR3 triggering in tumor cells. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 4471–4478.

Invasive pathogens are sensed by the human immune system through pattern recognition receptors like TLR (1). TLRs recognize highly conserved structures from microorganisms, of either viral (TLR3, 7, 8, and 9) or bacterial origin (TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, and 9). They also recognize endogenous TLR ligands (heat shock proteins, fibronectin, heparan sulfates . . .) either released by damaged tissue during a cellular stress or present in the context of autoimmune diseases (2). Upon activation, TLRs induce a cascade of events aimed at the elimination of the pathogen (dendritic cell (DC)³ maturation, immune cell migration, and differentiation) (3).

Although initial studies have focused on the TLR function in the immune system, more recent studies have shown that TLR expression is shared by many different cell types either normal or malignant. Furthermore, reports have suggested that TLR could play a role in solid tumor development either through TLR ligands, or deregulated TLR signaling (hepatocarcinoma, gastric carcinoma, colon, lung) (4–8). In those cases, chronic infections by a well-identified infectious agent or common bacteria induce a deregulated inflammatory secretion and are often associated with NF- κ B

activation. B cell neoplasias such as multiple myeloma (MM) or B cell chronic lymphocytic leukemia express functional TLR that can be activated in vitro by TLR ligands (9). Indeed, we and others have recently shown that TLR2, 4, 5, 7, and 9 ligands promote MM cell proliferation, drug resistance through an autocrine secretion of IL-6, and immune surveillance escape through the expression of B7-H1 (10–12). The in vivo relevance of these experimental results is supported by recent epidemiological studies showing that having several episodes of pneumonia before MM or B cell chronic lymphocytic leukemia diagnosis increases the risk of developing the disease (13, 14). Furthermore, due to B cell leucopenia, MM patients are strongly vulnerable to bacterial, fungal, and viral infections (15). Finally, next to the general organ failure, recurrent infections remain a major cause of death in MM patients. Thus, deciphering TLR function in MM cells could help us to understand the involvement of TLRs in tumor cell growth and survival.

TLR3 is a receptor for the dsRNA from viruses and for the mammalian RNA associated or released from necrotic cells (16, 17). TLR3 triggering induces type I IFN, inflammatory cytokine/chemokine production by fibroblasts, epithelial cells, and myeloid DC. TLR3 ligand also induces DC maturation, and TLR3 is critical in mice for cross-presentation (18). TLR3 signaling involves TNFR-associated factor (TRAF) 3 for the production of type I IFN, NF- κ B, and MAPK for the production of inflammatory cytokines (1). Studies of TLRs in MM have to date focused on the MyD88-dependent TLR pathways, including TLR1, 2, 4, 7, and 9. In contrast, the role of TLR3, which uses a MyD88-independent/TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β (TRIF); dependent pathway, has not been investigated despite frequent expression in human myeloma cell lines (HMCL). Furthermore, the TRIF-dependent pathway is functional in different types of tumors that show various and even opposite effects in response to TLR3 ligand. Indeed, TLR3 triggering induces apoptosis in breast cancer cells, melanoma cells, and renal cell carcinoma (19–21). In contrast, proliferation increase and cytokine secretion are observed in

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Nantes, France; and [†]Université de Nantes, Unité Mixte de Recherche-S892, Nantes, France

Received for publication September 23, 2008. Accepted for publication January 16, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from La ligue Contre le Cancer (to G.J.; Equipe labellisée 2008).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Gaëtan Jégou, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes, France. E-mail address: gaetanjegou@yahoo.fr

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; HMCL, human myeloma cell line; MM, multiple myeloma; TRAF, TNFR-associated factor; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β ; pDC, plasmacytoid DC.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

lung cancer cells and in head and neck squamous cell carcinoma (22, 23), prompting us to wonder whether this pathway is also functional in MM cells.

Materials and Methods

HMCL

The XG1 HMCL has been established in our laboratory (24) and is cultured in the presence of 3 ng/ml rIL-6 (Novartis Pharmaceuticals). The KMM1 HMCL has been provided by Dr. T. Otsuki (Kawasaki Medical School, Okayama, Japan). NCI-H929, OPM2, U266, and L363 HMCL were purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. RPMI 8226 was obtained from the American Type Culture Collection. HMCL were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS and 2 mM glutamine.

RNA isolation and quantitative real-time PCR

RNA was isolated using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). Two micrograms of the total RNA was reverse transcribed using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Amersham Biosciences). Quantitative PCR was performed using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the MX4000 instrument (Stratagene). TLR3 (Hs01551078_m1) and RPL37a (Hs01102345_m1) TaqMan gene expression assays were from Applied Biosystems. The thermal cycling parameters used were 50°C for 2 min for optimal AmpErase UNG activity, then 40 cycles at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. To control specificity of the amplified product, a melting curve analysis was performed. No amplification of unspecific product was observed. Amplification of the housekeeping gene RPL37a was conducted for each sample as endogenous control.

Subcellular p65 NF- κ B subunit localization by immunofluorescence

HMCL were treated with or without poly(I:C) at 200 μ g/ml for 2 h, then spotted on a glass slide, fixed with PBS + 2% formal, and permeabilized with 0.05% Tween 20 plus 0.05% Triton X-100. After incubation for 1 h with anti-human p65 Ab (1:100; Santa Cruz Biotechnology), cells were washed and incubated for 20 min with a FITC-conjugated anti-rabbit Ab (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Images were collected using a Leica TCS NT microscope with a 63 $\times$ 1.3 Fluotar objective (Leica Microsystems).

Proliferation assay

HMCL were washed and cultured 4 days in RPMI 1640/5% FCS at 10^4 cells/200 μ l in triplicate. After [3 H]thymidine incorporation, cells were harvested and counted on a liquid scintillation analyzer.

Cell viability assay

HMCL (10^5 cells/200 μ l) were cultured with or without poly(I:C) for 24–48 h, depending on the experiment. Cell viability was determined with FITC-conjugated annexin V labeling (Beckman Coulter) and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Western blotting

Myeloma cells (10^6 cells/ml) were serum starved for 18 h, treated or not, harvested, and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM Na_2VO_4 , 1 mM NaF, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 0.5% Nonidet P-40). Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA protein assay; Pierce), and 90 μ g of proteins was separated by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Signals were detected by standard techniques using ECL detection (Roche).

Abs for Western blotting

Abs against phospho-ERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (197G2, rabbit mAb), phospho-Akt Ser⁴⁷³ (587F11, mouse mAb), phospho-p38 MAPK Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² (28B10, mouse mAb), phospho-STAT1 Tyr⁷⁰¹ (58D6, rabbit mAb), phospho-STAT3 Tyr⁷⁰⁵ (rabbit polyclonal), phospho-I κ B α Ser^{32/36} (5A5, mouse mAb), and Abs against ERK1/2, Akt, p38, STAT1, and I κ B α (all rabbit polyclonal) were from Cell Signaling Technology (Ozyme). Abs against STAT3 (mouse polyclonal) were from BD Biosciences.

Neutralizing Abs, cytokines, and reagents

IFN- α and IL-6 were purchased from R&D Systems, U0126 and Bay11-7082 from Alexis (Tebu-Bio), p38 MAPK inhibitor III from Calbiochem

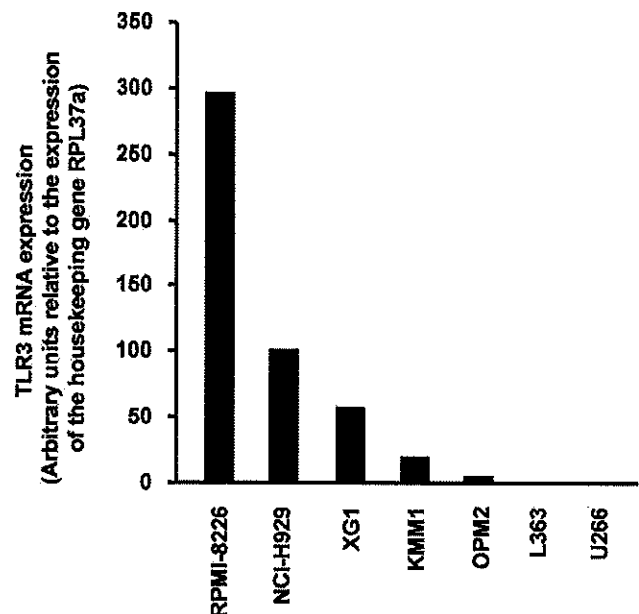


FIGURE 1. HMCL express TLR3. Expression of TLR3 mRNA in seven HMCL analyzed by real-time PCR, as described in *Materials and Methods*. The data are normalized to the expression of the housekeeping gene RPL37a.

(VWR), zVAD-fmk from Promega, and poly(I:C) from InvivoGen. Neutralizing Abs to IFN- α receptors were from R&D Systems. IL-6 and IFN- α ELISA were purchased from Sanquin and R&D Systems, respectively.

Results

MM cells express TLR3 and TLR3 ligand induces I κ B α phosphorylation

We first determined the expression of TLR3 by real-time PCR on seven HMCL. As shown in Fig. 1, five of seven HMCL (RPMI 8226, NCI-H929, XG1, KMM1, and OPM2) expressed TLR3, although at various levels, L363 and U266 being negative. Because TLR ligands induce activation of the classical NF- κ B pathway in many different cell types (25), we looked at the NF- κ B activation status through I κ B α phosphorylation in HMCL upon poly(I:C) stimulation. As shown in Fig. 2A and summarized in Table I, poly(I:C) induced a sustained I κ B phosphorylation in TLR3-positive HMCL RPMI 8226, NCI-H929, and KMM1. No increase of phosphorylation was observed, even lately (6 h), in L363 (Fig. 2A), OPM2, and XG1 (data not shown). Furthermore, immunofluorescence confirmed that poly(I:C) promoted p65 NF- κ B subunit nuclear localization in RPMI 8226, NCI-H929, and KMM1 (Fig. 2B). No significant change of p65 localization was observed in the TLR3-negative L363.

Poly(I:C) induces heterogeneous HMCL responses

Because poly(I:C) increased I κ B α phosphorylation, we determined the effect of poly(I:C) on the proliferation of HMCL. The effect of poly(I:C) was heterogeneous (Table I). A lack of a significant response was observed for four of seven HMCL (OPM2, L363, U266, and XG1). In contrast, a decrease of proliferation was observed for two of seven HMCL (NCI-H929 and RPMI 8226). Finally, more than 50% of the proliferation increase was observed for KMM1. Of note, cell response to poly(I:C) was restricted to HMCL, which showed an increase of I κ B α phosphorylation (Fig. 2, A and B). No correlation between the level of TLR3 expression and the type or magnitude of the response observed in the presence

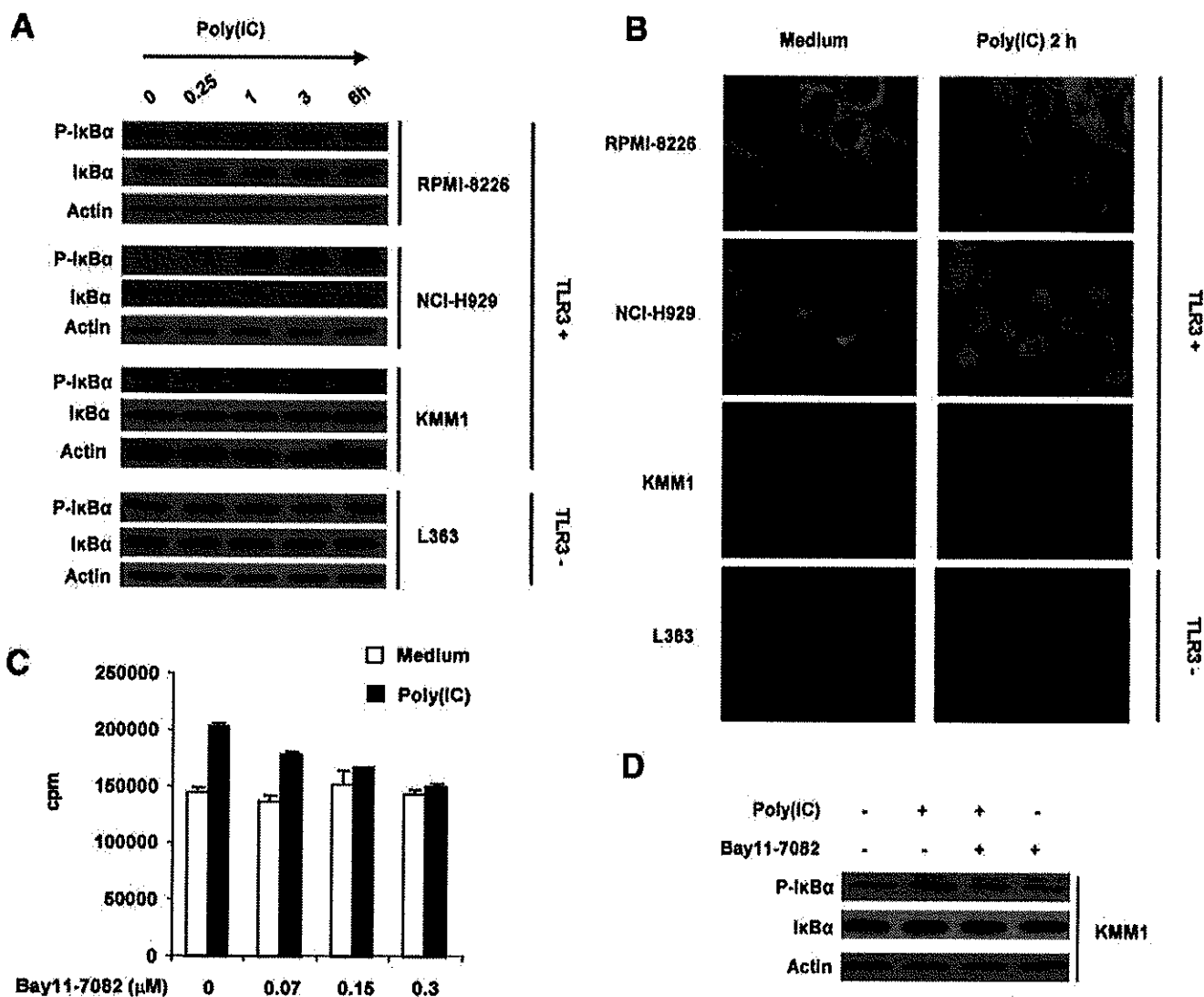


FIGURE 2. Poly(I:C) activates the NF- κ B pathway and increases the proliferation of KMM1 through NF- κ B. **A**, Level of NF- κ B activation determined by immunoblot analysis of P-I κ B α in sensitive cell lines RPMI 8226, NCI-H929, and KMM1, and in resistant cell line L363 treated with poly(I:C) (200 μ g/ml) at different time points. **B**, Subcellular localization of p65 NF- κ B subunit evaluated in RPMI 8226, NCI-H929, KMM1, and L363 by immunofluorescence using a Leica TCS NT microscope with a 63 $\times$ 1.3 Fluotar objective. Cells were treated or not with poly(I:C) (200 μ g/ml) during 2 h before staining. **C**, Proliferation of KMM1 induced by poly(I:C) in the absence or presence of increasing doses of a specific inhibitor of I κ B- α phosphorylation (Bay11-7082). One experiment representative of three experiments. **D**, Immunoblot analysis of I κ B α phosphorylation in KMM1 with or without poly(I:C) (200 μ g/ml), treated or not by Bay11-7082 (0.3 μ M). Serum-starved cells were incubated during 1 h with Bay11-7082 before incubation or not with poly(I:C) during 3 h.

of poly(I:C) could be established (Table I). Taken together, these results indicated that MM cells express TLR3 and respond to its ligand in opposite ways.

TLR3 induces proliferation of KMM1 through NF- κ B activation

To determine whether the activation of the classical NF- κ B pathway was responsible for the increase in proliferation, we blocked it by using a specific inhibitor of I κ B α phosphorylation (Bay11-7082) (26). As shown in Fig. 2C, inhibition of NF- κ B activation completely blocked the poly(I:C)-increased proliferation of KMM1 in a dose-dependent manner without affecting basal proliferation. Accordingly, the poly(I:C)-induced phosphorylation of I κ B α was abrogated by the specific inhibitor of I κ B α phosphorylation (Fig. 2D).

Poly(I:C) induces apoptosis of HMCL through IFN- α

To determine the mechanism of the proliferation decrease observed for NCI-H929 and RPMI 8226, we measured the viability

of the seven HMCL in the presence or absence of poly(I:C). As shown by annexin V staining for NCI-H929 and RPMI 8226 (Fig. 3A and summarized in Table I for all the HMCL), the percentage of dead cells strongly increased (percentage of induced cell death in the presence of 50 μ g/ml poly(I:C): mean = 65% $\pm$ 12 (n = 5), and mean = 28% $\pm$ 6 (n = 3) for NCI-H929 and RPMI 8226, respectively). No variation of survival was observed for OPM2, L363, U266, XG1, and KMM1. Furthermore, the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk completely blocked the cell death of NCI-H929 (data not shown), confirming that poly(I:C) induces cell death through a caspase-dependent mechanism.

The activation of DC and macrophages by poly(I:C) induces the production of inflammatory cytokines and type I IFN. Furthermore, IFN- α is known to induce apoptosis of HMCL (27, 28). Thus, to decipher the mechanism of poly(I:C)-induced apoptosis, we next determined the presence of IFN- α in the supernatant of HMCL treated or not by poly(I:C). As shown in Fig. 3B, no cytokine was detected in the absence of stimulation. In contrast, high

Table 1. Poly(I:C) induces heterogeneous profiles of NF- κ B activation, proliferation, and cell survival responses of HMCL^a

HMCL	TLR3 Expression	NF- κ B Activation	Variation of Proliferation Relative to Medium	Percentage of Induced Cell Death
RPMI 8226	+	+	-27.8% $\pm$ 12.2	+28% $\pm$ 6
NCI-H929	+	+	-63.4% $\pm$ 7.3	+65% $\pm$ 12
XG1	+	-	-0.8% $\pm$ 5.3	0% $\pm$ 1
KMM1	+	+	+58% $\pm$ 22.8	-3.5% $\pm$ 2
OPM2	+/-	-	-8.4% $\pm$ 6.4	-1% $\pm$ -0.5
L363	-	-	-8.2% $\pm$ 6.2	-1% $\pm$ -1
U266	-	-	-2.75% $\pm$ 0.5	0% $\pm$ 0

^aTLR3 expression was determined by real-time PCR. NF- κ B activation was determined by immunoblot analysis and immunofluorescent staining. Variation of proliferation and survival of seven HMCL in the presence of poly(I:C) (50 μ g/ml), relative to the proliferation and survival observed in culture with medium alone, were determined by [³H]thymidine incorporation and annexin V staining, respectively. The mean values $\pm$ SDs of three independent experiments are shown.

amounts of IFN- α were detected in the supernatant of RPMI 8226 and NCI-H929 after 24 h of poly(I:C) stimulation. Of note, IL-6 was also detected in those HMCL (Fig. 3B). Strikingly, we did not detect IFN- α and IL-6 in any of the other HMCL tested.

Because some HMCL are induced into apoptosis in the presence of IFN- α , we wondered whether this could be the mediator of the

apoptosis. Indeed, neutralization of the IFN- α receptor strongly inhibited the poly(I:C)-induced apoptosis of NCI-H929 (Fig. 3C). On the contrary, neutralization of the IL-6R alone or in combination with the IFN- α receptor did not modify the effect of poly(I:C). Similarly, neutralization of the IFN- α receptor strongly inhibited the poly(I:C)-induced apoptosis of RPMI 8226. Taken

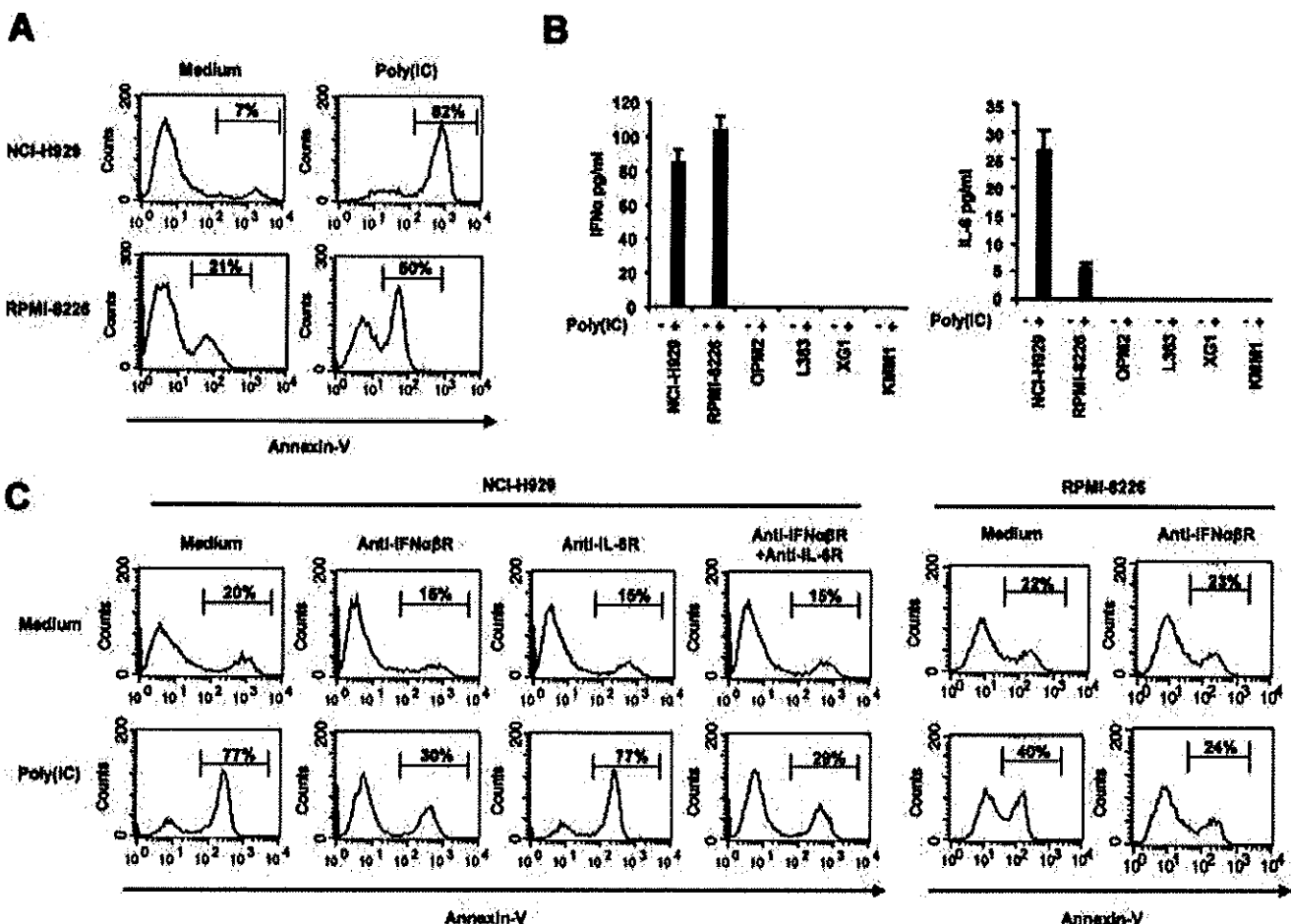
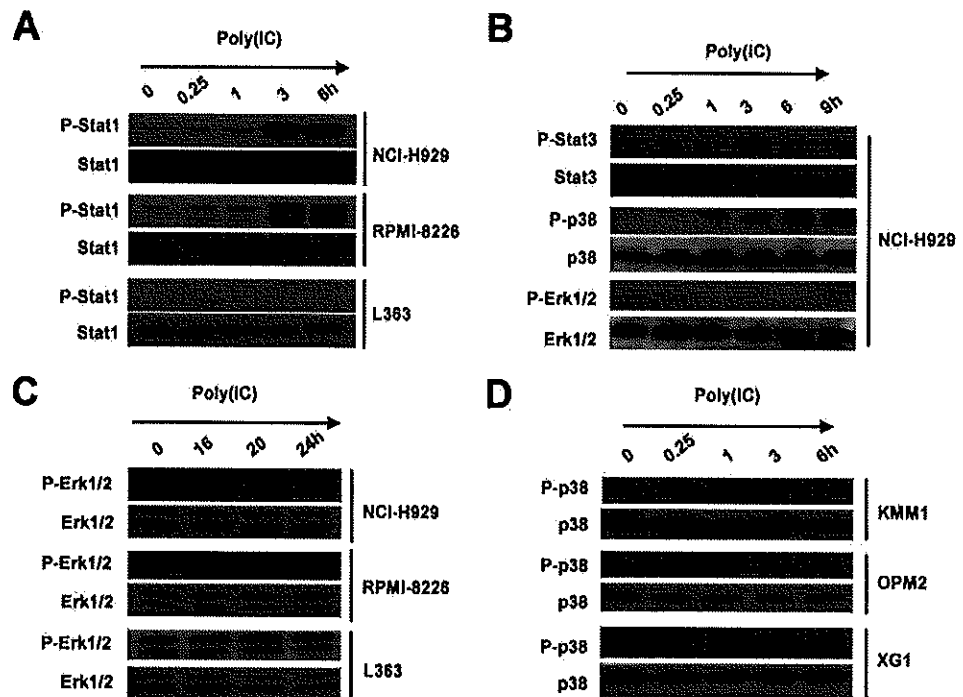


FIGURE 3. Poly(I:C) induces apoptosis of HMCL through the secretion of IFN- α . A, Percentage of cell death of NCI-H929 and RPMI 8226 in the absence or presence of poly(I:C) (50 μ g/ml) determined at day 2 by annexin V staining. One experiment representative of more than three experiments. B, Concentration of IFN- α (left graph) and IL-6 (right graph) produced by HMCL in the absence or presence of 50 μ g/ml poly(I:C). Cells were washed extensively, then cultured at $0.4 \times 10^6/200$ μ l in triplicate. Supernatants were harvested after 24 h, and cytokine concentration was determined by ELISA. One experiment representative of two experiments. C, The percentage of annexin V-positive cells determined at day 2 in NCI-H929 in the presence or absence of poly(I:C) (50 μ g/ml), of a blocking Ab to IFN- α R, of a blocking Ab to IL-6R (gp80), or a mix of both. The percentage of annexin V-positive cells determined at day 2 in RPMI 8226 in the presence or absence of poly(I:C) (50 μ g/ml), of a blocking Ab to IFN- α R. One experiment representative of three experiments.

FIGURE 4. Poly(I:C) induces STAT1, p38 MAPK, and ERK1/2 activation in HMCL that undergo apoptosis. **A**, Kinetic of STAT1 phosphorylation determined by immunoblot analysis in the sensitive cell lines NCI-H929 and RPMI 8226, and in the resistant cell line L363 treated by 200 μ g/ml poly(I:C). **B**, Kinetic of STAT3, p38 MAPK, and ERK1/2 phosphorylations determined by immunoblot analysis in NCI-H929 treated by 200 μ g/ml poly(I:C). **C**, Kinetic of ERK1/2 phosphorylation determined by immunoblot analysis in NCI-H929, RPMI 8226, and L363 treated by 200 μ g/ml poly(I:C) for 16, 20, and 24 h. **D**, Level of p38 MAPK phosphorylation determined by immunoblot analysis in TLR3-positive HMCL KMM1, OPM2, and XG1 treated by 200 μ g/ml poly(I:C) at different time points.



together, these data indicated that TLR3 ligand induces apoptosis through IFN- α secretion.

Poly(I:C) induces STAT1, p38 MAPK, and ERK1/2 activation in HMCL that undergo apoptosis

To identify the mechanism of IFN- α production upon poly(I:C) stimulation, we first determined the signaling pathways activated by poly(I:C) in the sensitive cell lines NCI-H929 and RPMI 8226, and the resistant cell line L363. STAT1 phosphorylation is known to be a sign of both type I IFN and IL-6 signaling (29, 30). According to the cytokine secretion profile, STAT1 phosphorylation increased at 3 h of poly(I:C) treatment in NCI-H929 and RPMI 8226, but not in L363 (Fig. 4A). Strong phosphorylations of p38 MAPK and STAT3 were detected at 1 and 3 h, respectively, after poly(I:C) stimulation (Fig. 4B). Finally, a strong phosphorylation of ERK1/2 was detected later. As shown in Fig. 4C, increase of ERK1/2 phosphorylation was observed at 16 h in NCI-H929, and at 20 h in RPMI 8226. No increase of ERK1/2 phosphorylation was observed in the resistant HMCL L363. Finally, no p38 MAPK phosphorylation was detected in TLR3-positive HMCL that are not induced in apoptosis (KMM1, OPM2, and XG1) during the treatment with poly(I:C) (Fig. 4D). Taken together, these data suggest that ERK1/2 and p38 MAPK activation could be involved in the apoptosis process.

IFN- α induces apoptosis through ERK1/2 and p38 MAPK activation

Because p38 MAPK has been shown to be involved in the process of IFN- α secretion by plasmacytoid DC (pDC) upon TLR9 triggering (31), we added a specific inhibitor during the stimulation of NCI-H929 by poly(I:C). As shown in Fig. 5A, the inhibition of p38 MAPK activity almost completely blocked IFN- α secretion, whereas ERK1/2 inhibition had limited effects. Accordingly, apoptotic cells in the presence of poly(I:C) strongly decreased when the p38 MAPK signaling was blocked (mean of death reduction = $73.6\% \pm 11$, $n = 3$) (Fig. 5B). Interestingly, inhibition of ERK1/2 activation in the presence of poly(I:C) also rescued the cell line from death (mean of death reduction = $65\% \pm 5$, $n = 3$). The

combination of both inhibitors further improved the survival in both NCI-H929 (mean of reduction = $85\% \pm 9$, $n = 3$) and RPMI 8226 (data not shown). Taken together, these results suggested that p38 MAPK was involved in the secretion of IFN- α , whereas ERK1/2 was not. Furthermore, despite late activation, neutralization experiments suggested that ERK1/2 could be involved in the IFN- α -mediated cell death, together with p38 MAPK.

To further decipher the involvement of p38 MAPK and ERK1/2 in the mechanism of poly(I:C)-induced apoptosis, we replaced poly(I:C) by a mix of the two cytokines produced upon TLR3 triggering. As shown in Fig. 5C, NCI-H929 treated with IFN- α and IL-6 showed, despite timing differences, a profile of signaling pathway activation close to the one induced by poly(I:C). Indeed, phosphorylation of both STAT1 and STAT3 was detected 15 min after the beginning of the incubation. ERK1/2 phosphorylation was maximal at 30 min, whereas p38 MAPK phosphorylation was detected after 3 h of incubation. Furthermore, p38 MAPK and ERK1/2 inhibitors, alone (mean of reduction = $54\% \pm 5$ and $62\% \pm 5$, respectively) or in combination (mean of reduction = $72.7\% \pm 2$, $n = 4$), strongly inhibited the cytokine-induced apoptosis (Fig. 5D).

Taken together, these data suggested that the p38 MAPK pathway controls both the autocrine secretion of IFN- α and the induction of apoptosis. They also suggest that ERK1/2 solely plays a role in the IFN- α -induced apoptosis.

Discussion

TLR are expressed by many different types of tumors, of both solid (melanoma, breast, lung, colon) and leukemic types (4, 5, 7, 10, 11). The described effects of ligands of MyD88-dependent TLR are mostly protumoral by increasing cytokine secretion, proliferation, resistance to drugs, and resistance to immune effector lysis. This is in agreement with studies in MM published by us and by other groups. In this study, we show that the TLR3-TRIF-dependent pathway activates NF- κ B, leading or not to proliferation increase. In MM and in other hematological neoplasia, NF- κ B activation contributes to the malignant transformation and drug resistance (32). Despite recent breakthroughs in the deciphering of

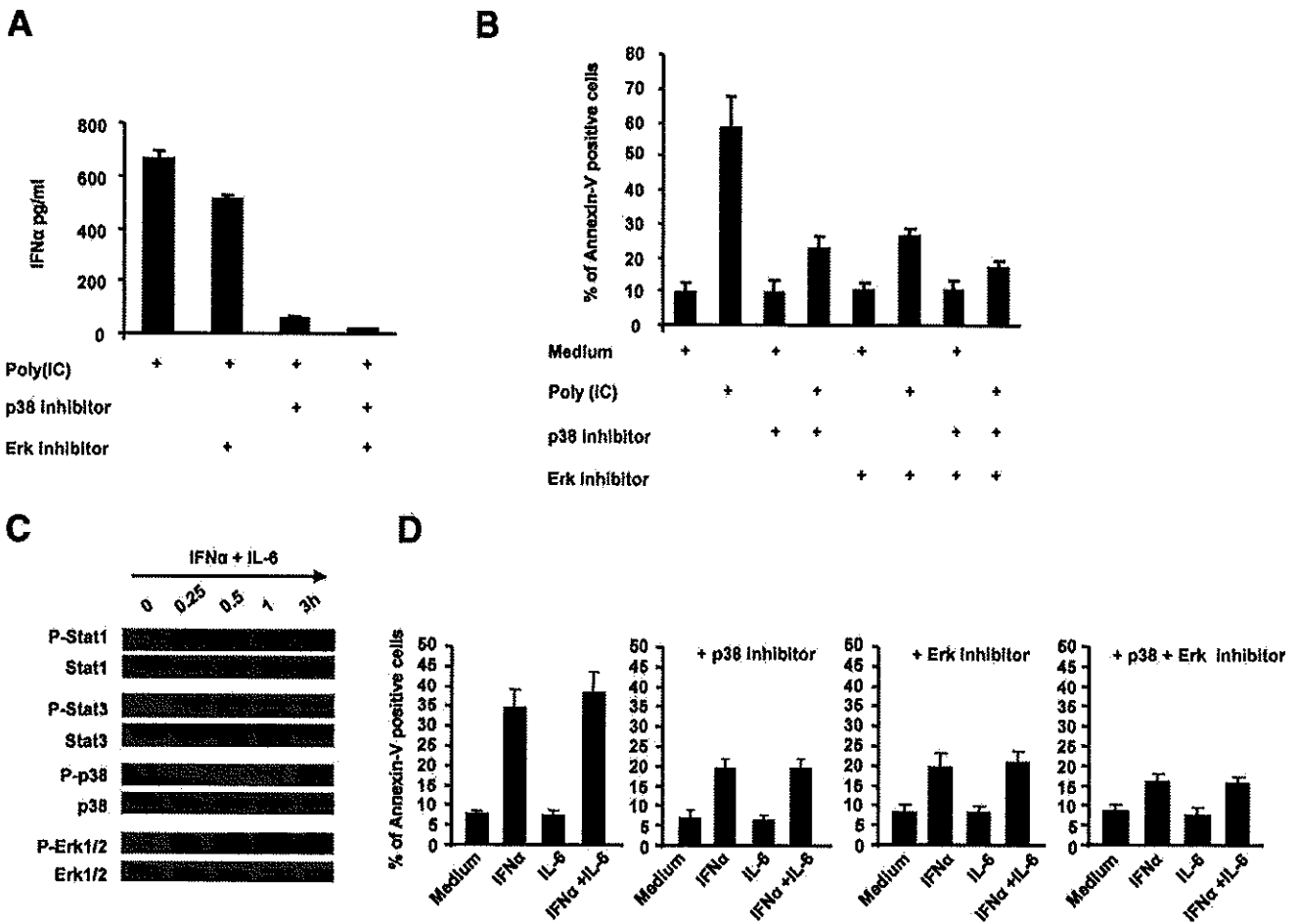


FIGURE 5. IFN- α induces apoptosis of HMCL through p38 MAPK and ERK1/2 activation. **A**, Concentration of IFN- α in the supernatant of NCI-H929 in the presence or absence of p38 MAPK inhibitor III (2 μ M), ERK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M), or both. Cells were cultured with 50 μ g/ml poly(I:C), with or without inhibitors. Supernatants were harvested after 24 h, and concentration was determined by ELISA. One experiment representative of two experiments. **B**, Percentage of annexin V-positive cells determined in NCI-H929 in the presence or absence of poly(I:C) (50 μ g/ml), in the presence or absence of p38 MAPK inhibitor III (2 μ M), ERK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M), or both. Cell death was determined after 24 h of culture. The mean values $\pm$ SDs of three independent experiments are shown. **C**, Kinetic of STAT1, STAT3, p38 MAPK, and ERK1/2 phosphorylations determined by immunoblot analysis in NCI-H929 treated by a mix of IFN- α (4000 U/ml) and 10 ng/ml IL-6. **D**, Percentage of annexin V-positive cells determined in NCI-H929 in the presence or absence of IFN- α , IL-6, or both, in the presence or absence of p38 MAPK inhibitor III (2 μ M), ERK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M), or both. Cell death was determined after 24 h of culture. The mean values $\pm$ SDs of four independent experiments are shown.

the NF- κ B mechanism of activation in MM (33, 34), more studies are needed to understand the mechanisms governing the expression of intrinsic activated NF- κ B. Among the known NF- κ B-inducing factors are cytokines produced by the bone marrow environment, as well as cell-cell interactions (35). Because TLR3 is a receptor for dsRNA from virus and for mammalian RNA associated or released from necrotic cells, this could suggest that a ligand of TLR from either infectious or endogenous origin could be part of the NF- κ B-activating mixture in MM bone marrow.

In contrast, it has been shown that the TLR3 pathway induces or potentiates the apoptosis of melanoma and breast cancer cells. We show in this study that TLR3 triggering can also induce apoptosis in HMCL, although only in two of five TLR3-positive HMCL. This implies that only a subpopulation of MM patients could benefit from a TLR3 ligand-based therapy, and it could explain the mitigating result of the unique poly(I:C)-based clinical trial in MM (36). We show that the apoptosis induced by poly(I:C) is linked to the production of IFN- α by the MM cell. This mechanism is reminiscent of the one observed in breast cancer cells, although in this case, the type I IFN production is required, but not sufficient, for apoptosis (19).

The present data support a switching function of type I IFN in the functional outcome of TLR triggering in tumor cells, as it has been recently shown in DC (37). Indeed, TLR3 triggering induces NF- κ B activation in tumor cells regardless of their fate, but only cells producing IFN- α through the p38 MAPK pathway are induced into apoptosis. Type I IFN production is involved in the mechanisms of resistance to infections and tissue damage. Therefore, the loss of the capacity to produce type I IFN while maintaining NF- κ B activation might be an advantage for tumor cells in the context of chronic infections (Fig. 6). This kind of response has not been observed with MyD88-dependent TLR in MM, suggesting the preferential induction of type I IFN by TRIF compared with other TLR adaptor proteins.

In this study, we addressed for the first time the mechanism of IFN- α production by MM cells. We show that it is controlled by the p38 MAPK. Accordingly, the involvement of p38 MAPK in the production of IFN- α by pDC has been shown (31, 38), suggesting that some pathways of IFN production are conserved through cell types. We also found that, in HMCL, the production of IFN- α was coupled to that of IL-6. This suggests a common pathway for these two cytokines downstream of TRIF. In this

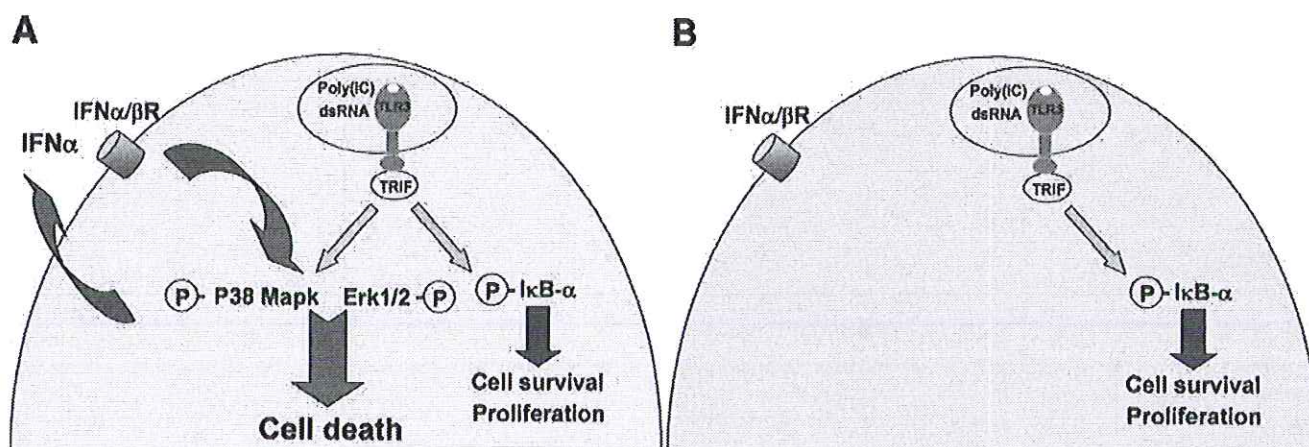


FIGURE 6. Model determining the fate of MM cells in the presence of TLR3 ligands. *A*, TLR3 stimulation induces both NF- κ B and p38 MAPK activation. The latter drives IFN- α production that induces apoptosis through MAPK pathways. *B*, In the absence of p38 MAPK activation, NF- κ B activation is dominant and promotes cell survival and/or proliferation.

pathway, TRAF3 has been shown to be critical for IFN- α production by mouse pDC and macrophages (39, 40), but it is frequently mutated or deleted in HMCL (including RPMI 8226, which does produce IFN- α) and primary MM cells (33, 34). In contrast, TRAF6, which is expressed by all the HMCL tested, has been shown to be critical for inflammatory cytokine production in macrophages and IL-6 production in breast cancer cells (19). Thus, it remains to be determined whether TRAF6 is involved in the cytokine production in HMCL.

Several studies have shown that IFN- α induces apoptosis in HMCL. However, authors do not agree on the signaling pathways mediating this effect. Some involve the PI3K-ERK1/2-JNK pathway (41), whereas others rule out its role (27, 28, 42). This discrepancy could be explained by the strong heterogeneity of MM cells (43). In this study, our data suggest that ERK1/2 might participate synergistically with p38 MAPK to the apoptosis signal in some MM upon stimulation by poly(I:C)/IFN- α plus IL-6. Indeed, we show that the signaling pathways responsible for the induction of apoptosis upon poly(I:C) treatment are also activated by IFN- α and IL-6. Although it is likely that these signaling pathways are not solely induced by the two cytokines during poly(I:C) treatment, we were able to reproduce the cell death in a p38 MAPK and ERK1/2-dependent mechanism.

Given that ERK1/2 is known to be essential to the cell growth of diverse leukemic cells and MM, our result suggests a new unexpected composite role for this MAPK. The involvement of p38 MAPK in the apoptotic effect of IFN- α in MM is in accordance with its role in the suppressive effect of IFN on normal hematopoiesis and other malignancies (44). In addition, we observed in NCI-H929 a cleavage of the antiapoptotic molecule Mcl-1, which is essential to the survival MM cells, and an up-regulation of the apoptosis sensitizer Noxa (45, 46) (data not shown). These data suggest that Mcl-1 cleavage and Noxa up-regulation could play a role in the mechanism of poly(I:C)-mediated apoptosis. It was previously described that IFN- α induced Noxa, a BH3-only protein (47). Furthermore, we have extensively shown that early Mcl-1 cleavage is always associated with MM apoptosis (48, 49). Mcl-1 is cleaved upon melphalan, bortezomib, or trail treatment (46, 49, 50). The up-regulation of Noxa has been shown to be required for bortezomib-induced apoptosis in both myeloma and melanoma (46, 51). Therefore, it would be of high interest to determine the involvement of MAPK in both Mcl-1 cleavage and Noxa up-regulation.

TLR2, 4, 7, and 9 ligands have been shown to induce proliferation and drug resistance of MM cells through IL-6 secretion. Given our data, we can add TLR3 ligand to the list, although the mechanism of action is different. This shows that different types of TLR are functional in MM cells in vitro, and it suggests that they could be involved in MM pathogenesis. The study of TLR function in murine MM models is now necessary to definitively demonstrate their role in vivo.

In conclusion, our results confirm the importance of the TLR-mediated effects in MM cells, because the TLR3-TRIF-dependent pathway can promote cell growth as well as TLR-MyD88-dependent pathways. These findings support further investigation to understand the role of these pathways in MM pathogenesis. However, TLR3 has a unique profile among TLR because it can mediate the apoptosis of MM cells, as well as of other types of tumors, through type I IFN. Finally, these data increase our understanding of the function and diversity of TLR in tumors.

Acknowledgments

We thank Dr. Monique Clement for help with the immunofluorescent staining.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
2. Marshak-Rothstein, A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 823–835.
3. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987–995.
4. Chen, Y. C., E. Giovannucci, R. Lazarus, P. Kraft, S. Ketkar, and D. J. Hunter. 2005. Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer Res.* 65: 11771–11778.
5. Kelly, M. G., A. B. Alvero, R. Chen, D. A. Silasi, V. M. Abrahams, S. Chan, I. Visintin, T. Rutherford, and G. Mor. 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66: 3859–3868.
6. Huang, B., J. Zhao, S. Shen, H. Li, K. L. He, G. X. Shen, L. Mayer, J. Unkeless, D. Li, Y. Yuan, et al. 2007. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell Toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 67: 4346–4352.
7. Xiao, H., M. F. Gulen, J. Qin, J. Yao, K. Bulek, D. Kish, C. Z. Altuntas, D. Wald, C. Ma, H. Zhou, et al. 2007. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* 26: 461–475.
8. Chen, R., A. B. Alvero, D. A. Silasi, K. D. Steffensen, and G. Mor. 2008. Cancers take their Toll: the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 27: 225–233.

9. Chiron, D., I. Bekeredjian-Ding, C. Pellat-Deceunynck, R. Bataille, and G. Jego. 2008. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 112: 2205–2213.
10. Jego, G., R. Bataille, A. Geffroy-Luseau, G. Descamps, and C. Pellat-Deceunynck. 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20: 1130–1137.
11. Bohnhorst, J., T. Rasmussen, S. H. Moen, M. Flottum, L. Knudsen, M. Borset, T. Espevik, and A. Sundan. 2006. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 20: 1138–1144.
12. Liu, J., A. Hamrouni, D. Wolowicz, V. Coiteux, K. Kuliczowski, D. Hetuin, A. Saudemont, and B. Quesnel. 2007. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110: 296–304.
13. Landgren, O., J. S. Rapkin, L. Mellemkjaer, G. Gridley, L. R. Goldin, and E. A. Engels. 2006. Respiratory tract infections in the pathway to multiple myeloma: a population-based study in Scandinavia. *Haematologica* 91: 1697–1700.
14. Landgren, O., J. S. Rapkin, N. E. Caporaso, L. Mellemkjaer, G. Gridley, L. R. Goldin, and E. A. Engels. 2007. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109: 2198–2201.
15. Blade, J., R. A. Kyle, and P. R. Greipp. 1996. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br. J. Haematol.* 93: 345–351.
16. Matsumoto, M., and T. Seya. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Delivery Rev.* 60: 805–812.
17. Kariko, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman. 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279: 12542–12550.
18. Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom, and C. Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433: 887–892.
19. Salaun, B., I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque, and T. Renno. 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.* 176: 4894–4901.
20. Salaun, B., S. Lebecque, S. Matikainen, D. Rimoldi, and P. Romero. 2007. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin. Cancer Res.* 13: 4565–4574.
21. Morikawa, T., A. Sugiyama, H. Kume, S. Ota, T. Kashima, K. Tomita, T. Kitamura, T. Kodama, M. Fukayama, and H. Aburatani. 2007. Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13: 5703–5709.
22. Pries, R., L. Hogrefe, L. Xie, H. Frenzel, C. Brooks, C. Ditz, and B. Wollenberg. 2008. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through Toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int. J. Mol. Med.* 21: 209–215.
23. Duffy, K. E., R. J. Lamb, L. R. San Mateo, J. L. Jordan, G. Canziani, M. Brigham-Burke, J. Korteweg, M. Cunningham, H. S. Beck, J. Carton, et al. 2007. Down-modulation of human TLR3 function by a monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 248: 103–114.
24. Zhang, X. G., J. P. Gaillard, N. Robillard, Z. Y. Lu, Z. J. Gu, M. Jourdan, J. M. Boiron, R. Bataille, and B. Klein. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83: 3654–3663.
25. Karin, M. 2006. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441: 431–436.
26. Pierce, J. W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S. A. Moore, T. Collins, and M. E. Gerritsen. 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* 272: 21096–21103.
27. Crowder, C., O. Dahle, R. E. Davis, O. S. Gabrielsen, and S. Rudikoff. 2005. PML mediates IFN- α -induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction. *Blood* 105: 1280–1287.
28. Gomez-Benito, M., P. Balsas, X. Carvajal-Vergara, A. Pandiella, A. Anel, I. Marzo, and J. Naval. 2007. Mechanism of apoptosis induced by IFN- α in human myeloma cells: role of Jak1 and Bim and potentiation by rapamycin. *Cell. Signal.* 19: 844–854.
29. Platanias, L. C., and E. N. Fish. 1999. Signaling pathways activated by interferons. *Exp. Hematol.* 27: 1583–1592.
30. Yoshimura, A. 2006. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.* 97: 439–447.
31. Takaiji, R., S. Iho, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, H. Kitagawa, H. Iwasaki, R. Iida, T. Yokochi, and T. Matsuki. 2002. CpG-DNA-induced IFN- α production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J. Leukocyte Biol.* 72: 1011–1019.
32. Gilmore, T. D. 2007. Multiple myeloma: lust for NF- κ B. *Cancer Cells* 12: 95–97.
33. Annunziata, C. M., R. E. Davis, Y. Demchenko, W. Bellamy, A. Gabrea, F. Zhan, G. Lenz, I. Hanamura, G. Wright, W. Xiao, et al. 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cells* 12: 115–130.
34. Keats, J. J., R. Fonseca, M. Chesi, R. Schop, A. Baker, W. J. Chng, S. Van Wier, R. Tiedemann, C. X. Shi, M. Sebag, et al. 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cells* 12: 131–144.
35. Li, Z. W., H. Chen, R. A. Campbell, B. Bonavida, and J. R. Berenson. 2008. NF- κ B in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr. Opin. Hematol.* 15: 391–399.
36. Durie, B. G., H. B. Levy, J. Voakes, J. R. Jett, and A. S. Levine. 1985. Poly(I,C)-LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma. *J. Biol. Response Modif.* 4: 518–524.
37. Hasan, U. A., C. Caux, I. Perrot, A. C. Doffin, C. Menetrier-Caux, G. Trinchieri, M. Tommasino, and J. Vlach. 2007. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8047–8052.
38. Osawa, Y., S. Iho, R. Takaiji, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, S. Horiguchi, Y. Urasaki, T. Matsuki, and S. Fujieda. 2006. Collaborative action of NF- κ B and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN- α and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 177: 4841–4852.
39. Oganessian, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439: 208–211.
40. Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, et al. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204–207.
41. Panaretakis, T., L. Hjortsberg, K. P. Tamn, A. C. Bjorklund, B. Joseph, and D. Grandt. 2008. Interferon α induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell* 19: 41–50.
42. Arora, T., G. Floyd-Smith, M. J. Espy, and D. F. Jelinek. 1999. Dissociation between IFN- α -induced anti-viral and growth signaling pathways. *J. Immunol.* 162: 3289–3297.
43. Bataille, R., G. Jego, N. Robillard, S. Barille-Nion, J. L. Harousseau, P. Moreau, M. Amiot, and C. Pellat-Deceunynck. 2006. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells: identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91: 1234–1240.
44. Caraglia, M., M. Marra, G. Pelaia, R. Maselli, M. Caputi, S. A. Marsico, and A. Abbuzzese. 2005. α -Interferon and its effects on signal transduction pathways. *J. Cell. Physiol.* 202: 323–335.
45. Willeme-Toumi, S., N. Robillard, P. Gomez, P. Moreau, S. Le Gouill, H. Avet-Loiseau, J. L. Harousseau, M. Amiot, and R. Bataille. 2005. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 19: 1248–1252.
46. Gomez-Bougie, P., S. Willeme-Toumi, E. Menoret, V. Trichet, N. Robillard, M. Philippe, R. Bataille, and M. Amiot. 2007. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res.* 67: 5418–5424.
47. Sun, Y., and D. W. Leaman. 2005. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J. Biol. Chem.* 280: 15561–15568.
48. Gomez-Bougie, P., R. Bataille, and M. Amiot. 2004. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 3156–3164.
49. Menoret, E., P. Gomez-Bougie, A. Geffroy-Luseau, S. Daniels, P. Moreau, S. Le Gouill, J. L. Harousseau, R. Bataille, M. Amiot, and C. Pellat-Deceunynck. 2006. Mcl-1 cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 108: 1346–1352.
50. Gomez-Bougie, P., L. Oliver, S. Le Gouill, R. Bataille, and M. Amiot. 2005. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene* 24: 8076–8079.
51. Qin, J. Z., J. Ziffra, L. Stennett, B. Bodner, B. K. Bonish, V. Chaturvedi, F. Bennett, P. M. Pollock, J. M. Trent, M. J. Hendrix, et al. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res.* 65: 6282–6293.

→ Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un effet anti-tumoral du TLR3 dans le MM, comme il avait été décrit dans d'autres modèles cellulaires. Cet effet est largement dépendant de la production d'IFN α , et seules les cellules myélomateuses ayant la capacité de le produire vont pouvoir être induites en apoptose par le poly (IC).

Les effets de l'IFN α sur les cellules myélomateuses sont controversés comme je l'ai décrit auparavant (voir p.26). De plus, divers mécanismes ont été impliqués dans l'apoptose dépendante de l'IFN α que ce soit par activation des voies Pi3k, Erk, Jnk ou encore par l'intermédiaire de l'induction de Trail (Crowder et al., 2005 ; Gomez-Benito et al., 2007 ; Panaretakis et al., 2008). Dans notre étude, nous suggérons un rôle essentiel de la MAPK p38 dans l'induction de la sécrétion d'IFN α mais aussi dans le processus apoptotique induit par cette boucle autocrine. Ces résultats sont en accord avec les travaux démontrant le rôle de la MAPK p38, d'une part dans la production d'IFN α par les CD plasmacytoïdes (Takauji et al., 2002) mais aussi dans le rôle suppressif de l'IFN α au cours de l'hématopoïèse (Caraglia et al., 2005).

Nous avons aussi observé que le poly(IC) induit le clivage de la protéine MCL-1, protéine essentielle pour la survie des cellules de MM (voir p.21) ainsi que l'induction précoce des protéines pro apoptotiques BIM et NOXA (Figure 14)

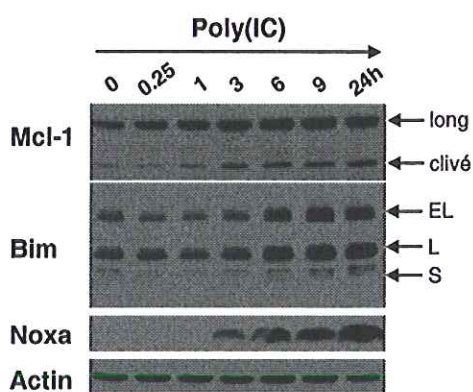


Figure 14 : Induction des protéines proapoptotiques et clivage de MCL-1 par le poly(IC)

Cinétique d'activation de protéines impliquées dans l'apoptose (Mcl-1, Bim, Noxa) par la technique du western-blot. L'actin est utilisé comme contrôle de chargement protéique.

Notre équipe a mis en évidence que le clivage précoce de MCL-1 est associé à l'induction d'apoptose après stimulation des cellules myélomateuses par le Melphalan, le Bortézomib ou encore Trail (Gomez-Bougie et al., 2004 ; Ménoret et al., 2006) et que l'induction de Noxa est requise pour l'induction d'apoptose par le Bortézomib (Gomez-Bougie et al., 2007). Bien que, dans cette étude, nous ne démontrions pas un rôle direct de ces protéines dans l'apoptose

induite par le Poly(IC), il semblerait intéressant d'étudier le rôle des MAPK dans le clivage ou l'induction de ces protéines clefs de l'apoptose.

Parallèlement, à la production d'IFN α , nous avons observé que le poly(IC) induit l'activation de la voie NF-kB dans toutes les lignées de myélome ayant un TLR3 fonctionnel. Bien qu'une forte et précoce activation de cette voie soit observée après stimulation par le poly(IC), la voie NF-kB n'inhibe pas l'apoptose induite par l'IFN α . Cependant, la lignée KMM1 ne sécrète pas d'IFN α en réponse aux poly (IC) et l'activation de la voie NF-kB a pour conséquence d'augmenter sa capacité proliférative. Ces réponses cellulaires hétérogènes pourraient en partie expliquer les résultats mitigés obtenus lors de l'unique essai clinique ayant utilisé du poly (IC) dans le traitement du MM (Durie et al., 1985). Ainsi, les PAMPs ou les DAMPs spécifiques du TLR3, tout comme ceux du TLR4 et 9, pourraient en activant la voie NF-kB, participer *in vivo* à la progression du MM.

ARTICLE 2 :

Les ligands du TLR9 contenant des liaisons phosphorothioate protègent les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par TRAIL

→ Introduction et résultats

Le Toll-like récepteur 9

Comme décrit précédemment le TLR9 cumule les propriétés immuno-stimulatrices par sa capacité à induire la sécrétion d'IFN α et l'expression des molécules de costimulation sur les CD plasmacytoïdes ou encore par sa capacité d'inducteur de prolifération et différenciation des LB (voir p.43-45). Ces propriétés ont mené de nombreuses études et essais cliniques à évaluer la capacité des ligands du TLR9 dans l'immunothérapie antitumorale (Krieg, 2007). Cependant le TLR9 est, après le TLR1, le plus fréquemment exprimé par les cellules et les lignées de MM (64% et 79%, respectivement) et, comme dans plusieurs hémopathies, l'activation de ce TLR sur les cellules myélomateuses induit de nombreux effets protumoraux. En effet, les études portées sur l'implication du TLR9 dans le MM ont mis en évidence une induction d'IL6, des MAPK ou encore de la voie NF-kB, ceci résultant en une augmentation de prolifération et de survie des cellules myélomateuses. L'activation de ces voies peut aussi induire une résistance aux drogues telle la dexaméthasone (Jego et al., 2006).

Les cellules myélomateuses expriment les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et sont induites en apoptose après stimulation par le ligand Trail. De plus, les anticorps à usage thérapeutique Mapatumumab et Lexatumumab, respectivement agonistes de TRAIL-R1 et TRAIL-R2, provoquent une forte apoptose dans les lignées et les cellules primaires de patients de MM (Ménoret et al., 2006). Cependant, certaines cellules myélomateuses sont résistantes aux processus apoptotiques induits par l'activation de ce récepteur de mort. Récemment notre équipe a montré que cette résistance est en partie médiée par l'activation de la voie NF-kB dans les lignées de MM (Romagnoli et al., 2007).

Le but de ce projet était alors d'étudier l'implication de la voie NF-kB dépendante du TLR9 dans la résistance à Trail des cellules de MM (Figure 15)

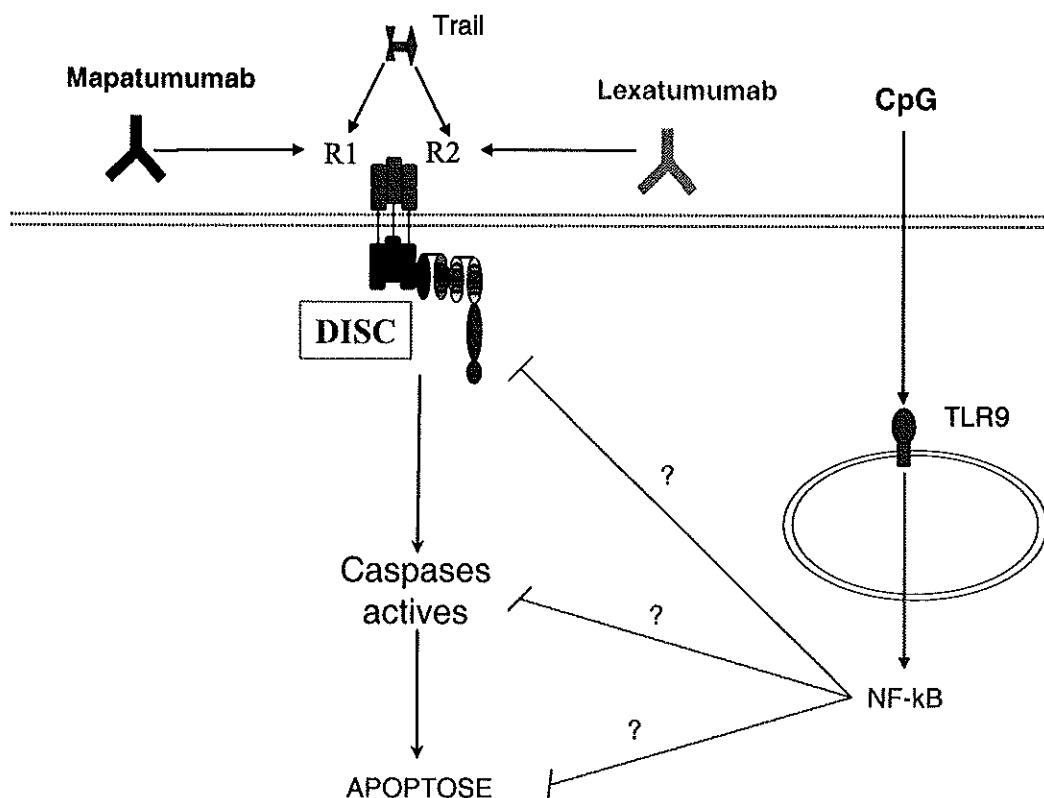


Figure 15 : Hypothèse sur l'implication du TLR9 dans la résistance à Trail

Les cellules myélomateuses expriment les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et sont induites en apoptose après stimulation par le ligand Trail et la formation du complexe DISC (death-inducing signaling complex). Les anticorps à usage thérapeutique Mapatumumab et Lexatumumab sont respectivement agonistes de TRAIL-R1 (R1) et TRAIL-R2 (R2).

Inhibition de l'apoptose induite par TRAIL-R2

Nous avons tout d'abord constaté que le CpG induit une forte inhibition de l'apoptose induite par le ligand Trail dans certaines lignées mais ceci indépendamment de l'expression basale du TLR9. Ensuite, l'utilisation des anticorps Mapatumumab et Lexatumumab nous a permis de révéler que le CpG inhibe spécifiquement l'apoptose induite via TRAIL-R2 et non TRAIL-R1. Enfin, nous avons observé que cet effet protumoral du CpG n'était pas restreint au modèle myélomateux mais était aussi effectif dans certaines tumeurs solides telles que le sein ou le colon.

Inhibition dépendante de la structure phosphorothioate des oligodeoxynucleotides (ODN)

Bien que l'activation du TLR9 ait, dans un premier temps, été décrite comme dépendante des îlots CpG de l'ADN hypométhylé bactérien ou viral, des études récentes mettent en évidence que la structure de l'ADN (groupement phosphate + sucre) ou encore sa

multimérisation sont primordiales. Afin de pouvoir étudier l'implication des ODN dans l'activation du TLR9, des modifications chimiques les rendant résistants aux nucléases ont été apportées afin qu'ils ne soient pas dégradés avant leur intégration dans la cellule. Ainsi, des modifications telles que le remplacement du groupement phosphodiester en groupement phosphorothioate (Figure 16) ou encore l'ajout d'une queue poly-G sur les ODN ont été développées. Ces modifications structurelles ont cependant induit plusieurs changements dans les modalités d'activation du TLR9, tel que la nécessité des îlots CpG (Tableau III) (Haas et al., 2008).

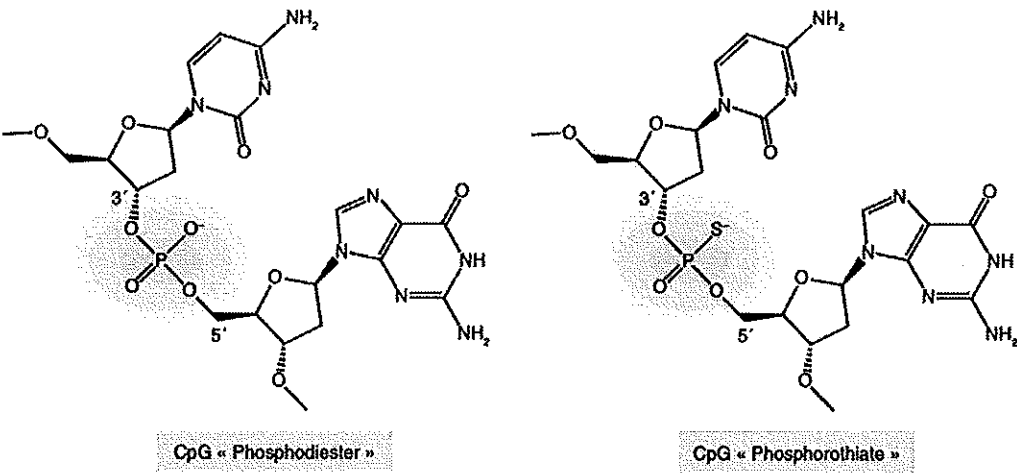


Figure 16 : Modification structurelle des ligands du TLR9
D’après Haas et al., 2008

Propriétés (<i>in vitro</i>)	Ligands du TLR9		
	Forme native (ADN Bactérien)	CpG 2006-G5	CpG 2006
- Groupement phosphate	Phosphodiester (PD)	Phosphodiester (PD)	Phosphorothioate (PO)
- Queue poly-G	non	oui	non
- Translocation endosomiale	faible	forte	forte
- Sensibilité DNase	forte	résistant	résistant
- Affinité TLR9	faible	intermédiaire	forte
- Activation TLR9	faible	forte	très forte
- Activation dépendante des motifs CpG	non	non	oui

Tableau III : Différentes propriétés des ligands du TLR9 en fonction des modifications structurelles
D’après Wagner, 2008

La grande majorité des ligands du TLR9 utilisés pour les études *in vitro* et les essais cliniques contient des modifications phosphorothioates qui permettent d'augmenter leur demi-vie de quelques minutes à plusieurs jours. Cependant, nous avons mis en évidence dans notre étude que ces modifications provoquent des effets inattendus. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'activation de TRAIL-R2 par les ODN est due à cette structure phosphorothioate et est indépendante de l'activation du TLR9.

La technique de résonance plasmonique de surface, qui permet de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées, nous a permis de démontrer qu'en s'accrochant de façon spécifique au ligand Trail ou encore au Lexatumumab, les ODN inhibent fortement l'activation de TRAIL-R2.

Phosphorothioate-Modified TLR9 Ligands Protect Cancer Cells against TRAIL-Induced Apoptosis¹

David Chiron,^{2*} Catherine Pellat-Deceunynck,^{*†} Mike Maillason,^{*‡} Régis Bataille,^{*†} and Gaëtan Jégou^{*†}

Hypomethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) target TLR9 expressed by immune cells and are currently being evaluated as adjuvants in clinical trials. However, TLR signaling can promote some tumor growth and immune evasion, such as in multiple myeloma (MM). Therefore, deciphering the effects of CpG ODNs on cancer cells will help in preventing these adverse effects and in designing future clinical trials. TLR activation induces multiple signaling pathways, notably NF- κ B that has been involved in the resistance to TRAIL. Thus, we wondered if CpG ODNs could modulate TRAIL-induced apoptosis in different models of tumors. Here, we show that TLR9⁺ (NCI-H929, NAN6, KMM1) and TLR9⁻ MM cells (MMIS) were protected by CpG ODNs against recombinant TRAIL-induced apoptosis. By using two fully human, agonist mAbs directed against TRAIL receptors DR4 and DR5 (mapatumumab and lexatumumab, respectively), we show that the protection was restricted to DR5-induced apoptosis. Similar results were observed for two colon cancer (C45 and Colo205) and two breast cancer cell lines (HCC1569 and Cal51). The protection of CpG ODNs was mediated by its nuclease-resistant phosphorothioate backbone independent of TLR9. We next demonstrated by surface plasmon resonance that phosphorothioate-modified CpG ODNs directly bound to either TRAIL or lexatumumab and then decreased their binding to DR5. Finally, NK cell lysis of a DR5-sensitive MM cell line (NCI-H929) through TRAIL was partially inhibited by phosphorothioate-modified CpG ODNs. In conclusion, our results suggest that the phosphorothioate modification of CpG ODNs could dampen the clinical efficacy of CpG ODN-based adjuvants by altering TRAIL/ TRAIL receptor interaction. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 0000–0000.

Toll-like receptors are a family of pattern recognition receptors that sense highly conserved structures from microorganisms (1). Among the TLR family, TLR9 recognizes the DNA sugar backbone 2'-deoxyribose of hypomethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)³ from invasive bacteria and from autologous DNA of patients who suffer from systemic lupus erythematosus (2–4). CpG ODNs represent a potent activator of the immune system (5, 6). TLR9 activation in immune cells induces a cascade of events aimed at the elimination of the pathogen; TLR9 agonists activate plasmacytoid dendritic cells to secrete type I IFN and to fully mature into APCs (7). As a result, activation of innate immune effectors such as NK cells and expansion of CTLs is obtained. Additionally, CpG ODNs can generate humoral immune responses by the induction of polyclonal B cell proliferation and Ig synthesis (8). This immune cascade has prompted the development of synthetic TLR9 ligands that could be used to enhance the immune response in a tumor environment, which could

translate into a clinical benefit for patients with cancer. Indeed, TLR9 agonists are currently being evaluated as an adjuvant in many clinical trials of solid cancer (colon cancer, breast cancer, melanoma, non-small cell lung cancer, glioblastoma) and hematological malignancies (B cell chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma) (9).

However, although TLR expression was initially thought to be restricted to the cells of the immune system, recent studies suggest that many different tumor cell types express TLR9 and that TLR9 signaling promotes tumor growth, survival, and immune evasion (10). B cell neoplasms such as multiple myeloma (MM; a plasma cell malignancy), lymphocytic leukemia, and lymphomas mirror their normal precursors and respond to TLR9 ligands (8). Indeed, CpG ODNs can promote both MM cell proliferation and drug resistance through an autocrine secretion of IL-6, as well as proliferation of B cell chronic lymphocytic leukemia cells from patients either with progressive diseases or bearing unmutated Ig variable H chain genes (11–13). Additionally, many solid tumor cell types do express TLR9 and are responsive to CpG ODNs (e.g., colon, prostate, breast, melanoma, lung) (14).

TLR signaling induces Erk1/2 MAP kinase and NF- κ B activation in MM and colon cells that could contribute to malignant transformation (15). NF- κ B activation, either through mutations or interactions with the microenvironment, has been involved in the progression of many cancers, including MM (16). As we previously published, resistance of MM cells to TRAIL can occur through the activation of the NF- κ B pathway (17). TRAIL is a member of the TNF ligand superfamily, expressed and used by immune effector cells such as NK, NKT, and CD8 T cells to eliminate tumor cells (18). TRAIL induces the death of cancer cells but spares normal cells; therefore, TRAIL-induced apoptosis could be involved in the immune surveillance of cancers (19). Furthermore, TRAIL resistance has been observed in many cancer cell types and

*INSERM, Unité 892, Nantes, France; [†]Université de Nantes, Unité Mixte de Recherche S892, Nantes, France; and [‡]Plateforme Interactome et Puces à Protéines Ouest Genopole, Nantes, France

Received for publication May 12, 2009. Accepted for publication July 22, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This study was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (Équipe Labélisée 2008).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. David Chiron, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Centre de Recherches en Cancérologie Nantes Angers, 8, Quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: david.chiron@etu.univ-nantes.fr

³ Abbreviations used in this paper: CpG ODN, CpG oligodeoxynucleotide; HMCL, human myeloma cell line; MM, multiple myeloma; SPR, surface plasmon resonance.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

various mechanisms including translocation of NF- κ B, and activation of PKB/Akt or Erk MAPK seem to be involved (17, 20, 21). These pathways can be induced by TLRs, including TLR9 (22–24), therefore jeopardizing the efficiency of the therapeutic use of TLR9 ligands. The aim of this work was to study the effects of CpG ODNs on TRAIL-induced cell death of tumors by using MM, colon, and breast cancer cell lines.

Materials and Methods

Human myeloma cell lines (HMCLs), colon cancer cell lines, and breast cancer cell lines

The HMCL named MDN has been established in our laboratory and is cultured in the presence of 3 ng/ml rIL-6 (Novartis Pharmaceuticals). The KMM1 HMCL was provided by Dr. T. Otsuki (Okayama, Japan) and the Karpas 620 cell line by Dr. A. Karpas (Cambridge, U.K.). The MM.1S HMCL was provided by Dr. S. T. Rosen (Chicago, IL). NCI-H929 was purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. C45 was established in our laboratory from an ascites of a stage IV colon cancer patient. The colon cancer cell line Colo205 and the breast cancer cell line HCC1569 were obtained from the American Type Culture Collection. Cal51 was provided by Dr. J.-L. Merlin (Nancy, France). All cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS, 2 mM glutamine, and antibiotics.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted, treated by DNase, and reverse transcribed as previously described (11). cDNA concentration was quantified by a spectrophotometer (NanoDrop) before amplification by PCR (35 cycles) using the following specific primers for TLR9 (Sigma-Genosys): 5'-TTATGGACTTCC TGCTGGAGGTGC-3' and 5'-CTGCGTTTTGTGCGAAGACCA-3'.

Cell viability assay

Cell lines (10^5 cells/200 μ l) were cultured with or without mapatumumab, lexatumumab, recombinant human TRAIL, or agonist Fas Ab for 48 h in the presence or absence of CpG ODN. Cell viability was determined with PE-conjugated Apo2.7 labeling and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Western Blotting

Cells (10^6 cells/ml) were serum-starved for 18 h, treated or not, harvested, and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 0.5% Nonidet P-40). Protein concentration was measured by using bicinchoninic acid (BCA protein assay; Pierce) and 90 μ g was separated by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Signals were detected by standard techniques using ECL detection (Roche).

Abs, cytokines, and reagents

Human TRAIL-R1 or -R2 agonist mapatumumab and lexatumumab mAbs, respectively, were provided by Human Genome Sciences. Recombinant human TRAIL and recombinant TRAIL receptors DR4 and DR5 were purchased from R&D Systems. mAb CD95 (FAS clone CH11) was purchased from Beckman Coulter. mAbs against caspase-8, phospho-I κ B α Ser^{32/36} (5A5), and I κ B α were from Cell Signaling Technology; actin was from Chemicon International. U0126 and Bay11-7082 were purchased from Alexis. CpG ODNs were provided by Invitrogen. Bases shown in uppercase letters are phosphodiester and those in lowercase letters are phosphorothioate (nuclease resistant): the ODN 2006 sequence was 5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3', the all-phosphodiester ODN 2006-G5 sequence was 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG-3', and the TLR9 inhibitory ODN sequence was 5'-tttagcttaggttaggttaggg-3'.

Surface plasmon resonance (SPR)

Experiments were conducted at 25°C on a BIAcore 3000 instrument. For binding analysis, either 200 resonance units of DR4 and DR5, 2000 resonance units of recombinant TRAIL, or 8000 resonance units of lexatumumab were covalently coupled to a research grade CM5 chip (GE Healthcare) by amine coupling as recommended by the manufacturer. All measurements were baseline-corrected by subtracting the values obtained from the analyte being injected over a control flow cell. Binding of mapatumumab (3 μ g/ml), lexatumumab (3 μ g/ml), or recombinant TRAIL (2 μ g/ml) either alone or preincubated for 60 min with CpG ODN (0.78–12.5

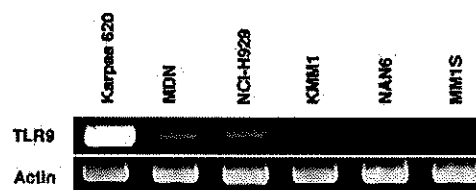


FIGURE 1. TLR9 is expressed by HMCLs. Expression of TLR9 mRNA in six HMCLs analyzed by RT-PCR as described in *Materials and Methods*.

μ g/ml) was assayed for 2 min at a flow rate of 40 μ l/min on DR4- or DR5-immobilized chips. Dissociation was monitored for 3 min and then the surface was regenerated by injection of 10 mM glycine (pH 2.0). Measurement of the direct binding of CpG ODN to recombinant TRAIL-immobilized or lexatumumab-immobilized chips was performed as follows. Five concentrations of CpG ODN ranging from 3.25 to 52 nM for CpG ODN injected over a LexA-immobilized chip and from 103 nM to 3.3 μ M for CpG ODN injected over a recombinant TRAIL-immobilized chip were titrated from low to high concentrations in a single-cycle mode for 3 min at 40 μ l/min. Dissociation was monitored for 4 min. Data were analyzed using the BiaEval 4.1 software (Biacore).

NK cell expansion and cytotoxic assays

Assessment of NK cell expansion was performed as previously described (25). Briefly, PBMCs from normal volunteers were purified by Ficoll-Hypaque centrifugation and cocultured with irradiated EBV-transformed B lymphoblastoid cells in 8% human serum and in the presence of IL-2 for 4–6 wk. The proportion of CD3⁺/CD16⁺ NK cells increased to >50% during the culture. Expanded CD3⁺/CD16⁺ NK cells were then purified using anti-CD16 microbeads (Milenyi Biotec) and the cytotoxic assay was performed. ⁵¹Cr-labeled target cells were incubated for 15 min with CpG ODN, and cytotoxic assays were performed in 96-well V-bottom plates with 3000 ⁵¹Cr-labeled target cells in 200 μ l (4 h). The percentage of specific cytotoxicity was determined as follows: (experimental release – spontaneous release)/(total release – spontaneous release) $\times$ 100.

Results

CpG ODN inhibits the apoptosis of HMCLs induced by TRAIL through DR5

We first determined the expression of TLR9 on a panel of six representative HMCLs. As shown in Fig. 1, we detected TLR9 at various levels in the HMCLs KARPAS 620, MDN, NCI-H929, NAN6, and KMM1, but not in MM1S. Incubation of KARPAS 620, MDN, and KMM1 with CpG ODN did not modify the apoptosis induced by 50 ng/ml human recombinant TRAIL. On the contrary, CpG ODN decreased the apoptosis of NCI-H929, NAN6, and, more surprisingly, TLR9-negative MM1S cells (mean of reduction, 53 ± 3 , 84 ± 6 , and $62 \pm 12\%$, respectively) (see Fig. 2A and Table I). The effect of CpG ODN on TRAIL-induced apoptosis was dose dependent as shown in Fig. 2B, and the inhibition of apoptosis was obtained over a wide range of TRAIL concentrations as shown in Fig. 2C for NCI-H929. It is known that TRAIL induces apoptosis through the activation of two receptors, TRAIL-R1 (DR4) and/or TRAIL-R2 (DR5). To better characterize the mechanism of apoptosis inhibition observed with CpG ODN, we replaced human recombinant TRAIL with mapatumumab and lexatumumab, two agonist Abs directed against DR4 or DR5, respectively (26, 27). As summarized in Table I for all six HMCLs and illustrated in Fig. 3A, HMCLs were either solely sensitive through DR4 (KARPAS 620), DR5 (NCI-H929, NAN6, and MM1S), or both (MDN, KMM1). Strikingly, CpG ODN completely blocked the apoptosis induced by lexatumumab in MDN, NCI-H929, KMM1, NAN6, and MM1S, but not that induced by mapatumumab. The effect of CpG ODN on DR5-induced apoptosis was dose dependent, as shown in Fig. 3B. No inhibition of mapatumumab-induced apoptosis was observed in MDN even at

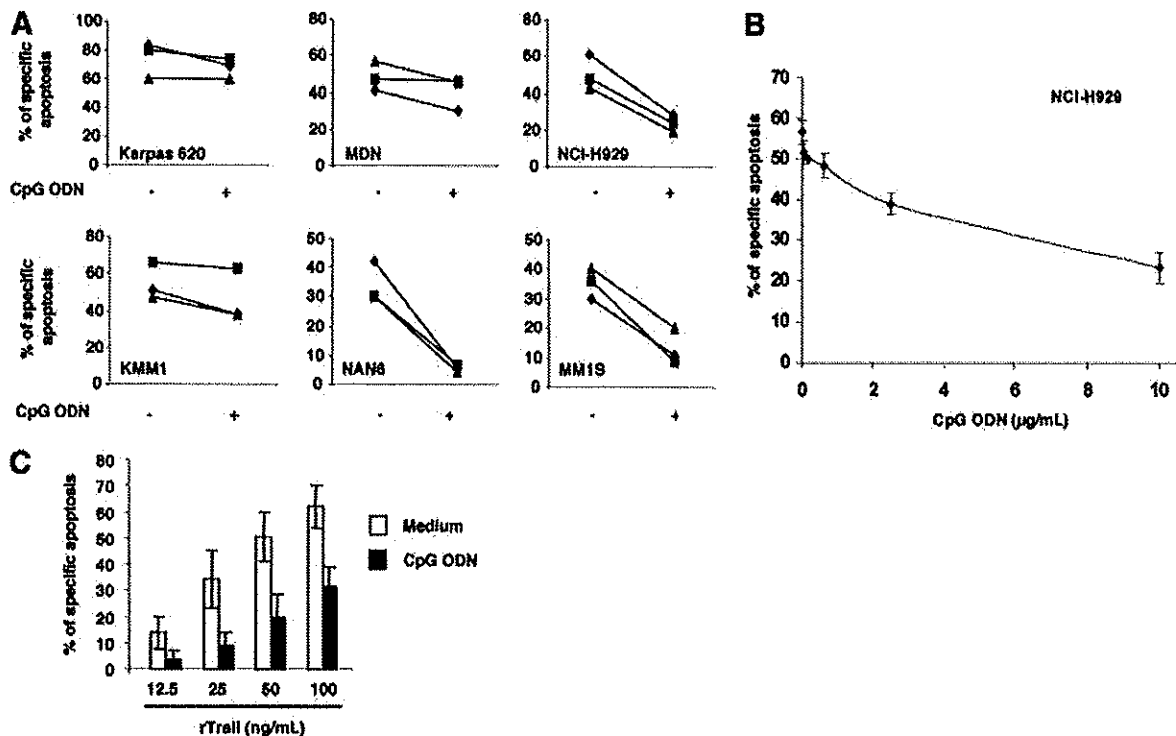


FIGURE 2. CpG ODN inhibits the apoptosis of HMCLs induced by human recombinant TRAIL. **A**, Percentage of cell death of KARPAS 620, MDN, NCI-H929, KMM1, NAN6, and MM1S induced by human recombinant TRAIL (50 ng/ml) in the absence or presence of CpG ODN (5 μ g/ml) determined at day 2 by Apo2.7 staining. Three independent experiments are shown for each cell line. **B**, Percentage of cell death of NCI-H929 induced by human recombinant TRAIL (50 ng/ml) in the presence of increasing doses of CpG ODN (0.039, 0.156, 0.625, 2.5, and 10 μ g/ml) and determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown. **C**, Percentage of cell death of NCI-H929 induced by increasing doses of human recombinant TRAIL (12.5, 25, 50, and 100 ng/ml) in the absence or presence of CpG ODN (5 μ g/ml) determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown.

suboptimal concentrations of Ab (Fig. 3C). As shown in Fig. 3D, the cleavage of caspase-8 in NCI-H929 induced by lexatumumab was blocked by the addition of CpG ODN to the culture. This result suggested that CpG ODN could act at the initiation of the cell death signaling pathway.

As Fas is a member of the TNF ligand superfamily that also induces apoptosis of tumor cells, we wondered whether CpG ODN could also inhibit its function. NCI-H929 was Fas-resistant, but KMM1 and MDN were Fas-sensitive (Fig. 3E and data not shown). Stimulation of KMM1 or MDN by an anti-Fas mAb agonist induced a dose-dependent apoptosis that was not inhibited by CpG ODN. Taken together, our results suggested that CpG ODN specifically inhibited TRAIL-induced apoptosis through DR5.

CpG ODN inhibits the apoptosis of colon and breast cancer cell lines induced by TRAIL through DR5

As CpG ODNs are intended for use in both solid and hematologic cancer patients, we also performed the experiment on two colon

cancer cell lines, C45 and Colo205 (Fig. 4), and two breast cancer cell lines, HCC1569 and Cal51 (data not shown). Both colon cancer cell lines express TLR9 (Fig. 4A), and CpG ODN decreased the apoptosis of the Colo205 line induced by recombinant human TRAIL (mean of reduction, $60 \pm 14\%$). The colon and breast cancer cell lines were only sensitive to DR5 stimulation. As illustrated in Fig. 4B for Colo205, addition of CpG ODN decreased the lexatumumab-induced apoptosis, either partially in Colo205, C45, and HCC1569 (mean of reduction, $47 \pm 15\%$, $n = 3$; 60% , $n = 2$; and 74% , $n = 2$, respectively) or completely in Cal51 (mean of reduction, 97% , $n = 2$).

The blocking of lexatumumab-induced apoptosis depends on the phosphorothioate modification of CpG ODN

Synthetic CpG ODNs that are currently used in vitro and in clinical investigations bear a nuclease-resistant phosphorothioate backbone that increases their half-life. In contrast, the phosphodiester

Table I. CpG inhibition of TRAIL-induced apoptosis does not correlate with TLR9 expression^a

	TLR9 Expression	rhTRAIL Sensitivity (% Apo2.7)	CpG Inhibition of rhTRAIL Apoptosis (%)	Mapatumumab Sensitivity (% Apo2.7)	Lexatumumab Sensitivity (% Apo2.7)
K620	++	74.33 ± 12.5	8.52	81.00 ± 3.61	1.00 ± 1.00
MDN	+	48.33 ± 8.08	16.55	78.00 ± 4.36	69.00 ± 11.14
NCI-H929	+	50.67 ± 9.29	53.28	11.67 ± 2.08	48.67 ± 4.93
KMM1	+/-	54.67 ± 10.02	15.24	55.67 ± 9.71	32.67 ± 3.79
NAN6	+/-	34.00 ± 6.94	84.31	3.00 ± 1.73	34.33 ± 10.21
MM.1S	-	35.33 ± 5.03	62.26	13.00 ± 2.65	40.00 ± 8.66

^a TLR9 expression was determined by PCR. Survival of six HMCLs in the presence of rhTRAIL (50 ng/ml), mapatumumab, or lexatumumab (6 μ g/ml) was determined by Apo2.7 staining at day 2. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown. rhTRAIL, recombinant human TRAIL.

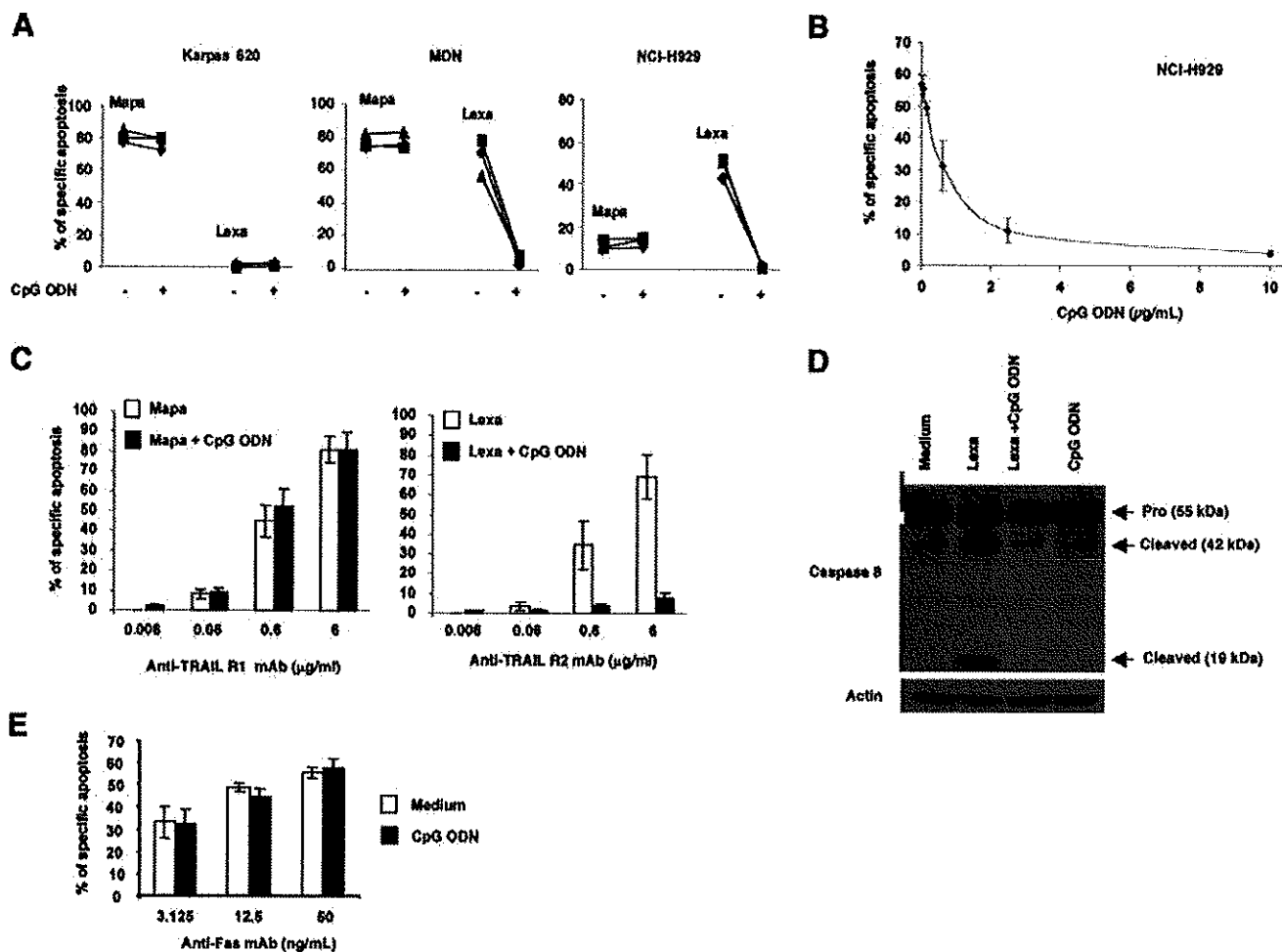
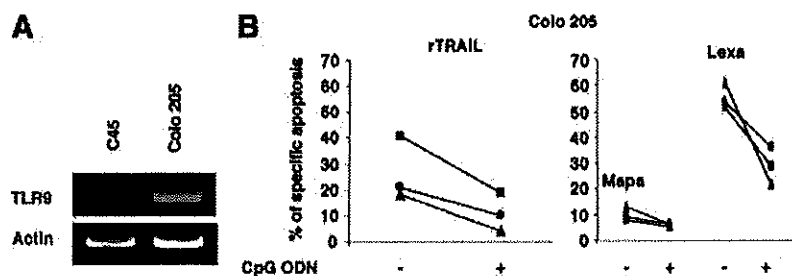


FIGURE 3. CpG ODN inhibits the apoptosis induced by an agonist Ab directed against DR5. **A**, Percentage of cell death of KARPAS 620, MDN, and NCI-H929 induced by either mapatumumab or lexatumumab ($6 \mu\text{g/mL}$) in the absence or presence of CpG ODN ($5 \mu\text{g/mL}$) determined at day 2 by Apo2.7 staining. Three independent experiments are shown for each cell line. **B**, Percentage of cell death of NCI-H929 induced by lexatumumab ($6 \mu\text{g/mL}$) in the presence of increasing doses of CpG ODN (0.039, 0.156, 0.625, 2.5, and $10 \mu\text{g/mL}$) and determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown. **C**, Percentage of cell death of MDN induced by increasing doses of either mapatumumab or lexatumumab in the presence of CpG ODN ($5 \mu\text{g/mL}$) and determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown. **D**, Expression of caspase 8 (full-length and cleaved form) determined by immunoblot analysis in NCI-H929 treated by $6 \mu\text{g/mL}$ lexatumumab, $5 \mu\text{g/mL}$ CpG ODN, or both. Actin was used as a protein loading control. **E**, Percentage of cell death of KMM1 induced by increasing doses of anti-Fas Ab (clone CH11) in the presence of CpG ODN ($5 \mu\text{g/mL}$) and determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown.

bond of native DNA is highly sensitive to degradation by endonucleases. Both forms of CpG ODNs stimulate TLR9 and induce immunostimulatory activities. To determine whether the native form of CpG ODN was as potent as the synthetic form in the inhibition of apoptosis, we measured the TRAIL-induced apoptosis in the presence of either phosphorothioate-modified CpG ODN (CpG 2006) or a synthetic phosphodiester CpG ODN (CpG 2006-G5). The latter sequence had a higher capacity to be internalized and to stimulate TLR9 than did native CpG ODN due to the addition of a 3' poly-G

string. As shown in Fig. 5, the phosphodiester CpG ODN did not inhibit the lexatumumab-induced apoptosis, suggesting that the protection was TLR9-independent. Furthermore, addition of a non-CpG ODN sequence designed to compete with the binding of CpG ODN 2006 to its receptor and that lacks TLR9 stimulatory capacity totally abrogated the apoptosis. As this CpG ODN also has a phosphorothioate backbone, our data suggest that the protection of tumors cells against TRAIL depends on the phosphorothioate modification of CpG ODN rather than on TLR9 stimulation.

FIGURE 4. CpG ODN inhibits the apoptosis of colon cell lines induced by human recombinant TRAIL and by an agonist Ab directed against DR5. **A**, Expression of TLR9 mRNA in two colon cancer cell lines analyzed by RT-PCR as described in *Materials and Methods*. **B**, Percentage of cell death of Colo205 induced by human recombinant TRAIL (50 ng/mL), mapatumumab ($6 \mu\text{g/mL}$), or lexatumumab ($6 \mu\text{g/mL}$) in the absence or presence of CpG ODN ($5 \mu\text{g/mL}$) determined at day 2 by Apo2.7 staining. Three independent experiments are shown.



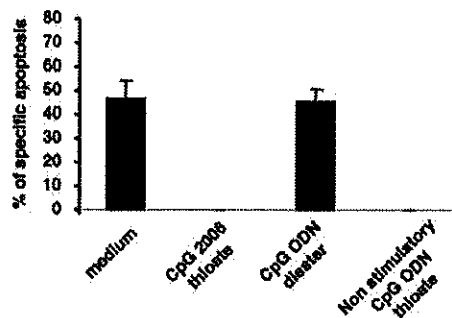


FIGURE 5. The phosphorothioate modification of CpG ODNs is responsible for the inhibition of the TRAIL-induced apoptosis. Percentage of cell death of NCI-H929 induced by lexatumumab (6 μ g/ml) in the presence of 5 μ g/ml CpG ODN 2006 with phosphorothioate modifications, phosphodiester CpG ODN 2006-G5, or a nonstimulatory TLR9 ODN sequence with phosphorothioate modification. Survival was determined at day 2 by Apo2.7 staining. The mean values $\pm$ SD of three independent experiments are shown.

Phosphorothioate-modified CpG ODN inhibits the binding of lexatumumab to DR5

It has been previously shown that the internalization of DR4 and DR5 occurs within minutes of TRAIL binding (28). In agreement, we observed a decrease of DR5 cell surface staining in the presence of lexatumumab (data not shown). Surprisingly, the addition of phosphorothioate-modified CpG ODN blocked the disappearance of DR5 from the cell surface. This result suggested that phosphorothioate-modified CpG ODN could perturb the interaction of TRAIL or anti-DR4/DR5 mAbs with their respective receptors in a TLR9-independent manner.

To test this hypothesis, we immobilized recombinant DR4 or DR5 on an SPR chip surface and observed the binding of either mapatumumab or lexatumumab, respectively, in the presence or absence of CpG ODN. DR4 and DR5 formed a saturated complex with mapatumumab and lexatumumab mAbs, respectively (Figs. 6, A and B). In agreement with our hypothesis, incubation of phosphorothioate-modified CpG ODN with DR5 (Fig. 6A), but not with DR4 (Fig. 6B), inhibits the interaction with the corresponding Ab in a dose-dependent manner. Furthermore, the binding of recombinant TRAIL to DR5 was also inhibited by phosphorothioate-modified CpG ODN in a dose-dependent manner (Fig. 6C). Conversely, phosphodiester CpG ODN did not inhibit these interactions (supplemental Fig. S1).⁴

Taken together, these results suggested that phosphorothioate-modified CpG ODN could directly bind to DR5, recombinant human TRAIL, or lexatumumab. Surprisingly, no direct binding of CpG ODNs to DR5 was observed (data not shown). In contrast, we observed binding of CpG ODNs to lexatumumab when it was immobilized on an SPR chip surface, but not to mapatumumab (Fig. 6D). Similarly, binding of CpG ODNs to recombinant human TRAIL immobilized on an SPR chip surface was also observed (Fig. 6E).

Phosphorothioate-modified CpG ODN inhibits the killing of DR5-sensitive tumor cells by NK cells

TRAIL is expressed and used by immune effector cells such as NK, NKT, and CD8 T cells to eliminate infected cells, tumor cells, or autoreactive cells (18). As NK cells have been reported to be involved in the immune surveillance of cancer, we wondered if CpG ODN could alter their cytotoxicity toward tumor cells. To this

end, we incubated NCI-H929 with or without a phosphorothioate-modified CpG ODN and then measured the cytotoxicity induced by NK cells. As shown in Fig. 7A, the lysis of NCI-H929 by NK cells was significantly reduced in the presence of CpG ODN (mean of lysis reduction at an E:T ratio of 1:15, $45 \pm 23\%$, $n = 3$). A similar result was obtained for another DR5-sensitive cell line (Colo205) but not with the doubly DR4- and DR5-sensitive MDN cell line (data not shown). Finally, neutralization of TRAIL on NK cells by a blocking Ab partially decreased the cytotoxicity of NK cells to the same level as that obtained upon CpG ODN incubation (mean of lysis reduction at E:T ratio of 1:15, $49 \pm 1\%$, $n = 3$; Fig. 7B). These data suggested that the component of NK cell cytotoxicity involving TRAIL was inhibited by CpG ODN.

Discussion

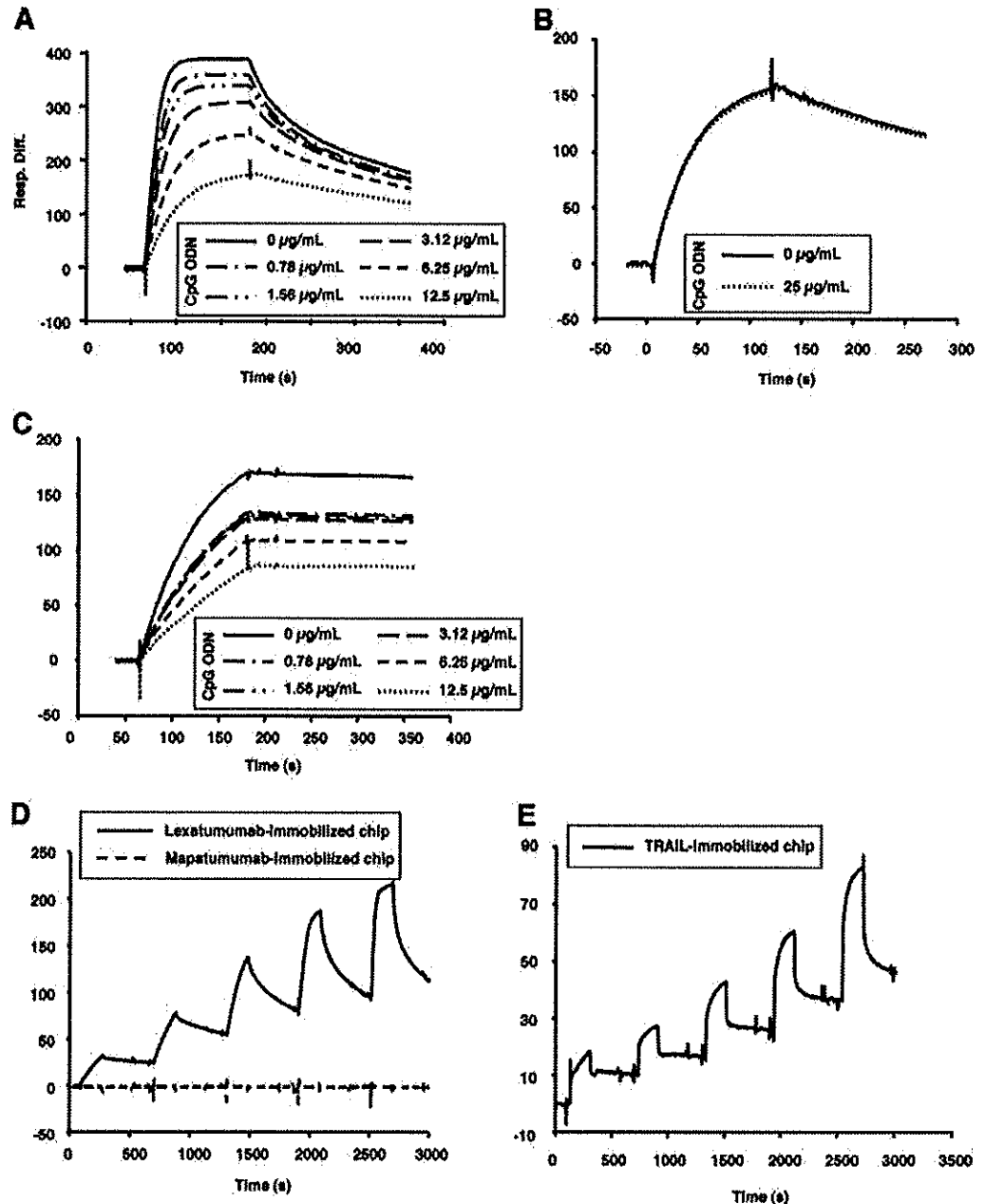
TLRs are expressed by cells of the immune system, as well as by tumor cells of various origins. Although biological consequences of TLR activation have been extensively studied in immune cells, the effect on cancer cells is largely unknown. In the present study, we aimed to determine the effect of CpG ODN on the TRAIL-induced cell death of cancer cells. We show that a synthetic phosphorothioate-modified CpG ODN inhibits the killing of various DR5-sensitive tumor cells through a TLR9-independent binding to TRAIL or to lexatumumab. This inhibition reduces the cytotoxic activity of NK cells through TRAIL and could therefore dampen the clinical efficacy of CpG ODN-based adjuvants.

Although synthetic CpG ODN sequences have been widely used in vitro to decipher the TLR9 signaling pathway and to stimulate the immune system, their exact mechanism of action has only been recently uncovered (2, 29). Indeed, TLR9 recognizes natural phosphodiester DNA through the DNA sugar backbone 2'-deoxyribose rather than through CpG motifs, as thought so far. In contrast, phosphorothioate-modified synthetic ODNs, despite strong binding, are dependent on CpG motifs to activate TLR9. Our results extend the structure-dependent function of phosphorothioate-modified ODNs in the cell death pathway.

So far, known effects of CpG ODN on cell death resistance have involved TLR9 stimulation and Erk1/2 or NF- κ B signaling pathway activation. Additionally, it has been shown that NF- κ B activation contributed to LPS/TLR4-induced apoptosis resistance of lung cancer cells against TRAIL (30). We also observed NF- κ B activation through phosphorylation of I κ B in the presence of CpG ODN; however, inhibition of either NF- κ B or Erk1/2 activation by specific inhibitors did not reverse the effects of CpG ODNs (supplemental Fig. S2). Therefore, the survival effect was not mediated by these previously described pathways. On the contrary, despite activation of TLR9 signaling by classical synthetic CpG ODNs, the mechanism of survival was TLR9-independent, as it was also observed in a TLR9⁻ cell line and with a sequence designed to act as an antagonist of TLR9. Furthermore, we showed that the phosphorothioate modification of the CpG ODN, necessary for the nuclease resistance of the sequence, conferred the inhibitory capacity. In agreement with this finding, it has been previously shown that the phosphorothioate backbone of ODN sequences strongly increased nonspecific binding to various proteins. In particular, phosphorothioate sequences inhibit basic fibroblast growth factor binding to its receptor (31, 32). This stickiness of phosphorothioate sequences is also observed in the binding to TLR9, as a phosphorothioate-modified sequence, regardless of the bases, has a higher TLR9 affinity than does the same phosphodiester sequence (29). Taken together, these data imply that natural DNA sequences from bacteria would trigger TLR9 signaling in tumors and immune cells, leading to activation. On the other hand, synthetic phosphorothioate CpG ODNs would both mediate the previous effects and induce TLR9-independent phenomena such as receptor-ligand

⁴ The online version of this article contains supplemental material.

FIGURE 6. Phosphorothioate-modified CpG ODN inhibits the binding of recombinant human TRAIL and of lexatumumab to DR5. **A**, SPR analysis of lexatumumab binding to DR5 in the presence or absence of increasing doses of CpG ODNs. CpG ODNs were perfused over a DR5-immobilized chip for 2 min at a flow rate of 40 μ l/min and the resonance changes were recorded. **B**, SPR analysis of mapatumumab binding to DR4 in the presence or absence of CpG ODNs (25 μ g/ml). **C**, SPR analysis of recombinant TRAIL binding to DR5 in the presence or absence of increasing doses of CpG ODNs. **D**, SPR analysis of binding activity of increasing concentrations of CpG ODNs on either mapatumumab- or lexatumumab-immobilized chips. **E**, SPR analysis of binding activity of increasing concentrations of CpG ODNs on a recombinant TRAIL-immobilized chip.



binding inhibition. This phenomenon could be extended to the inhibition of virus entry, as it has been recently shown that human cytomegalovirus, hepatitis C virus, and HIV entry are blocked by phos-

phorothioate-modified ODNs, regardless of CpG motifs (33–36). One could therefore take advantage of this to design antiviral vaccines that target virus entry.

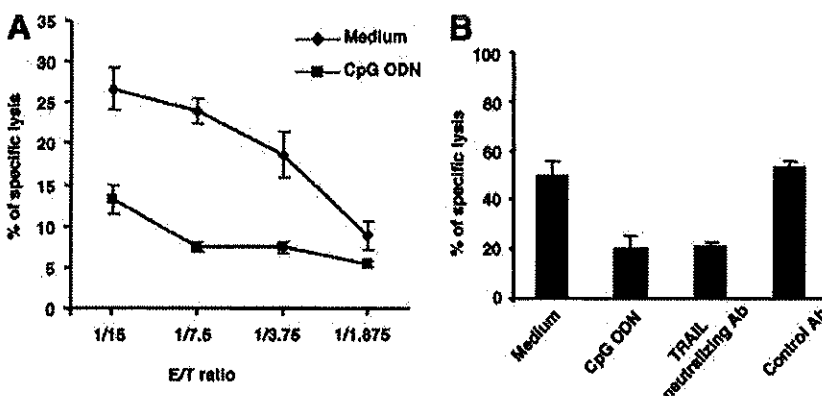


FIGURE 7. Phosphorothioate-modified CpG ODN inhibits the killing of the HMCL NCI-H929 by NK cells. **A**, Cytotoxicity of NK cells against NCI-H929 in the absence or presence of 5 μ g/ml CpG ODN. Data shown are means $\pm$ SD of one experiment performed in triplicate and are representative of three independent experiments. **B**, Cytotoxicity of NK cells against NCI-H929 was determined in the presence of 5 μ g/ml CpG ODN, 5 μ g/ml azide-free TRAIL-neutralizing Ab, or an isotype control Ab. Data shown are means $\pm$ SD of one experiment performed in triplicate and are representative of three independent experiments.

Given our present finding, it is likely that the capacity of phosphorothioate CpG ODNs to inhibit TRAIL-induced apoptosis could have an influence on the outcome of previously published studies. Therefore, interpretation of experiments should be done with caution and would better be completed with phosphodiester sequences stabilized by 3' poly-G extensions that confer a nanoparticle-like structure (37).

Regarding the inhibition of TRAIL-induced apoptosis, we observed a decrease in the cytotoxicity mediated by NK cells. This result suggests that cells of the immune system could be partially dampened in their function of tumor surveillance, particularly in the case of CpG peritumoral injection. Fortunately, note that the lysis machinery of immune effector cells is not restricted to TRAIL and therefore could be protected from a major shutdown.

In conclusion, our results confirm the need for an encapsulation of CpG ODNs that would avoid unspecific binding with unexpected consequences. Finally, these data increase our understanding of the function of CpG ODNs in tumors.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
- Haas, T., J. Metzger, F. Schmitz, A. Heit, T. Muller, E. Latz, and H. Wagner. 2008. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28: 315–323.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
- Marshak-Rothstein, A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 823–835.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987–995.
- Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709–760.
- Gilliet, M., W. Cao, and Y. J. Liu. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 594–606.
- Chiron, D., I. Bekeredjian-Ding, C. Pellat-Deceunynck, R. Bataille, and G. Jego. 2008. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 112: 2205–2213.
- Krieg, A. M. 2008. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 27: 161–167.
- Huang, B., J. Zhao, J. C. Unkeless, Z. H. Feng, and H. Xiong. 2008. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 27: 218–224.
- Jego, G., R. Bataille, A. Geffroy-Luseau, G. Descamps, and C. Pellat-Deceunynck. 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20: 1130–1137.
- Bohnhorst, J., T. Rasmussen, S. H. Moen, M. Flottum, L. Knudsen, M. Borset, T. Espevik, and A. Sundan. 2006. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 20: 1138–1144.
- Longo, P. G., L. Laurenti, S. Gobessi, A. Petlickovski, M. Pelosi, P. Chiusolo, S. Sica, G. Leone, and D. G. Efremov. 2007. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 21: 110–120.
- Yu, L., and S. Chen. 2008. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 1271–1278.
- Chiron, D., C. Pellat-Deceunynck, M. Amiot, R. Bataille, and G. Jego. 2009. TLR3 ligand induces NF- κ B activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN- α production. *J. Immunol.* 182: 4471–4478.
- Hideshima, T., D. Chauhan, P. Richardson, C. Mitsiades, N. Mitsiades, T. Hayashi, N. Munshi, L. Dang, A. Castro, V. Palombella, et al. 2002. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277: 16639–16647.
- Romagnoli, M., G. Desplanches, S. Maiga, S. Legouill, M. Dreano, R. Bataille, and S. Barille-Nion. 2007. Canonical nuclear factor κ B pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin. Cancer Res.* 13: 6010–6018.
- Johnstone, R. W., A. J. Frew, and M. J. Smyth. 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8: 782–798.
- Terme, M., E. Ullrich, N. F. Delahaye, N. Chaput, and L. Zitvogel. 2008. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* 9: 486–494.
- Shankar, E., U. Sivaprasad, and A. Basu. 2008. Protein kinase C ϵ confers resistance of MCF-7 cells to TRAIL by Akt-dependent activation of Hdm2 and down-regulation of p53. *Oncogene* 27: 3957–3966.
- Soderstrom, T. S., M. Poukkula, T. H. Holmstrom, K. M. Heiskanen, and J. E. Eriksson. 2002. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J. Immunol.* 169: 2851–2860.
- Bekeredjian-Ding, I., A. Doster, M. Schiller, P. Heyder, H. M. Lorenz, B. Schraven, U. Bommhardt, and K. Heeg. 2008. TLR9-activating DNA up-regulates ZAP70 via sustained PKB induction in IgM⁺ B cells. *J. Immunol.* 181: 8267–8277.
- Osawa, Y., S. Iho, R. Takauji, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, S. Horiguchi, Y. Urasaki, T. Matsuki, and S. Fujieda. 2006. Collaborative action of NF- κ B and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN- α and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 177: 4841–4852.
- Liu, J., A. Hamrouni, D. Wolowicz, V. Coiteux, K. Kuliczowski, D. Hetuin, A. Saudemont, and B. Quesnel. 2007. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110: 296–304.
- Clemenceau, B., G. Gallot, R. Vivien, J. Gaschet, M. Campone, and H. Vie. 2006. Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy. *J. Immunother.* 29: 53–60.
- Pukac, L., P. Kanakaraj, R. Humphreys, R. Alderson, M. Bloom, C. Sung, T. Riccobene, R. Johnson, M. Fiscella, A. Mahoney, et al. 2005. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 92: 1430–1441.
- Menoret, E., P. Gomez-Bougie, A. Geffroy-Luseau, S. Daniels, P. Moreau, S. Le Gouilh, J. L. Harousseau, R. Bataille, M. Amiot, and C. Pellat-Deceunynck. 2006. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 108: 1346–1352.
- Kohlhaas, S. L., A. Craxton, X. M. Sun, M. J. Pinkoski, and G. M. Cohen. 2007. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282: 12831–12841.
- Wagner, H. 2008. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 396–400.
- He, W., Q. Liu, L. Wang, W. Chen, N. Li, and X. Cao. 2007. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol. Immunol.* 44: 2850–2859.
- Fennwald, S. M., and R. F. Rando. 1995. Inhibition of high affinity basic fibroblast growth factor binding by oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 270: 21718–21721.
- Guvakova, M. A., L. A. Yakubov, I. Vlodavsky, J. L. Tonkinson, and C. A. Stein. 1995. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 270: 2620–2627.
- Schlaepfer, E., A. Audige, B. von Beust, V. Manolova, M. Weber, H. Joller, M. F. Bachmann, T. M. Kundig, and R. F. Speck. 2004. CpG oligodeoxynucleotides block human immunodeficiency virus type 1 replication in human lymphoid tissue infected ex vivo. *J. Virol.* 78: 12344–12354.
- Vaillant, A., J. M. Juteau, H. Lu, S. Liu, C. Lackman-Smith, R. Ptak, and S. Jiang. 2006. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit human immunodeficiency virus type 1 fusion by blocking gp41 core formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1393–1401.
- Luganini, A., P. Caposio, S. Landolfo, and G. Gribaudo. 2008. Phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides inhibit human cytomegalovirus replication by blocking virus entry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1111–1120.
- Matsumura, T., Z. Hu, T. Kato, M. Dreux, Y. Y. Zhang, M. Imamura, N. Higara, J. M. Juteau, F. L. Cosset, K. Chayama, A. Vaillant, and T. J. Liang. 2009. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 137: 673–681.
- Bishop, J. S., J. K. Guy-Caffey, J. O. Ojwang, S. R. Smith, M. E. Hogan, P. A. Cossum, R. F. Rando, and N. Chaudhary. 1996. Intramolecular G-quartet motifs confer nuclease resistance to a potent anti-HIV oligonucleotide. *J. Biol. Chem.* 271: 5698–5703.

→ Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'inhibition spécifique de l'apoptose induite par TRAILR2, de façon dépendante de la structure phosphorothioate et indépendante du TLR9.

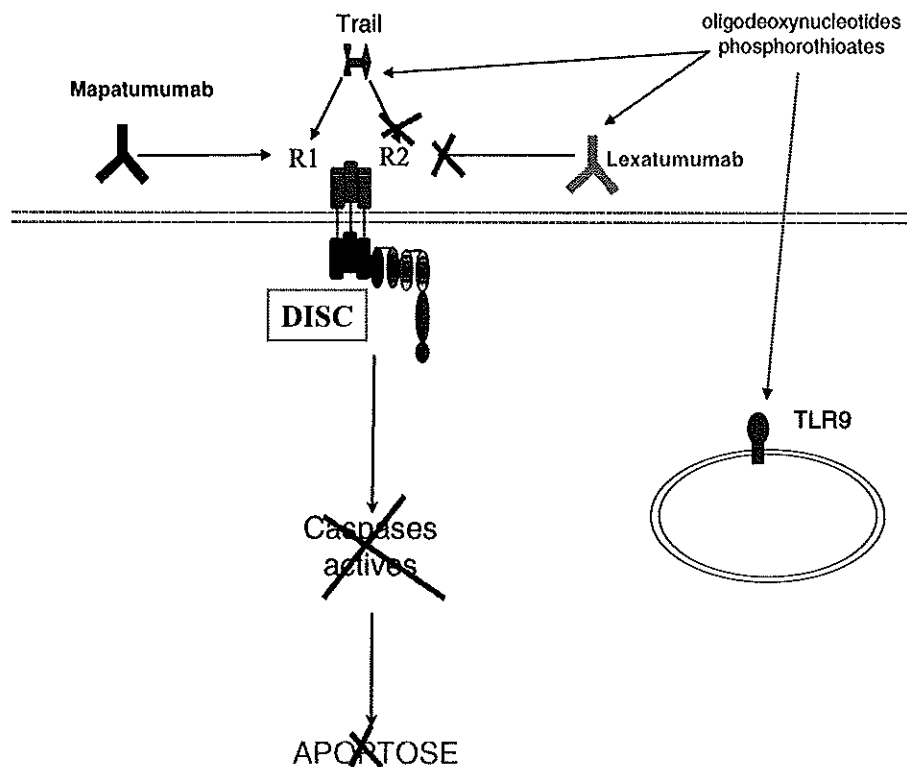


Figure 17 : Inhibition de l'apoptose induite par TRAIL-R2 par les ODN phosphorothioates

Quelques travaux ont mis en évidence des fixations non spécifiques des ODN phosphorothioates, empêchant par exemple la fixation du FGF sur son récepteur. De plus, plusieurs études ont observées des effets dépendants du phosphorothioate tels que l'inhibition de l'entrée de certains virus (CMV, HIV, Hépatite C) dans la cellule. On ne peut pas exclure que cet effet soit en partie dû à l'inhibition d'une interaction entre le virus et la cellule cible par un accrochage des ODN phosphorothioates. Il serait donc intéressant de déterminer quel mécanisme permet l'interaction de ces ODN avec d'autres protéines.

Nous avons démontré que ce mécanisme peut inhiber l'activité cytotoxique Trail dépendante des cellules NK *in vitro*. Ceci suggère que l'activité de ces cellules pourrait être diminuée particulièrement en cas d'injection péri-tumorale de ces CpG. Cependant les

conséquences de l'effet inhibiteur de ces ODN modifiés *in vivo* restent à prouver. Nous pouvons tout de même suggérer que l'utilisation des ODN phosphodiesteres avec queue poly-G ou encore l'encapsulation des ODN phosphorothioates serait préférable *in vivo* car empêcherait les effets indésirables observé *in vitro*.

DISCUSSION

Immunité, inflammation et cancer

L'inflammation est la conséquence de la réponse de l'organisme face à une agression, de type infectieux, allergique ou encore physique (dommage tissulaire), via l'activation de son système immunitaire.

Les différentes composantes du système immunitaire vont aussi participer à des mécanismes de surveillance permettant de limiter l'émergence de tumeurs. Les preuves d'une implication du système immunitaire dans l'inhibition de l'initiation ou de l'expansion tumorale se basent sur plusieurs principes fondamentaux. Ce concept est notamment porté par la susceptibilité accrue des patients immunodéprimés aux tumeurs solides et hématologiques (Swann et Smyth, 2007). D'autre part, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication des CD, des macrophages, des cellules NK ou encore des lymphocytes T dans le contrôle des cellules cancéreuses via Trail, Fas ou encore la sécrétion d'IFN (Figure 18). Ces principes sont les bases des traitements immunothérapeutiques qui ont pour but d'induire une réponse immunitaire spécifique de la tumeur.

Cependant, il est devenu évident que les réponses inflammatoires sont impliquées à différents stades du développement tumoral. En effet, plus de 20% des cancers sont liés à des infections chroniques qu'elles soient bactériennes, avec par exemple l'implication d'*Helicobacter pylori*, ou encore virales par le papilloma virus ou les virus de l'hépatite C (de Martel et al., 2009). Par ailleurs, 30% sont associés à une inflammation résultant d'une exposition répétée à des substances irritantes telles que le tabac ou encore l'amiante (Aggarwal et al., 2009). Parmi les mécanismes associés aux propriétés protumorales de la réponse immunitaire, les cytokines proinflammatoires sécrétées par les leucocytes peuvent être de puissants facteurs de croissance et de survie pour les tumeurs.

Il existe donc un équilibre entre les mécanismes anti- et protumoraux de la réponse inflammatoire dans l'initiation tumorale (Figure 18). Cependant, cette balance semble être en faveur de la progression tumorale des tumeurs déjà établies étant donné le peu de régressions tumorales observées après la seule activation du système immunitaire.

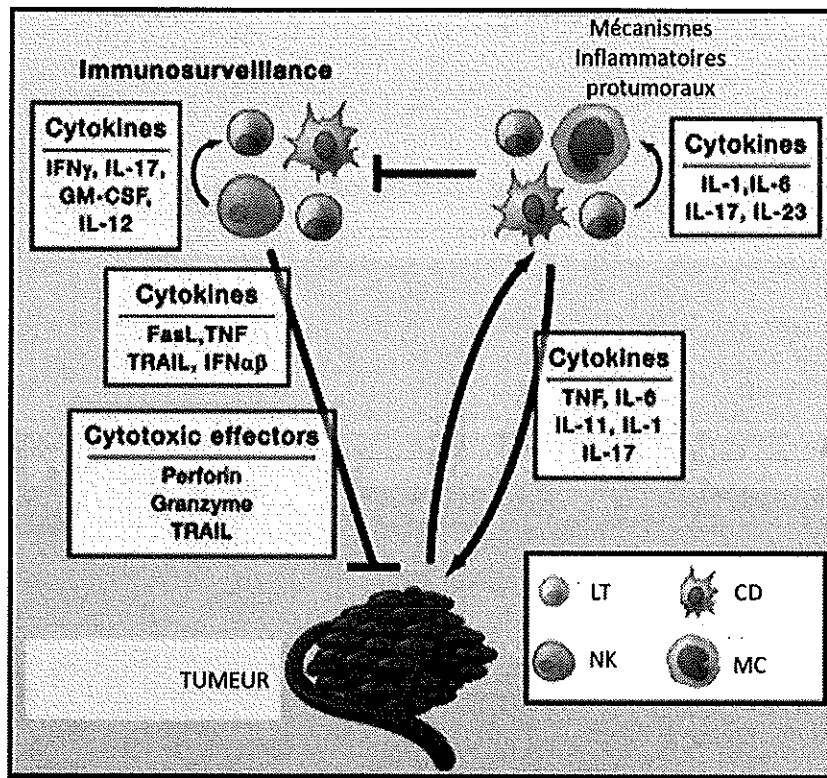


Figure 18 : Implication de la réponse inflammatoire dans le développement tumoral
D'après Grivennikov et al., 2010

LT: Lymphocytes T, CD: Cellules Dendritiques, NK: Cellules NK, MC: Macrophage

Les TLRs, précurseurs de la réponse inflammatoire, sont impliqués dans la biologie du MM

Par leur capacité à reconnaître les DAMPs et les PAMPs, les TLRs sont les précurseurs de la réponse inflammatoire. Ces récepteurs sont définis comme des « épées à double tranchant », pouvant selon les types cellulaires et le contexte induire une réponse inflammatoire favorable ou défavorable à la tumeur. En effet, en plus des cellules du système immunitaire, de nombreux types tumoraux, parmi lesquels le MM, ont conservé l'expression de ces récepteurs de l'immunité.

La niche médullaire fournit un environnement propice au développement des cellules myélomateuses via la sécrétion de nombreuses cytokines par les différentes composantes cellulaires la constituant (Figure 3). De plus, les cellules myélomateuses pourraient être chroniquement activées par divers DAMPs et PAMPs ce qui renforcerait le potentiel proinflammatoire de leur microenvironnement. En effet, l'activation de NF- κ B et la sécrétion cytokines sont des événements classiques observés dans les cellules normales après activation des TLRs et les cellules myélomateuses ont largement conservées ces réponses. Malheureusement, le facteur de transcription NF- κ B ou encore l'IL6 font partie des facteurs

de survie et de prolifération les plus importants de cette pathologie. Les effets protumoraux des TLRs semblent donc largement prédominants dans le cas du MM.

Les TLRs dans le MM : Un cercle vicieux ?

Sur la base de ces données, il est envisageable que les TLRs puissent être impliqués dans un cercle vicieux entre les cellules myélomateuses et les épisodes infectieux. En effet, la sensibilité accrue des patients aux infections, causées par un défaut de l'immunité humorale inhérent à la pathologie, mais aussi renforcées par les traitements chimiothérapeutiques, pourrait en retour être impliquée dans l'initiation, la rechute ou encore la progression du MM via l'activation des TLRs (figure 19).

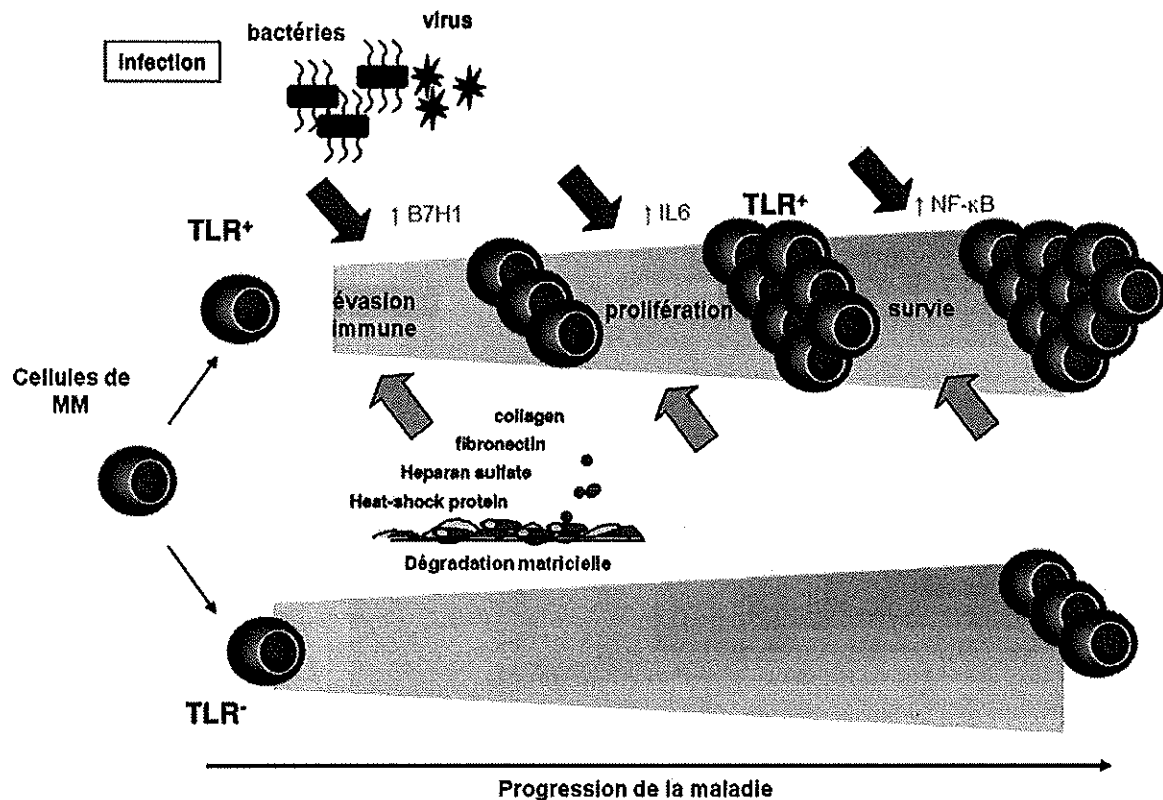


Figure 19 : Implication des TLRs dans la biologie du MM
D'après Chiron et al., 2008 (Annexe 1)

Les infections bactériennes et virales, ainsi que la libération de ligands endogènes par les tissus endommagés (ex : collagène, fibronectine, héparane sulfate, Heat-Shock Protein (HSP)) pourraient favoriser l'expansion des cellules malignes exprimant des TLRs.

Il serait intéressant d'étudier si l'activation chronique des précurseurs plasmocytaires par les TLRs induit des instabilités génomiques participant à l'initiation des anomalies primaires caractéristiques du myélome. En effet, l'activation des LB est caractérisée par de nombreuses recombinaisons et mutations génétiques nécessaires à la mise en place d'une réponse humorale optimale. Cependant, l'instabilité génomique qui en résulte a pour conséquence d'augmenter fortement le risque de translocations ou encore de mutations, hors de l'Ig, qui sont des éléments précurseurs de l'oncogenèse du MM.

Le TLR4 dans le MM

Quelques récentes études épidémiologiques mettent en évidence un lien potentiel entre certaines infections et la susceptibilité de développer un MM. Cependant, l'implication des TLRs dans l'initiation ou la progression du MM reste encore largement inconnue. Dans ce contexte, l'étude des TLRs dans le groupe de patients caractérisés par la dérégulation des protéines MAF apparaît intéressante. En effet, ce groupe caractérisé par un mauvais pronostic montre une forte expression du TLR4 sur les cellules myélomateuses. En plus du LPS, ce récepteur est potentiellement activé par de nombreux DAMPs présents dans le microenvironnement myélomateux tels que HMGB1 ou le CD138 soluble. Ensuite, l'activation du TLR4 sur les cellules myélomateuses *in vitro* provoque de nombreuses réponses protumorales. Ce modèle représente donc une opportunité d'étudier l'implication des TLRs dans l'oncogenèse du MM, du diagnostic jusqu'au stade terminal représenté par les lignées cellulaires.

Utilisation thérapeutique des ligands de TLRs dans le MM ?

Les agonistes du TLR9 ont la capacité d'accroître la réponse immunitaire en activant les CD plasmacytoïdes ou encore en régulant l'expression de plusieurs molécules immunostimulatrices sur les cellules de MM *in vitro*. Cependant, dans le contexte de certaines hémopathies B, ces stratégies d'immunomodulation sont inhibées par les caractéristiques d'immunodéficience sévères des patients et par les propriétés du microenvironnement tumoral largement défavorables à la réponse aux TLRs. De plus, les cellules tumorales myélomateuses sont des plasmocytes au stade terminal de différenciation qui ont des capacités des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) limitées en comparaison aux LB. Augmenter la sensibilité des cellules tumorales en les rendant plus immunogéniques semble difficilement applicable dans le cas du MM, du fait même de la nature des précurseurs normaux.

On peut alors douter de l'efficacité d'une stratégie d'immunothérapie basée sur les ligands des TLRs dans le MM. Il serait de toute manière indispensable de découpler les effets protumoraux induit par l'activation directe des TLRs sur les cellules myélomateuses avec des capacités stimulatrices du système immunitaire de ces mêmes ligands. Ceci nécessiterait l'utilisation combinée des agonistes synthétiques des TLRs avec des composants neutralisant la sécrétion de cytokines et les voies de signalisation protumorales.

Perspectives dans l'étude de l'implication des TLRs dans la biologie du MM

Notre compréhension de l'implication des TLRs dans l'organisme est aujourd'hui incomplète et de nombreuses études sont encore nécessaires afin de mettre en évidence leurs rôles hétérogènes selon les types cellulaires. Cependant, il semble évident que ces récepteurs jouent un rôle déterminant dans l'oncogenèse de nombreux cancers. Cette hypothèse est notamment soutenue par l'association de nombreux polymorphismes des TLRs avec une variété de cancer solides et hématologiques (El-Omar et al., 2008 ; Purdue et al., 2009). De nouvelles études sont à présent nécessaires pour déterminer si des gains ou des pertes de fonctions associées aux polymorphismes des TLRs sont impliqués dans les tumeurs, telles que le MM, où les TLRs sont fonctionnels.

Enfin, la majorité des travaux effectués sur le rôle des TLRs dans le MM a été conduite *in vitro*. Il est à présent nécessaire de confirmer ces études *in vivo* dans un modèle murin tel que le modèle 5TMM (Asosingh et al., 2000). Ceci permettra de démontrer l'implication de ces récepteurs au sein du microenvironnement ainsi que leurs rôles dans l'initiation, la progression ou encore la rechute.

**PROJET II : ÉTUDE DE LA
CLONOGÉNICITÉ SPONTANÉE DES
CELLULES DE MM**

Au cours de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de travailler sur un deuxième sujet, concernant l'étude de la clonogénicité spontanée des cellules de MM.

Plusieurs mécanismes caractéristiques des cellules souches normales et cancéreuses telles que l'autorenouvellement ou encore l'activation de la voie Notch semblent impliqués dans ce processus. Pour ces raisons ces sujets seront abordés au cours de cette introduction.

A. Cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Une cellule souche est une cellule indifférenciée, caractérisée par une capacité d'autorenouvellement à long terme accompagnée d'une capacité de division asymétrique, résultant dans la formation d'une cellule fille plus mature et spécialisée. Les cellules souches pluripotentes ont un rôle essentiel dans l'établissement des différents tissus dans les premiers stades du développement embryonnaire. D'autre part, des réservoirs de cellules souches somatiques multipotentes, tissus-spécifiques, sont maintenus jusqu'à la fin de la vie adulte. Ces dernières permettent le renouvellement des effecteurs matures à courte durée de vie ainsi que la régénération tissulaire. Parmi celles-ci, les cellules souches musculaires squelettiques (cellules satellites), intestinales, épidermiques, neurales ou encore hématopoïétiques sont aujourd'hui bien caractérisées (Laird et al., 2008).

De nombreuses études montrent que les cellules souches nécessitent *in vivo* un microenvironnement spécifique appelé « niche ». Chaque type de cellules souches multipotentes est préservé dans une niche spécifique qui permet leur maintien à long terme (Moore et Lemischka, 2006).

→ A1. Hématopoïèse et caractérisation des CSH

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules rares résidant dans la moelle osseuse des mammifères adultes. Ces cellules multipotentes, majoritairement quiescentes, siègent au sommet d'une hiérarchie de progéniteurs proliférants qui se spécialisent progressivement. Ces progéniteurs produisent des précurseurs hématopoïétiques destinés à la production des cellules matures du sang telles que les globules rouges, les mégacaryocytes, les cellules myéloïdes (monocyte/macrophage et neutrophiles) et les lymphocytes (Figure 20).

La preuve fonctionnelle de l'existence des CSH provient d'études ayant démontré qu'une seule de ces cellules pouvait reconstituer à long terme le système hématopoïétique de souris léthalement irradiées (Osawa et al., 1996).

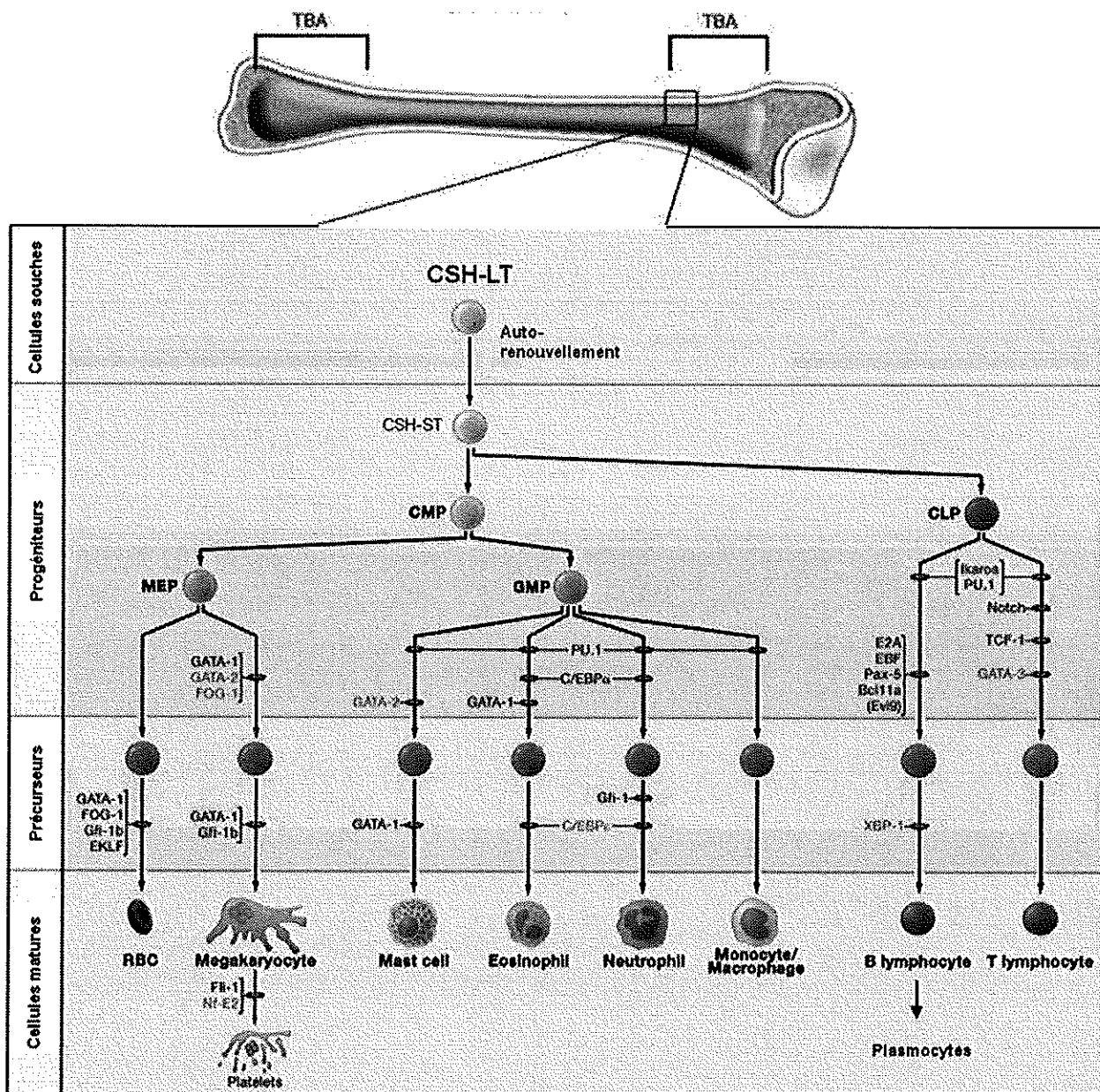


Figure 20 : Hématopoïèse

D'après Orkin et Zon, 2008

CSH-LT : Cellules souches à capacité d'autorenouvellement à long terme ;
CSH-ST : Cellules souches à capacité d'autorenouvellement à court terme ;
CMP : Progéniteurs myéloïdes ; *CLP* : Progéniteurs lymphoïdes ; *MEP* : Progéniteurs
 Mégacaryocytes/Erythroïdes ; *GMP* : Progéniteurs Granulocytes/Macrophages ;
TBA : Os Trabéculaire. Les gènes représentés en rouge ont été définis comme essentiels à
 l'engagement des cellules dans une voie donnée.

La distinction des CSH dans la masse de cellules différenciées est essentielle pour l'étude de leurs caractéristiques *ex vivo* ainsi que pour leur purification dans un contexte thérapeutique. La majorité des études ont été effectuées dans le modèle murin. Les CSH ayant la capacité d'autorenouvellement à long terme (CSH-LT) sont caractérisées par le phénotype

Lin- (absence de marqueur des cellules matures), Sca1+, C-KIT+, CD34-, FLT3- alors que les CSH ayant une capacité d'autorenouvellement plus limitée (CSH-ST) expriment le CD34. De nombreux travaux permettent d'améliorer continuellement les techniques d'isolation des CSH murines via l'identification de marqueurs supplémentaires, comme par exemple le CD150 (Hock, 2010).

D'autres études ont mis en évidence une possible isolation des CSH, alors appelées cellules SP (Side Population), par leur capacité d'exclusion du Hoechst 33342 (Eliasson et al., 2010). Cette exclusion est notamment médiée par la surexpression de transporteurs membranaires ABC tel que ABCG2/BCRP.

Cependant, malgré la conservation générale des niches hématopoïétiques et de la hiérarchisation similaire des CSH/progéniteurs, les marqueurs de surface facilitant leur identification sont particulièrement différents entre les 2 espèces. Le profil alors utilisé pour la purification des CSH humaines est le CD34+CD38-.

→ A2. Les niches hématopoïétiques

La production de CSH est accomplie par la spécialisation de certaines cellules embryonnaires dans différents sites au cours du développement. Chez les mammifères, ces sites incluent séquentiellement le sac vitellin, la région AGM (Aorte-Gonade-Mésonéphros), le foie fœtal et enfin la moelle osseuse (Galloway et Zon, 2003). Les propriétés des CSH diffèrent dans chacun de ces sites ce qui reflète l'importance des niches dans la spécialisation des cellules souches. Par exemple, les CSH du foie fœtal sont en cycle alors que celles de la moelle osseuse adulte sont majoritairement quiescentes.

Au niveau de la moelle osseuse, les CSH s'accumulent dans la région endostéale de l'os trabéculaire, aux contacts des ostéoblastes, formant ainsi la niche « osteoblastique » (Calvi et al., 2003). D'autre part, une niche vasculaire, localisée sur les capillaires sinusoides médullaires, a aussi récemment été décrite ; les CSH sont alors au contact de cellules endothéliales (Kiel et al., 2005) (Figure 21). Ces deux niches localisées dans la moelle osseuse ont la capacité de soutenir les CSH-LT (Butler et al., 2010).

Les propriétés d'autorenouvellement et de différenciation des CSH sont fortement régulées pour permettre un équilibre entre homéostasie des cellules sanguines et maintenance du réservoir de cellules souches. Cet équilibre est contrôlé à travers de nombreuses voies de signalisation impliquant un nombre important de facteurs solubles et d'interactions cellulaires. Les interactions entre les CSH et les ostéoblastes ou encore, les CSH et les cellules endothéliales sont déterminantes dans le devenir et la survie des CSH.

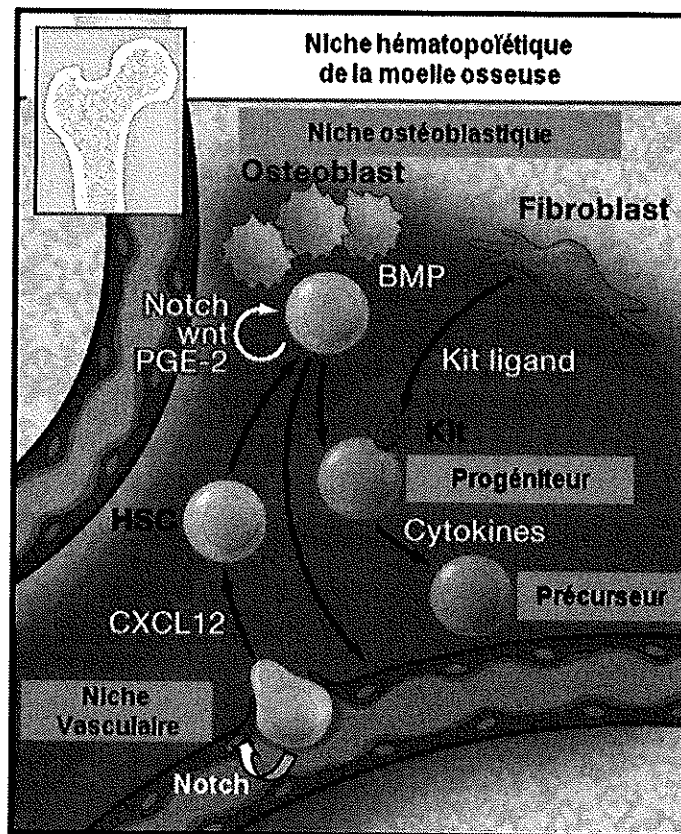


Figure 21 : Les niches Hématopoïétiques
D'après Orkin et Zon, 2008

Au niveau de la moelle osseuse, les CSH sont localisées dans la région endostéale de l'os trabéculaire, au contact des ostéoblastes, formant ainsi la niche « ostéoblastique ». D'autre part, une niche vasculaire, localisée sur les capillaires sinusoides médullaires, a été décrite ; les CSH sont alors au contact de cellules endothéliales.

Parmi les facteurs décrits, on retrouve des molécules d'adhérence telles que la N-cadhérine, VLA-4 et V-CAM-1. De nombreuses hormones, facteurs de croissance et récepteurs ont aussi été impliqués tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH), l'ostéopontine (OPN), la BMP, le SDF-1 et son récepteur CXCR4, l'angiopoïétine et Tie-2 ou encore le SCF et C-KIT. L'activation de certaines voies de signalisation telles que Wnt ou Notch semble aussi essentielle (Wilson et Trumpp, 2006) (Figure 22).

Ces interactions sont cruciales pour prévenir l'épuisement du réservoir des CSH-LT, pour contrôler leur entrée en cycle et, empêcher une prolifération et une différenciation excessive. Ainsi, les CSH-LT sont majoritairement quiescentes dans leur niche (G0) ce qui leur permet par exemple d'être largement résistantes aux agents chimiothérapeutiques. De plus, la niche et ses différents composants protègent les CSH de différents stress tels que l'accumulation des ROS (Reactive Oxygen Species) ou encore des dommages à l'ADN.

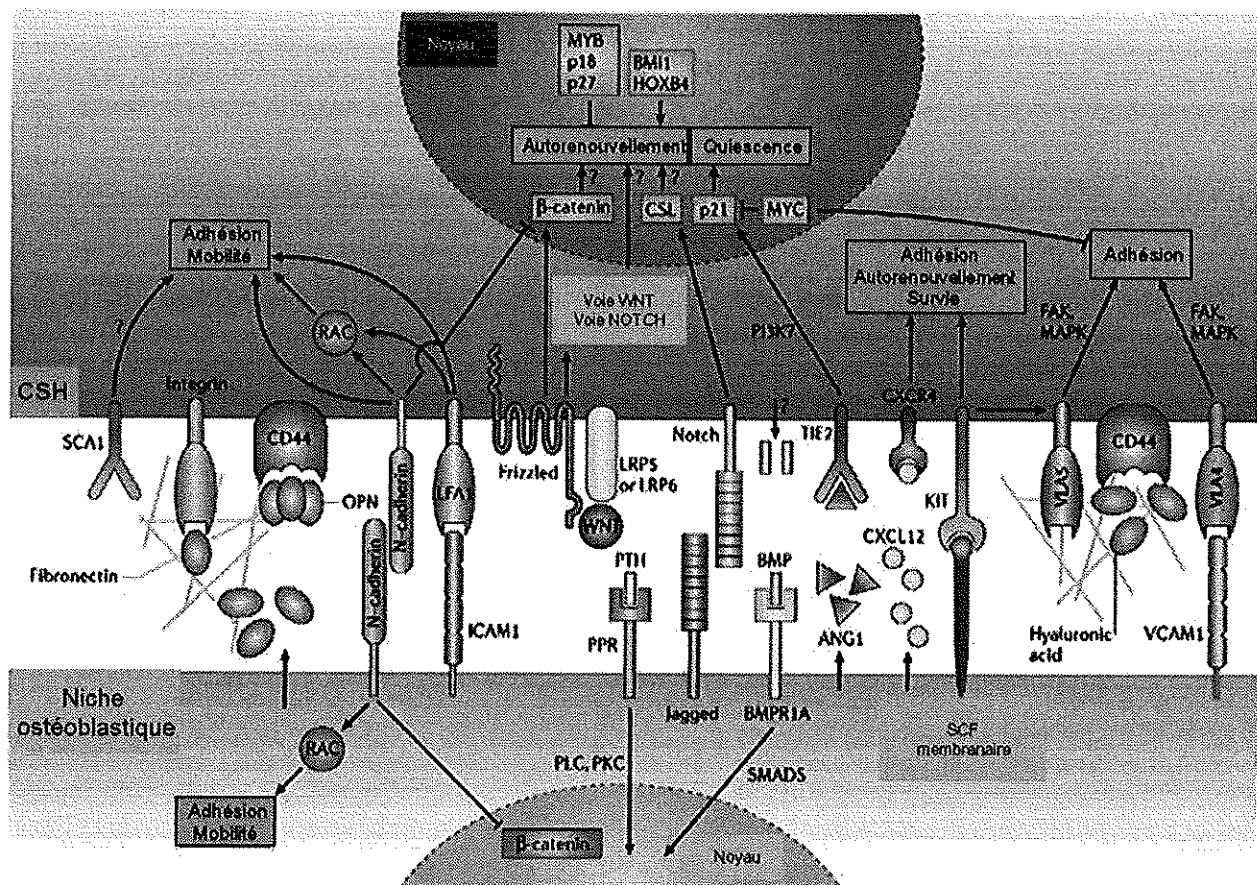


Figure 22 : Complexité de la niche ostéoblastique
D'après Wilson et Trumpp, 2006

Les nombreuses interactions entre les ostéoblastes et les CSH permettent d'assurer les processus d'autorenouvellement et de quiescence essentiels pour prévenir l'épuisement du réservoir de CSH ainsi que pour contrôler leur entrée en cycle. Ainsi, les intégrines, les cadhérines, les récepteurs à cytokines et chimiokines ou encore les récepteurs Wnt et Notch semblent essentiels pour le maintien de CSH dans la niche ostéoblastique.

Les mécanismes de protection des CSH sont en parti régulés par les conditions hypoxiques (faible % d'oxygène) présentes dans la niche médullaire. Ainsi le % d'O₂ décrit dans la moelle osseuse est de 1 à 3% contrairement aux 20% présents dans l'air ambiant. HIF-1 α est l'élément majeur de la réponse à l'hypoxie et, de nombreux gènes sous le contrôle de ce facteur de transcription sont exprimés dans les CSH. Ainsi, par exemple, le VEGF, C-KIT ou encore NOTCH1 sont induits en conditions hypoxiques par HIF-1 α dans plusieurs modèles *in vitro* (Eliasson et al., 2010). Plusieurs études montrent que ces conditions permettent de réguler le cycle cellulaire, de maintenir le phénotype indifférencié des CSH et, potentialisent leur retour dans les niches (« homing »). De plus, le fait de cultiver les cellules CD34+CD38- en condition hypoxique, avant transplantation dans des souris immunodéprimées, améliore la prise des greffes (Danet et al., 2003).

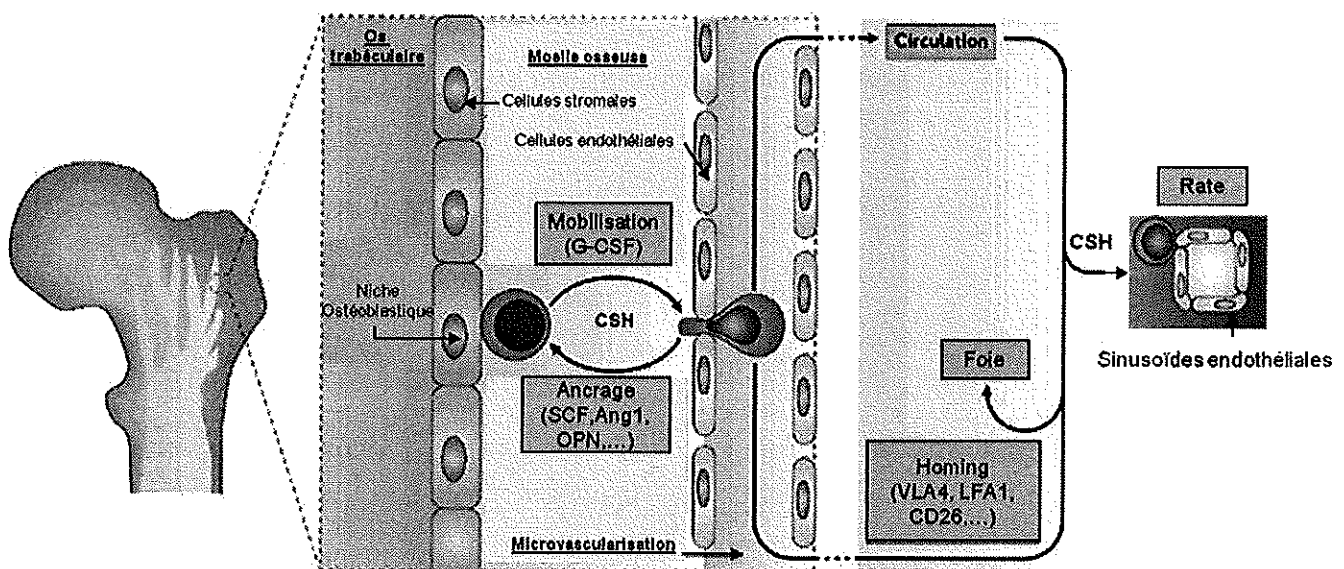


Figure 23 : Mécanismes de circulation des CSH dans l'organisme
D'après Wilson et Trumpp, 2006

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) localisées dans la niche ostéoblastique sont mobilisées en réponse au G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor). Après extravasation dans le système microvasculaire, les CSH vont circuler et seront distribuées dans les tissus périphériques comme la rate ou le foie. Le processus de « Homing » est contrôlé par un certain nombre de molécules d'adhésion telles que VLA4, LFA-1 ou encore le CD26. Après leur retour dans la moelle osseuse, les CSH vont se reloger dans la niche, un processus qui nécessite la présence de plusieurs facteurs telles que le SCF, l'ostéopontine (OPN) ou encore l'Angiopoïétine-1 (Ang1).

Dans le système hématopoïétique adulte, les CSH multipotentes clonogéniques donnent naissance à des millions de nouvelles cellules sanguines matures chaque jour. Les mécanismes de migration et de « homing », sont essentiels afin de garder un équilibre entre la formation de ces cellules et la préservation des réservoirs de CSH. Par ailleurs, l'importance de ces processus a été confirmée par l'utilisation clinique des CSH. En effet, la mobilisation des CSH médullaires vers la périphérie, par l'utilisation de G-CSF, a révolutionné la technique de récolte de CSH dans les protocoles d'autogreffes (Figure 23).

B. Concept de cellules souches cancéreuses (CSC)

Parallèlement à la découverte des cellules souches normales, l'existence potentielle de cellules souches cancéreuses (CSC) a été le sujet de nombreuses études ces 30 dernières années. D'après cette hypothèse, il est possible qu'une population de cellules tumorigéniques ait un potentiel d'autorenouvellement (clonogénicité) et puisse se différencier en cellules non tumorigéniques composant la masse tumorale. Les CSC sont principalement définies par leur capacité à initier et maintenir une tumeur en progression et, pour cette raison, elles sont aussi appelées « cellules initiatrices de tumeur » (Figure 24). Bien que les CSC soient décrites comme une population rare dans plusieurs pathologies, cette rareté relative n'est pas un critère consensuel de leur définition. De plus, le potentiel pluripotent des cellules souches normales n'est pas conservé dans la définition des CSC. En effet, bien que ces dernières puissent dériver de cellules souches normales, elles peuvent aussi provenir de la transformation de progéniteurs ou de cellules terminalement différenciées ayant acquis, via certaines mutations ou dérégulations, la capacité d'autorenouvellement (Clarke et al., 2006) (Figure 24).

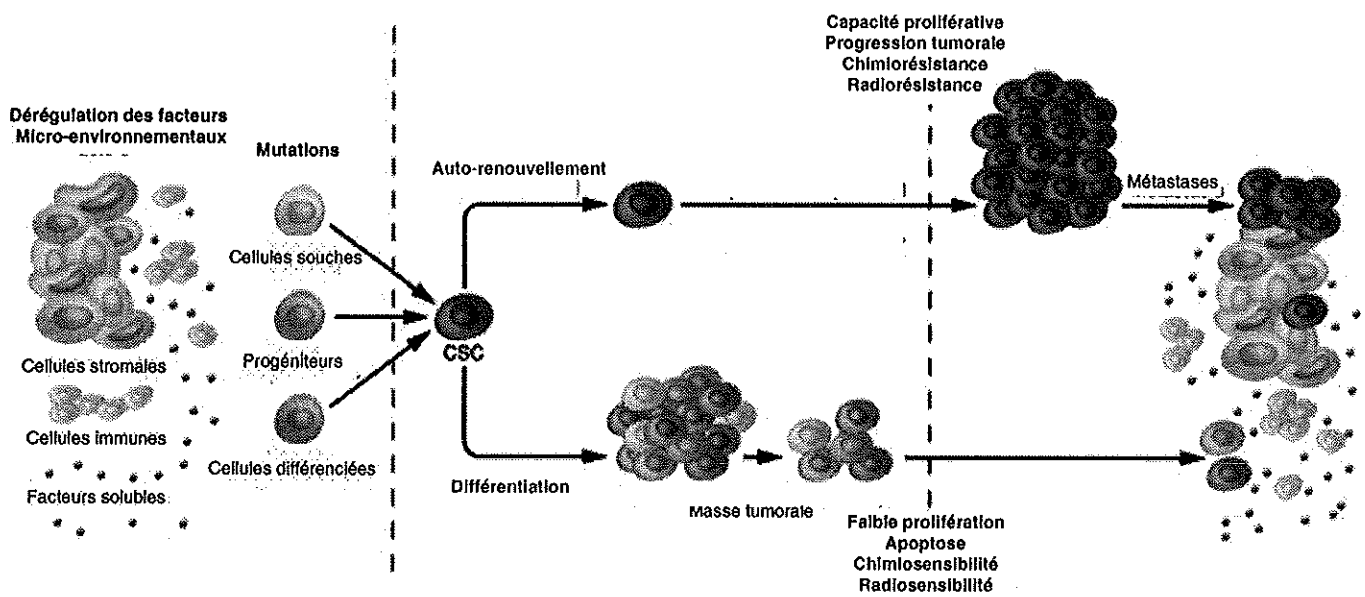


Figure 24 : Concept de cellules souches cancéreuses
D'après Frank et al., 2010

La définition des CSC n'implique pas une relation spécifique avec les cellules souches physiologiques. En effet, les CSC peuvent provenir de la transformation maligne de cellules souches, de progéniteurs mais aussi de cellules terminalement différenciées. Les CSC sont capables de conduire la tumorigenèse grâce à 2 caractéristiques déterminantes : leur capacité d'autorenouvellement à long terme et leur capacité de différenciation en populations non tumorigéniques qui forment la masse tumorale.

Des populations tumorigéniques ont été identifiées dans de nombreux cancers solides et hématologiques telles que les leucémies, les lymphomes, les cancers de la vessie, du sein, du colon, des ovaires, du foie en encore dans le gliome et le mélanome. De façon générale, les CSC sont particulièrement résistantes aux traitements conventionnels tels que la chimio- et la radiothérapie, et pourraient de fait constituer la maladie résiduelle responsable des rechutes observées dans de nombreux cancers (Bruns et al., 2009 ; Cheng et al., 2010 ; Martinez-climent et al., 2010 ; McDermott et Wicha, 2010).

Les approches thérapeutiques dirigées contre les CSC peuvent donc être des stratégies intéressantes dans l'évolution des traitements anti-cancéreux, en particulier dans les pathologies aujourd'hui réfractaires aux agents chimiothérapeutiques conventionnels ciblant majoritairement la masse tumorale. Ces approches thérapeutiques peuvent être possibles via le ciblage de marqueurs spécifiques des CSC ou via l'inhibition de voies de signalisation essentielles à leur autorenouvellement dans un tissu donné (Frank et al., 2010).

Ainsi, la recherche de marqueurs de surface spécifiquement exprimés par les CSC, permettant de les isoler, a été le but de nombreux travaux. Des marqueurs tels que le CD133 (colon, système nerveux central, pancréas), le CD44 (vessie, sein, ovaire), le CD90 (foie) ou encore le CD34 (AML) ont été décrits comme associés aux CSC de différents tissus (Frank et al., 2010). On peut noter que la spécificité de ces marqueurs sur les CSC est souvent controversée. Par exemple, alors que le CD133 a été défini comme étant un marqueur des CSC dans le cerveau (Singh et al., 2004), une autre étude montre que les gliomes CD133- contiennent aussi une sous population de cellules initiatrices de tumeurs (Beier et al., 2007). De plus, la majorité de ces marqueurs est aussi exprimée par certaines cellules normales limitant leur intérêt en tant que cible thérapeutique.

Un autre phénotype utilisé pour distinguer les CSC est le phénotype SP, caractéristique des CSH. La surexpression des transporteurs ABC, responsable du phénotype SP, est aussi impliquée dans les mécanismes de résistance aux drogues des CSC. Mais comme pour les autres marqueurs, le phénotype SP n'est pas une caractéristique universelle des CSC. Enfin, certains facteurs de transcription tels que Sox2, Oct4, Nanog, c-Myc, ou encore Bmi1 semblent critiques dans les capacités d'autorenouvellement, de prolifération et de survie de nombreux type de CSC. Cependant, leur inhibition est rendue difficile par leur rôle crucial dans la physiologie normale et plus particulièrement dans les cellules souches (Cheng et al., 2010).

Les approches biologiques fonctionnelles utilisées pour mettre en évidence l'existence et déterminer la proportion de CSC dans une tumeur sont, d'une part leur capacité clonogénique *in vitro* en milieu semi-solide (agar, collagène, méthylcellulose) et, d'autre part leur capacité à reconstituer une tumeur en série *in vivo* dans des modèles de souris immunodéficientes. Ces deux techniques permettent de mettre en évidence la capacité d'autorenouvellement caractéristique des CSC.

Bien que la xénotransplantation de cellules cancéreuses humaines chez la souris immunodéficiente soit aujourd'hui le modèle de référence pour la caractérisation des cellules tumorigéniques, une étude récente remet en cause sa fiabilité. En effet, les travaux de l'équipe du Dr. Morrison ont mis en évidence, dans le mélanome, que le potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses humaines varie fortement en fonction du degré d'immunodéficiences du modèle murin utilisé (Quintana et al., 2008). Ainsi, alors que seulement 0,0001% des cellules de mélanome implantées dans des souris NOD/SCID sont définies comme étant tumorigéniques, cette étude démontre que 25% d'entre elles le deviennent dans le modèle NOD/SCID IL2R γ ^{-/-}. Ce dernier est caractérisé par l'absence de

cellules NK fonctionnelles, rendant ces souris plus immunodéficientes que les souris NOD/SCID. L'optimisation des modèles de xénotransplantation pourrait alors révéler des proportions plus importantes de cellules tumorigéniques au sein des tumeurs qu'on ne pouvait l'envisager auparavant.

C. Cellules initiatrices de cancer et MM

→ C1. Découverte des cellules myélomateuses clonogéniques

L'hypothèse de l'existence de cellules souches myélomateuses a été émise il y a plus de 30 ans, en parallèle à l'émergence de la caractérisation des CSH. L'existence d'une sous population particulièrement clonogénique *in vitro* a été mise en évidence par Salmon et Hamburger dans la fin des années 70 (Hamburger et Salmon, 1977). Dans ce rapport, plus de 86% des tumeurs de patients peuvent former des colonies en milieu semi-solide (Agar et milieu conditionné murin), la fréquence de cellules clonogéniques déterminée étant de 1/100 à 1/1000 selon les cas. Ainsi, ce test de clonogénicité a permis dans un premier temps de tester la sensibilité des cellules aux différents agents chimiothérapeutiques ; une bonne corrélation entre la sensibilité des cellules dans ces tests de clonogénicité et la réponse des patients a d'ailleurs été constatée (Salmon et al., 1978). Il a ensuite été montré que les cellules clonogéniques ont une certaine capacité de prolifération et pourrait être responsables des rechutes. En effet, ces dernières constitueraient la maladie résiduelle résistante aux traitements (Karp et al., 1984).

C'est à partir de cette technique de clonogénicité transférable en séries indéfiniment, suivi d'un passage en milieu liquide, que les premières lignées cellulaires de MM ont émergé (Takahashi et al., 1985 ; Wandl et al., 1988). Plus tard, de nombreuses lignées cellulaires de MM ont été établies à partir de cellules primaires de patients, majoritairement extramédullaires, directement en milieu liquide grâce à l'ajout d'IL6 exogène (Zhang et al., 1994b).

Toutes ces lignées cellulaires sont alors caractérisées comme des concentrés de cellules clonogéniques de MM ou encore de cellules souches myélomateuses et, ont permis aux nombreuses études *in vitro* de faire évoluer les connaissances sur la biologie du MM. Cet outil est caractéristique d'un stade avancé de la pathologie myélomateuse et est représentatif de son hétérogénéité. Ceci a été confirmé par notre équipe grâce à l'analyse génique d'un large panel de lignées cellulaires. On peut cependant noter la faible incidence de lignées hyperdiploïdes, caractéristique de 50% des patients. Cette trop faible représentativité pourrait

être liée à la faible incidence d'hyperdiploïdie dans les leucémies à plasmocytes secondaires (17%), stade à partir duquel sont immortalisées la plupart des lignées (voir p.11). De plus, les MM hyperdiploïdes sont les plus ostéolytiques suggérant une forte dépendance à l'environnement médullaire.

→ C2. Caractérisation des cellules initiatrices de MM

Les cellules de MM sont clonales et présentent une recombinaison V(D)J stable ainsi que les mêmes mutations somatiques sans évolution au cours de la maladie. Ces caractéristiques supportent l'idée que les cellules myélomateuses sont dérivées du centre germinatif, soit d'un plasmocyte CD138+ « post-germinatif », caractéristique de la masse tumorale myélomateuse, soit d'un LB mémoire.

De nombreuses équipes ont mis en évidence la présence, dans le sang périphérique, de cellules CD19+ clonotypiques, c'est à dire ayant la même recombinaison VDJ et les mêmes mutations somatiques que les plasmocytes matures de la masse tumorale (Bakkus et al., 1994 ; Szczepek et al., 1997 ; Billadeau et al., 1993 ; Pilarski et al., 2000). La grande majorité des cellules plasmocytaires matures de la masse tumorale ne montrant qu'une faible capacité proliférative, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que les cellules initiatrices myélomateuses sont des LB ayant une forte capacité d'autorenouvellement. En effet, bien que les LB soient très engagés dans la différenciation hématopoïétique, elles gardent une capacité d'autorenouvellement essentielle dans le développement de la réponse immunitaire. Celles-ci constitueraient alors le réservoir tumorogénique du MM avec un potentiel clonogénique à long terme responsable de l'initiation, de la maintenance et des rechutes.

La caractérisation de ces cellules non plasmocytaires a tout d'abord été effectuée par l'équipe de L.M. Pilarski qui a mis en évidence une sous population clonotypique, phénotypiquement immature, de type progéniteurs hématopoïétiques, CD138-CD34+, et CD19- ou CD19+ selon les études, présente chez des patients de MM. Ces cellules ont une capacité clonogénique *in vitro* et tumorogénique *in vivo* remarquable, sont particulièrement résistantes aux drogues et pourraient constituer la maladie résiduelle (Pilarski et al., 1994 ; Pilarski et al., 2000 ; Reiman et al., 2001 ; Pilarski et Belch, 2002).

Plus récemment, c'est l'équipe de W. Matsui qui a permis une caractérisation phénotypique et fonctionnelle avancée des cellules initiatrices myélomateuses (Matsui et al., 2004 ; Peacock et al., 2007 ; Matsui et al., 2008 ; Huff et Matsui, 2008).

Phénotypiquement, ces cellules seraient CD19+, CD20+, CD27+, CD38-, CD138- et donc équivalentes à des LB mémoire. Ces cellules clonotypiques présentent les mêmes translocations des Ig que les plasmocytes CD138+ de la masse tumorale et sont détectables en faible quantité dans le sang périphérique et dans des lignées cellulaires telles que NCI-H929 ou RPMI8226. Les études fonctionnelles ont permis de montrer qu'elles ont un potentiel clonogénique *in vitro* supérieur aux cellules CD138+ à long terme. De plus, elles sont plus résistantes à certaines drogues telles que la dexaméthasone, le lénalidomide, le bortézomib ou encore la cyclophosphamide mais montrent une sensibilité accrue au rituximab, un anticorps anti-CD20. Dans les lignées de MM, ils ont mis en évidence que la sous population CD138- montre des caractéristiques de cellules SP, surexpriment l'ALDH (aldéhyde déhydrogénase) et sont majoritairement en G0/G1 ; trois caractéristiques essentielles des cellules de type souche. Enfin, ils ont démontré que la voie Hedgehog (Hh) est préférentiellement activée dans ce compartiment, que son activation induit son expansion, alors que son inhibition entrave leur capacité clonogénique via l'induction de leur différenciation. Par ailleurs, dans leur modèle de souris NOD/SCID, les cellules CD138+ des patients sont incapables de former une tumeur alors que les cellules CD138-, CD19+, CD20+, CD27+ reconstituent parfaitement la tumeur CD138+ initiale. Ce concept est confirmé dans une étude mettant en évidence que la clonogénicité des cellules CD138- est augmentée via leur interaction avec les CD (Kukreja et al., 2006).

Cependant, bien que ce model puisse paraître convainquant, il semble nécessaire de souligner que l'ensemble des données ne se base que sur un phénotype et non une fonctionnalité B mémoire. En effet, par exemple, les LB mémoire se distinguent des plasmocytes par leur incapacité à sécréter des Ig, qui sont à ce stade de la différenciation exprimés à la membrane. Cette différence devrait alors être mise en évidence dans le compartiment CD138-.

De plus, certaines études mettent en doute la spécificité de ce model. En effet, quelques travaux contredisent l'hypothèse d'un compartiment exclusivement CD138- de cellules initiatrices myélomateuses. Deux études ont démontré que les cellules myélomateuses CD138+ peuvent proliférer et être transplantées en série dans des os ectopiques chez la souris SCID-hu (humain) ou SCID-rab (lapin), alors que les cellules CD38- ou CD138- ne prolifèrent pas de façon significative dans ces modèles. (Yaccoby et Epstein, 1999 ; Yata et al., 2004). Ces études indiquent que les cellules initiatrices de myélomes doivent résider dans la fraction CD138+. L'(in)capacité tumorigénique des fractions CD138- et CD138+ semble alors très dépendante du modèle murin utilisé.

Une étude récente remet aussi en cause conceptuellement le modèle de cellules initiatrices de tumeur « B mémoire » (Rasmussen et al., 2010). Cette étude part du principe que l'oncogenèse du MM est définie par l'accumulation à différents stades d'anomalies dites primaires et d'anomalies dites secondaires (voir p.14-20). Les anomalies primaires, telles que la présence de translocation en 14q32, sont des événements précoces acquis dans le centre germinatif et sont responsables de l'émergence du stade MGUS. Cependant, alors que les anomalies primaires sont communes aux MGUS et MM, seul un faible pourcentage de MGUS évolue en MM. Ainsi, les anomalies primaires, bien que nécessaires, ne sont pas suffisantes à l'établissement d'un MM symptomatique. En effet, un certain nombre d'événements secondaires semble provoquer l'accumulation des anomalies impliquées dans l'émergence ou la progression du MM. La masse tumorale que ce soit à l'initiation, à la progression ou à la rechute d'un myélome symptomatique est donc porteuse des anomalies à la fois primaires et secondaires.

Cette étude met en évidence que seules les cellules CD38+(CD45-) ou CD138+, et non les CD38-CD19+CD27+, présentent à la fois les anomalies primaires et secondaires impliquées dans l'oncogenèse du MM. En effet, alors que la présence des translocations des Ig caractéristiques de la masse tumorale est détectée dans certains LB mémoire clonotypiques, ils n'ont dans aucun des cas étudiés, pu mettre en évidence l'anomalie secondaire, représentée dans ces travaux par les mutations de *RAS*.

Cette étude suggère alors que la présence des anomalies primaires dans certains LB mémoire est due à une dérégulation précoce localisée dans un précurseur B, pouvant se différencier en LB mémoire et en plasmocytes. Cependant, si ces LB mémoire ne présentent pas les mutations oncogéniques secondaires caractéristiques de la masse tumorale, elles ne peuvent pas être impliquées dans son maintien. Elles ne seraient donc pas représentatives des cellules initiatrices myélomateuses directement impliquées dans la pathologie mais seulement des cellules partiellement transformés résultant du centre germinatif.

Plusieurs arguments s'opposent donc sur la nature du compartiment initiateur de tumeur, LB mémoire CD138- d'un coté, plasmocytes CD138+ de l'autre. Ces deux hypothèses sont schématisées Figures 25 et 26.

Il semble difficile de réconcilier une oncogenèse myélomateuse « multi-étapes », comprenant une phase plasmocytaire MGUS, l'existence d'anomalies primaires et secondaires (Figure 2), et des cellules initiatrices de type LB mémoires (Figure 25). De plus, la conservation de sous populations LB mémoire dans les lignées cellulaires majoritairement

plasmocytaires, comme il est démontré dans les études de W. Matsui, est difficilement concevable. Comment ce compartiment CD138- indifférencié peut-il rester stable dans un environnement non spécifique ? Enfin, on peut souligner que le MM n'est jamais caractérisé par une expansion de cellules CD138-CD19+CD20+ même au décours des rechutes précoces ou terminales.

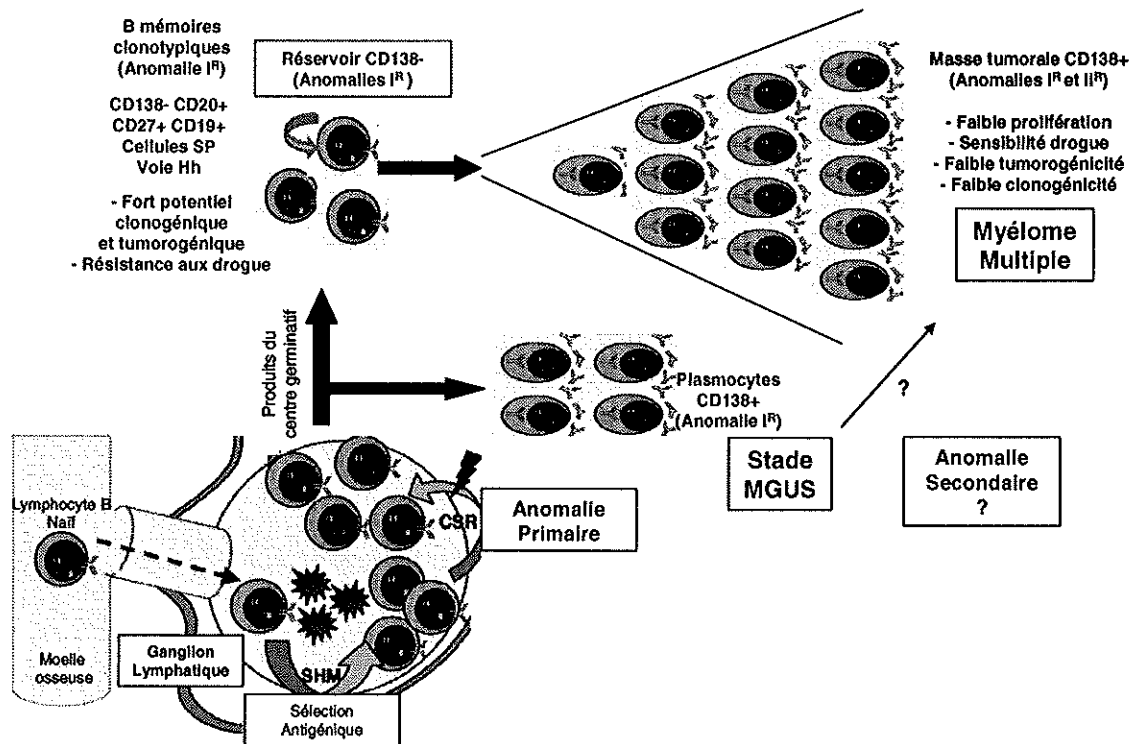


Figure 25 : Hypothèse d'un compartiment initiateur myélomateux CD138-

D'après plusieurs études, le réservoir souche du myélome multiple serait composé de LB mémoire clonotypiques. Il semble cependant difficile de réconcilier une oncogenèse myélomateuse « multi-étapes », comprenant une phase plasmocytaire MGUS, l'existence d'anomalies primaires et secondaires, et des cellules initiateurs de type LB mémoires.

D'un autre côté, alors que plusieurs études ont caractérisé phénotypiquement (CD38-CD19+CD27+, ALDH+) et fonctionnellement les cellules initiateurs de cancer CD138- (forte clonogénicité, forte tumorigénicité, résistance au médicament, cellules SP, voie Hedgehog), un sous-compartiment CD138+ ayant des caractéristiques de cellules initiateurs n'est pas formellement décrit (Figure 26). Néanmoins, il serait intéressant d'étudier si la sous-population CD138+CD45++, caractérisée comme une fraction proliférante de la tumeur myélomateuse (voir p.20), ne correspondrait pas à ce réservoir CD138+.

Une preuve de principe de l'existence des cellules initiatrices CD19+CD20+CD27+CD138- pourrait être obtenue avec l'utilisation thérapeutique du Rituximab qui, en ciblant le compartiment CD20+, éliminerait le réservoir CD138- et de fait, devrait être très efficace dans le traitement du MM. Le Rituximab a déjà été utilisé dans quelques protocoles cliniques afin de cibler les cellules CD20+CD138+ d'un sous groupe de myélome aujourd'hui bien caractérisé (Zhan et al., 2006 ; Kapoor et al., 2008). Bien que les effets observés soient assez décevants, ces protocoles ont utilisé le Rituximab à court terme. Une utilisation en maintenance sur le long terme est nécessaire pour savoir s'il cible, ou non, cette sous population CD138-CD20+.

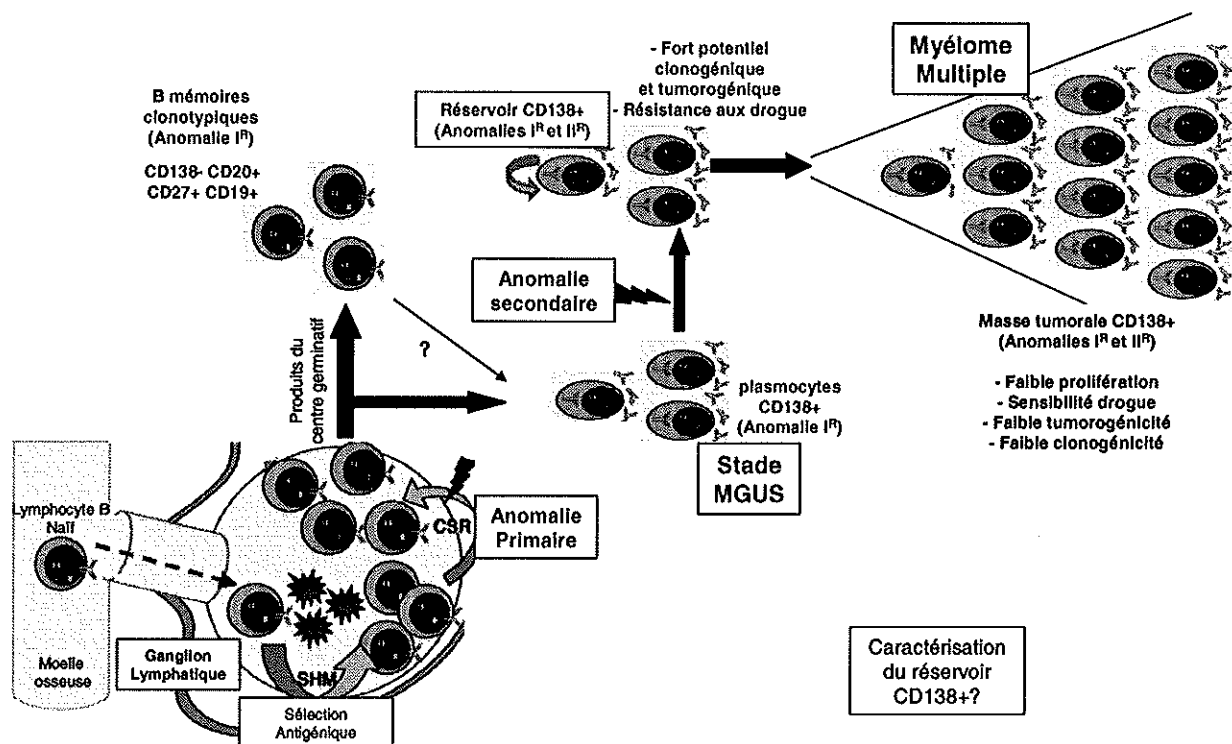


Figure 26 : Hypothèse d'un compartiment initiateur myélomateux CD138+

Les cellules souches et certaines cellules myélomateuses partagent donc la propriété d'autorenouvellement. Des études ont montré que certaines voies très conservées dans l'évolution, sont à la fois associées au processus de développement embryonnaire, à la biologie des cellules souches et à l'initiation et la progression de certains cancers. C'est notamment le cas des voies Wnt, Hh et Notch qui sont impliquées dans l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques, neurales, germinales et épidermiques. Lorsqu'elles sont dérégulées, elles sont aussi liées à l'émergence de certaines tumeurs telles que le carcinome du colon (Wnt), les médulloblastomes (Hh) ou les leucémies, certaines tumeurs du système nerveux et les tumeurs mammaires (Notch).

D. La voie Notch

→D1. La signalisation Notch

D1.1 Les récepteurs

Quatre différents récepteurs, NOTCH1 à 4, ont été décrits chez les mammifères, chacun ayant à la fois des fonctions uniques et redondantes (Figure 27).

Leur expression membranaire est conditionnée par plusieurs mécanismes post-traductionnels. En effet, la glycosylation de la protéine NOTCH par les enzymes O-fut et Rumi est essentielle à la production d'un récepteur fonctionnel. De plus, un autre mécanisme de glycosylation, contrôlé par la glycosyltransférase Fringe, détermine l'affinité des récepteurs pour leurs ligands potentiels.

Le récepteur mature subit un premier clivage (S1) au niveau de l'appareil de Golgi par la convertase Furin. Celui-ci permet de convertir le polypeptide NOTCH en hétérodimère composé d'une partie extracellulaire (NECD) et d'une partie transmembranaire/intracellulaire (NTMIC). Ces deux protéines sont liées par une interaction non covalente entre leur partie C- et N- terminal respective.

Le NECD contient de nombreuses répétitions de type EGF impliquées dans les interactions avec les ligands. Alors que certains de ces motifs de type EGF sont responsables de la « trans-activation » par les cellules voisines, d'autres induisent des « cis-inhibition » permettant de limiter les auto-activations dans les cellules exprimant à la fois les récepteurs et les ligands. Le domaine de régulation négative (NRR), composé de répétitions riches en cystéine (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation, inhibe l'activation des récepteurs en absence de ligand. Ce domaine NRR est essentiel pour assurer l'intégrité d'une activation

contrôlée et est le principal mécanisme de régulation de la voie Notch. Enfin, d'autres domaines ont un rôle important : RAM et ANK sont essentiels pour l'association avec les facteurs de transcription, NSL permet la localisation nucléaire, TAD est important dans la trans-activation nucléaire et PEST régule la demi-vie de la protéine (Figure 27 et 28) (Kopan et Ilagan, 2009).

D1.2 Les ligands

Les ligands de la voie Notch sont aussi des protéines transmembranaires. Ils sont tous caractérisés par un domaine DSL en C-terminal, suivi d'un domaine DOS et des répétitions de type EGF ; ces trois motifs sont impliqués dans les mécanismes d'interaction avec le récepteur. Cinq ligands ont été décrits chez l'homme : JAGGED1 et 2 (JAG1/2) et DELTA1, 3 et 4 (Dll1/3/4). Ces 2 familles de ligands se différencient par la présence (JAG1, JAG2) ou l'absence (Dll1, 3 et 4) d'une région riche en cystéine (CR) (Figure 27). Les domaines intracellulaires de Dll1, Dll4, JAG1 et 2 contiennent plusieurs résidus lysines pouvant servir de sites potentiels aux E3 ubiquitines ligases Mind bomb (Mib) ou Neuralized (Neur).

De nombreuses protéines sans domaine DSL ni DOS ont été décrites comme étant des ligands de la voie Notch mais leurs fonctions physiologiques sont encore largement inconnues (D'souza et al., 2008).

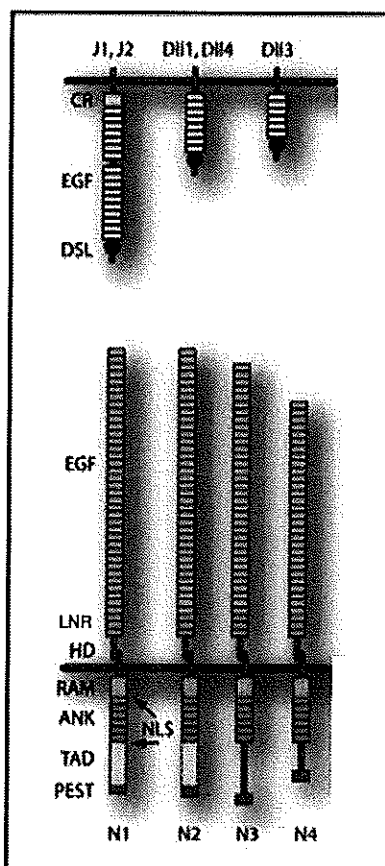


Figure 27 : Ligands et récepteurs de la voie Notch
D'après Radtke et al., 2010

Structure des récepteurs NOTCH1, 2, 3 et 4 (N1,2,3,4) et des ligands JAG1, 2 (J1,2), Dll1, 3 et 4 et de leurs principaux motifs fonctionnels (EGF, LNR, NLS, RAM, ANK, TAD et PEST). Le domaine HD représente les motifs permettant l'hétérodimérisation des récepteurs.

D1.3 Les processus d'activation

Le récepteur NOTCH est activé par la ligation d'agonistes présentés par les cellules adjacentes. Cette interaction permet à la metalloprotéase ADAM (TACE) de cliver le récepteur au niveau du site S2. Ce clivage juxtamembranaire libère le récepteur de sa partie extracellulaire alors « trans-endocytée » par la cellule exprimant le ligand. La capacité d'endocytose des ligands participe aux mécanismes d'activation. En effet, elle génère une force mécanique induisant un changement conformationnel du récepteur qui permet l'accessibilité du site S2 à ADAM. Le fragment transmembranaire/intracellulaire ainsi généré, appelé NEXT, est un substrat pour la γ -sécrétase. Cette protéase est composée d'un complexe de 4 protéines : l'élément catalytique, appelé préséniline, est associé à trois cofacteurs, la Nicastrine, Pen2 et Aph1. La γ -sécrétase clive NEXT en 2 sites, le site S3 permettant la libération du domaine intracellulaire actif de NOTCH (NICD) dans le cytoplasme et, le site S4 provoquant le relargage extracellulaire du peptide N β . Ce peptide est l'équivalent du peptide A β , libéré lors du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde par la γ -sécrétase, associé à la maladie d'Alzheimer (Okochi et al., 2006). Le clivage des sites S3 et S4 peut avoir lieu à la surface membranaire ou dans les endosomes, mais ce dernier induit la production d'un NICD moins stable.

Grâce à ses motifs NLS, le NICD est transloqué dans le noyau où il s'associe avec le facteur de transcription CSL via son domaine RAM (CBF1/RBPjk). En absence de NICD, CSL est lié à des corépresseurs ubiquitaires (Co-R) et des histones deacétylases (HDACs) qui répriment toute transcription génique. Suite à la formation du complexe NICD/CSL, des changements allostériques facilitent le déplacement des co-répresseurs et permettent le recrutement de l'activateur Mastermind (MAM) et de co-activateurs (Co-A). Le nouveau complexe ainsi formé permet l'initiation de la transcription de gènes cibles (Figure 29).

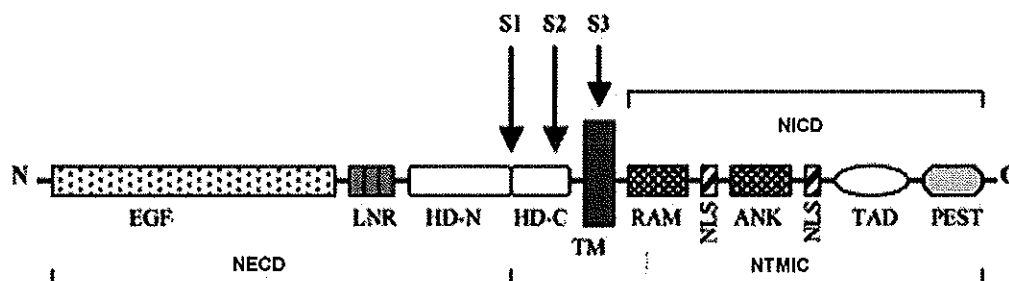


Figure 28 : Sites de clivage nécessaires à l'activation de la voie Notch
D'après Nefedova et Gabrilovich, 2008

*Représentation des sites de clivage par la protéase Furin (S1),
la metalloprotéase ADAM (S2) et la γ -sécrétase (S3).*

D1.4 Signalisation bidirectionnelle ?

Tout comme les récepteurs, les ligands de la voie Notch peuvent être clivés par la γ -sécrétase, ce qui provoque la libération d'un fragment intracellulaire. Quelques études ont mis en évidence la translocation nucléaire de ces fragments ainsi que leur capacité à activer la transcription génique (LaVoie et Selkoe, 2003 ; Kolev et al., 2005). Il existerait donc une signalisation bidirectionnelle potentielle lors des interactions entre les ligands et les récepteurs de la voie Notch. Cependant, il est important de noter que ces mécanismes ont été démontrés par transfection directe des domaines intracellulaires des ligands. L'existence de tels mécanismes après clivage physiologique des ligands transmembranaires n'a pas encore été démontrée.

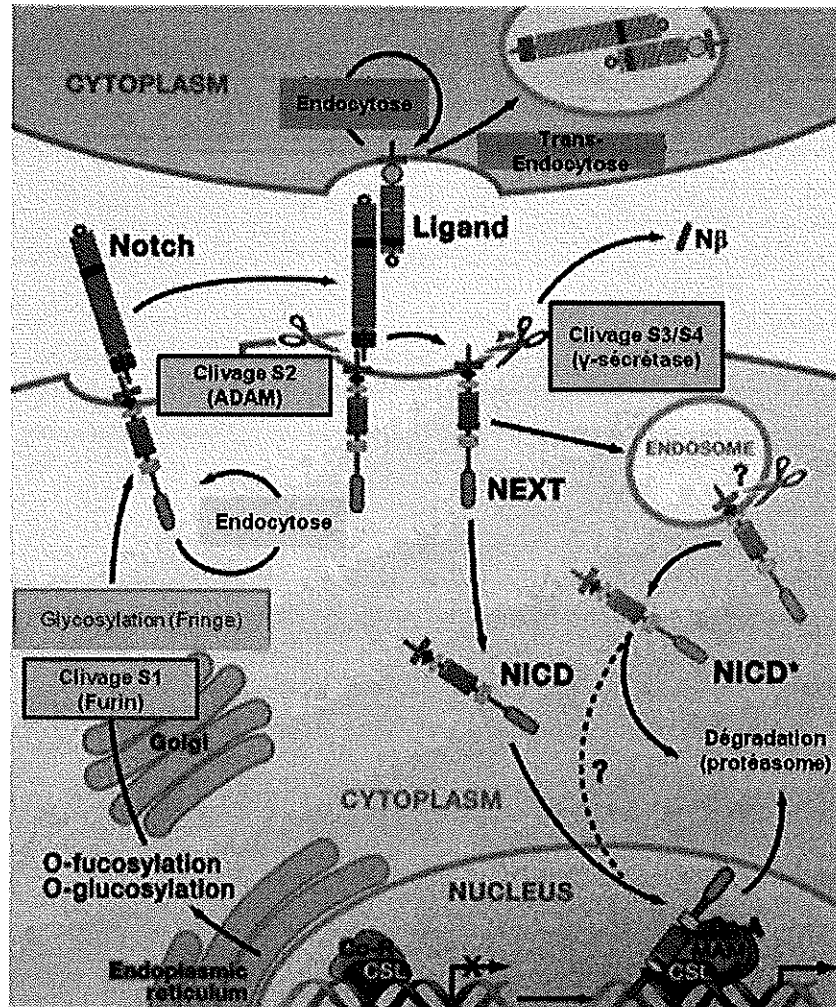


Figure 29 : Mécanismes d'activation de la voie Notch
D'après Kopan et al., 2009

NEXT : Fragment transmembranaire/intracellulaire, *NICD* : Domaine intracellulaire actif de *NOTCH*, *MAM* : Mastermind, *Co-R* : Co-répresseurs, *Co-A* : Co-activateurs, *Np* : Peptide issu du clivage *S4*.

D1.5 Les gènes cibles

Les cibles induites par l'activation de la voie Notch sont principalement déterminées par la présence de CSL sur différents promoteurs. De nombreux membres de la famille des facteurs de transcription HES, HERP et HEY ont été décrits comme des cibles ubiquitaires de la réponse Notch. De plus, $p21^{Cip/Waf}$, les Cycline D et A, l'ubiquitine ligase SKP2 ou encore c-Myc peuvent être induits dans certains types cellulaires (Miele, 2006). La suppression directe de p53 a aussi été mise en évidence par l'activation de Notch (Beverly et al., 2005). Enfin, le NICD a la capacité de s'associer à différents cofacteurs transcriptionnels, autre que CSL, induisant ainsi de multiples voies de signalisation telles que NF- κ B, HIF1 α ou encore

SMAD. Cependant, ces résultats proviennent d'études ayant utilisé des techniques de surexpression directe du NICD par transfection, ce qui induit une voie Notch anormalement élevée et non représentative des conditions physiologiques. Beaucoup de cibles géniques semblent donc être sous la dépendance de la voie Notch et leur induction dépend à la fois de l'intensité du signal, du microenvironnement et du type cellulaire concerné.

Notch participe à de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération, l'apoptose, l'adhésion, la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration ou encore l'angiogenèse. De fait, les perturbations de cette voie de signalisation sont associées à de nombreux phénomènes pathologiques. Les exemples les mieux caractérisés sont décrits dans le tableau IV qui détaille également la conséquence de l'inhibition ou de la surexpression des différents acteurs de la voie Notch dans le modèle murin.

	Pathologie humaines	Phénotype souris KO	Effet de la surexpression (souris)
NOTCH1	Leucémie lymphoblastique aigue T (T-ALL)	Léthalité embryonnaire (E11,5) Défaut de neurogenèse, somitogenèse et vasculogenèse	Déficience en LB Promotion et différenciation des kératinocytes // Induction de T-ALL
NOTCH2		Léthalité embryonnaire (E11,5) Défauts dans le déterminisme et mort des cellules neurales	
NOTCH3	Syndrome CADASIL	Pas de défaut phénotypique	Néoplasie T Inhibition apoptose médiée par FAS
NOTCH4	Schizophrénie (polymorphisme)	Pas de défaut phénotypique	Léthalité embryonnaire (E10,5) due à des défauts de la vasculogenèse
DLL1		Léthalité embryonnaire (E11,5) Défaut de neurogenèse, somitogenèse Production accrue de neurones (Télencéphale)	
DLL3	Dysostose spondylo-costale	Viabilité malgré un défaut de segmentation axiale	
DLL4		Léthalité embryonnaire Défaut de vasculogenèse	Leucémie Lymphoproliférative T
JAG1	Tétralogie de Fallot Syndrome Alagille	Léthalité embryonnaire (E11,5) Défaut de vasculogenèse	
JAG2		Léthalité post natale Anomalies cranofaciales, du thymus et des membres	

Tableau IV : Effets des pertes et gains de fonctions des acteurs de la voie Notch

La Tétralogie de Fallot est une forme fréquente de malformation cardiaque congénitale. Le syndrome Alagille est une maladie autosomique dominante rare caractérisée par de graves troubles de développement du cœur, du foie, des yeux et du squelette. La dysostose spondylo-costale est une forme de nanisme causé par une mauvaise segmentation des vertèbres et par la fusion de certaines côtes. Le syndrome CADASIL se traduit par des troubles vasculaires provoquant migraines, troubles du comportement et ischémies (Tableau adapté de Harper et al., 2003).

→ D2. Voie Notch dans le développement des cellules normales

L'activation de la voie Notch est essentielle au cours de l'embryogenèse des mammifères et participe à la somitogenèse, au développement du système nerveux, cardiovasculaire, osseux et endocrinien (pancréas, intestin). Cette voie conserve aussi un rôle important dans de nombreux types cellulaires au cours de la vie adulte (Bolos et al., 2007). Son implication dans le système hématopoïétique, particulièrement dans les CSH et les cellules du système immunitaire, est développée dans les paragraphes suivants.

D2.1 Voie Notch dans cellules souches hématopoïétiques

La voie Notch est essentielle à l'établissement des CSH dès les premiers stades de l'embryogenèse. En effet, NOTCH1 est requis pour la production des CSH aortiques (Kumano et al., 2003 ; Dzierzak et Speck, 2008) mais l'importance de cette voie dans l'homéostasie des CSH chez l'adulte est elle plus controversée :

Tout d'abord, l'expression constitutive de la partie active de NOTCH1 (NICD1), dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, permet l'établissement de lignées

cellulaires immortalisées. Celles-ci peuvent à la fois générer des cellules lymphoïdes et myéloïdes *in vitro* et, *in vivo*, dans les expériences de reconstitution à long terme (Varnum-Finney et al., 2000). D'autre part, la surexpression du NICD1 dans des CSH facilite leur autorenouvellement, inhibe leur différenciation et influence leur engagement vers les précurseurs lymphoïdes, chez la souris immunodéficiente (Stier et al., 2002). Par ailleurs, l'expression de JAG1 est augmentée sur les ostéoblastes exposés à l'hormone parathyroïdienne (PTH). Cette augmentation de JAG1 induit alors une activation de NOTCH1 sur les CSH, ce qui entraîne *in vivo* une augmentation de leur nombre (Calvi et al., 2003).

En utilisant des souris transgéniques, une équipe a ensuite mis en évidence que la voie Notch est activée *in vivo* dans les CSH et qu'elle diminue tout au long du processus de différenciation. L'extinction de cette voie, via l'inactivation de MAM, provoque leur différenciation de façon accélérée *in vitro* et, déplete le réservoir de CSH *in vivo*. Enfin, la voie Notch, en coopération avec la voie Wnt, est requise pour le maintien des CSH indifférenciés *in vitro* (Duncan et al., 2005).

Chez l'homme, une population de cellules de la moelle osseuse enrichie en CSH (CD34+, CD38-, Lin-) montre une meilleure capacité de prise chez la souris lorsqu'elle est préalablement cultivée avec JAG1. En effet ce ligand favorise leur maintien et leur expansion (Karanu et al., 2000).

Toutes ces études indiquent donc un rôle important de la voie Notch, et particulièrement, via l'activation NOTCH1 par JAG1 exprimé par les ostéoblastes, dans les processus d'autorenouvellement des CSH. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans des systèmes de coculture entre les CSH murines ou humaines et, des cellules endothéliales ou de fibroblastes surexprimant JAG2 (Carlesso et al., 1999 ; Tsai et al., 2000). On peut cependant noter que plusieurs de ces études utilisent des systèmes de transfection du NICD1 et/ou de surexpression des ligands qui ne reflètent pas les mécanismes physiologiques.

D'un autre côté, plusieurs travaux utilisant des techniques d'extinction n'ont pas pu démontrer un rôle essentiel de la voie Notch dans la maintenance des CSH à l'état d'équilibre. En effet, des études effectuées chez des souris conditionnellement invalidées pour les gènes *JAG1*, *JAG2*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *CSL* ou encore *MAM* contredisent les études précédentes en montrant que la voie Notch n'est pas nécessaire au maintien des CSH dans la niche hématopoïétique *in vivo* (Mancini et al., 2005 ; Maillard et al., 2008).

Enfin, une étude récente montre que la voie Notch est essentielle dans la niche vasculaire en cas de stress hématopoïétique (ablation de la moelle osseuse). Les CSH-LT

expriment le récepteur NOTCH1 et NOTCH2 et les cellules endothéliales, principales composantes de la niche vasculaire, expriment JAG1, JAG2, Dll1 et 4. Alors que les CSH NOTCH1-/- ou NOTCH2 -/- ont la capacité de reconstituer le système hématopoïétique de souris léthalement irradiées, leur capacité d'autorenouvellement supportée par les cellules endothéliales est dramatiquement inhibée. L'inactivation de la voie Notch ne semble pas nécessaire à la reconstitution du système hématopoïétique, elle est cependant essentielle à la préservation du réservoir de CSH, au moins dans la niche vasculaire sur le long terme (Butler et al., 2010).

Bien que ces dernières années l'intérêt ait surtout été porté sur le rôle controversé de la voie Notch dans l'homéostasie des CSH, elle semble avoir un rôle essentiel dans l'engagement, la différenciation et la prolifération de nombreuses cellules du système immunitaire.

D2.2 Voie Notch dans les cellules du système immunitaire

- Les Lymphocytes T (LT)

Le rôle essentiel de la voie Notch au cours du développement précoce des LT dans le thymus est aujourd'hui bien décrit. L'inactivation de NOTCH1, Fringe, MAM ou CSL inhibe le développement des LT et induit une accumulation de LB dans le thymus. Récemment, une étude a montré que NOTCH1 limite le potentiel des précurseurs hématopoïétiques à la seule différenciation T en inhibant les engagements B et myéloïdes (Feyerabend et al., 2009).

Suite au processus de maturation, les LT fonctionnels migrent en périphérie où ils vont avoir un rôle crucial dans la défense immunitaire. La voie Notch a été associée à la réponse de tous les types de LT. Ainsi, cette voie est impliquée dans la différenciation des LT CD8+ en LT cytotoxique via la régulation de la perforine ou encore du granzyme B (Cho et al., 2009). L'expression ectopique de Dll sur les CD favorise les réponses Th1 et Th17 alors que, l'expression de JAG induit la différenciation Th2 *in vitro* (Amsen et al., 2004). Enfin, la coculture des LT régulateurs (Trég) essentiels à la suppression de l'auto-immunité avec des progéniteurs hématopoïétiques exprimant JAG2 induit leur prolifération et prévient le développement de diabète dans un modèle murin (Kared et al., 2006).

- *Lymphocytes B (LB)*

Pax 5 est requis pour l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques dans la voie de différenciation B et le maintien de son expression est nécessaire tout au long de la lymphopoïèse B. Une équipe a démontré que ce facteur interfère avec l'engagement T et le développement de thymocytes précoces, notamment grâce à sa capacité de répression du gène *NOTCH1* (Souabni et al., 2002). Cependant, une autre étude a mis en évidence chez l'homme que les LB naïfs, du stade pro-B au stade B immature, exprime l'ARN de *NOTCH1*. De plus, les cellules CD19+ de la moelle osseuse expriment faiblement NOTCH1 à la membrane (Bertrand et al., 2000).

L'expression de l'ARN de *NOTCH2* est limitée au stade pré-B, et les cellules pro- et pré-B expriment l'ARN de *Dll* et non celui de *JAG1* (Bertrand et al., 2000). De façon intéressante, l'analyse par puces géniques de LB différenciés et activés *in vitro* révèle l'absence d'expression de *JAG1* mais montre une forte induction de ce ligand dans les plasmocytes matures de la moelle osseuse.

Bien que ces résultats préliminaires esquissent un rôle de la voie Notch dans la régulation des LB, son implication n'est vraiment démontrée que pour les LB localisés dans la rate. Deux populations de LB sont décrites dans cet organe : les LB folliculaires, qui sont des cellules circulantes regagnant les centres germinatifs afin de participer à la réponse immunitaire antigénique et dépendante des LT et, les LB de la zone marginale, qui sont des LB mémoire non circulants et localisés dans la partie externe de la pulpe blanche splénique. La voie Notch est essentielle dans la spécialisation des LB de la zone marginale via l'interaction entre leur récepteur NOTCH2 et le ligand Dll1 exprimé par les cellules endothéliales de la rate (Hozumi et al., 2004).

Enfin, dans le modèle murin, l'activation de NOTCH par Dll1 induit la prolifération et la production d'Ig par les LB de la rate. Cette activation n'est possible qu'en coopération avec des signaux d'activation classiques tels que l'activation du BCR, du CD40 ou des TLRs. Ces résultats indiquent cependant que les ligands de la voie Notch peuvent influencer la différenciation terminale des LB matures (Santos et al., 2007 ; Thomas et al., 2007).

- *Les autres acteurs du système immunitaire*

Bien que peu d'études aient étudié l'implication de la voie Notch dans la biologie des autres acteurs hématopoïétiques, quelques exemples peuvent être soulignés. Ainsi, le développement des mégacaryocytes est augmenté *in vitro* après co-culture des précurseurs hématopoïétiques avec des cellules stromales surexprimant Dll1. D'autres études *in vitro* ont

mis en évidence un rôle de ce ligand dans le développement des CD myéloïdes et plasmacytoïdes (Olivier et al., 2006). Enfin, la stimulation des cellules NK par JAG2 augmente leur cytotoxicité, leur capacité de production d'IFN γ et leur prolifération. Ce mécanisme peut notamment être induit *in vitro* via l'activation de NOTCH2, exprimé par les cellules NK, par le ligand JAG2 présenté par les CD (Kijima et al., 2008).

→ D3. Notch et hémopathies

Les dérégulations ou les mutations des récepteurs, des ligands et des cibles géniques de la voie Notch ont été mises en évidence dans de nombreux cancers solides tels que le cancer des reins, des poumons, du pancréas, des ovaires, du sein, de la prostate, les ostéosarcomes, le mésothéliome ou encore le gliome. Par exemple, la surexpression de NOTCH1 et JAG1 est associée avec un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Reedijk et al., 2005) et avec le stade métastatique du cancer de la prostate (Santagata et al., 2004).

Bien que dans la majorité des cas décrits, ces dérégulations soient oncogéniques, une exception notable provient des études sur les kératinocytes épidermaux où la fonction suppressive de tumeur de NOTCH1 est bien définie (Dotto et al., 2008).

La dérégulation de cette voie importante dans le développement normal des cellules hématopoïétiques est aussi impliquée dans l'oncogenèse de plusieurs hémopathies telles que le lymphome de Hodgkin, le T-ALL, le B-CLL ou encore le MM.

D3.1 Leucémie lymphoblastique aigue T (T-ALL)

L'implication de l'activation de la voie Notch dans les leucémies humaines a pour la première fois été mise en évidence dans le T-ALL. En effet, 1% des patients sont caractérisés par la t(7;9) qui a pour conséquence un réarrangement d'une partie du gène de *NOTCH1* avec le promoteur du TCR- β . Cette translocation résulte en une expression aberrante et constitutive de la forme active de NOTCH1. Des études effectuées à la suite de cette découverte ont montré la présence de mutations activatrices de NOTCH1 dans plus de 50% des cas de T-ALL (Breit et al., 2006). La dérégulation de cette voie est aujourd'hui définie comme un élément majeur de la pathogenèse de cette maladie. Dans ce modèle, les mutations activatrices de *NOTCH1* vont induire des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie des cellules malignes telles que l'activation de la cyclinD3, de c-Myc et de NF-kB ainsi que la dégradation de p27^{kip1} ou encore l'inhibition de p53 (Radtke et al., 2010).

D3.2 Hémopathies B

Le rôle de Notch dans les hémopathies B est hétérogène et parfois controversé. En effet, plusieurs études suggèrent qu'une voie Notch constitutivement active mène à l'inhibition de prolifération et à l'apoptose de LB malins dans la leucémie lymphoblastique aigue (preB-ALL) ou encore dans le lymphome hodgkinien. Ces effets ont été observés après transfection des formes actives de Notch (NICD1 à 4) ou encore après activation par les ligands (Zweidler-Mckay et al., 2005).

D'un autre côté, plusieurs travaux soulignent un rôle oncogénique de la voie Notch dans les LB tumoraux. Par exemple, dans une étude récente, les auteurs montrent que les cellules de B-CLL de 25 patients ont une expression élevée de NICD-1 et NICD-2 indiquant une forte activité de cette voie dans la pathologie. De plus, ils mettent en évidence une surexpression des ligands JAG1 et JAG2. L'extinction de NOTCH2 par siRNA induit l'apoptose des cellules de B-CLL alors que leur stimulation par JAG1 augmente leur survie (Rosati et al., 2009).

Par ailleurs, une activité aberrante de NOTCH1 via l'activation homo ou hétérotypique de JAG1 est impliquée dans le développement, la prolifération et la survie des LB de lymphome hodgkinien. Cette sur-activation est notamment liée à la sous-expression de DELTEX, un inhibiteur spécifique de la voie Notch. NOTCH1 participe aussi aux mécanismes de dédifférenciation caractéristiques de cette pathologie (Jundt et al., 2002 ; Jundt et al., 2008).

Ensuite, dans un modèle de LB humain immortalisé par le virus EBV, similaire à un lymphome de Burkitt, JAG2 est induit par la surexpression ectopique de MYC. La surexpression de JAG2 provoque une augmentation de la prolifération en milieu hypoxique et une augmentation de la vitesse de croissance tumorale chez la souris (Yustein et al., 2010).

Enfin, dans les plasmocytomes murins, les plasmocytes tumoraux sont caractérisés par une forte activité de la voie Notch. Son inhibition, via l'utilisation d'inhibiteur de la γ -sécrétase ou encore via la génération de mutants MAM^{-/-}, provoque une baisse de la capacité proliférative accompagnée d'une induction d'apoptose (Shin et al., 2008).

→ D4. Implication de la voie Notch dans le Myélome Multiple

D4.1 Les cellules myélomateuses expriment les différents acteurs de la voie Notch

Récemment, plusieurs travaux ont décrit l'expression des différents acteurs de la voie Notch sur les plasmocytes normaux et myélomateux. NOTCH1, NOTCH2 et JAG1 ne sont exprimés que par un faible pourcentage de plasmocytes normaux dans la moelle osseuse, alors

qu'une surexpression est observée sur les cellules primaires de patients (Jundt et al., 2004). Les lignées de MM présentent aussi une expression fréquente de *NOTCH1*, *NOTCH2* et *JAG1*. On observe cependant des résultats hétérogènes selon les études, bien que les mêmes lignées et les mêmes techniques (immunohistochimie (IHC), western-blot) aient été utilisées (Jundt et al., 2004 ; Nefedova et al., 2004 ; Nefedova et al., 2008).

D'après plusieurs études, les plasmocytes myélomateux, que se soient les cellules primaires de patients ou encore les lignées, expriment fortement et de façon ubiquitaire le ligand *JAG2* (De Vos et al., 2001 ; Houde et al., 2004 ; Takeuchi et al., 2005). Celui-ci n'est pas exprimé chez les donneurs sains, faisant de *JAG2* un marqueur spécifique des cellules de MM. Le gène *JAG2* est localisé en 14q32, juste en amont de la zone « switch » des IgH impliquée dans les translocations caractéristiques du MM (voir p.12) mais sa surexpression ne semble pas liée à sa localisation génique. Par ailleurs, des mécanismes d'hypométhylation ou encore d'hyperacétylation du promoteur ont été proposés, sans pour autant être démontrés (Houde et al., 2004 ; Ghoshal et al., 2009). Enfin, MIB2, une E3 ubiquitine ligase spécifique de *JAG2*, est surexprimée dans le MM, et participe à la réponse cellulaire via la facilitation des mécanismes de trans-endocytose (Takeuchi et al., 2005). Cependant, l'expression ubiquitaire de *JAG2* dans le MM est contredite par une étude plus récente qui montre que seules 2 des 4 lignées utilisées dans leur étude l'expriment (Nefedova et al., 2008).

Afin de confirmer ou infirmer ces résultats hétérogènes, nous avons analysé l'expression de *NOTCH1*, *NOTCH2*, *JAG1* et *JAG2* sur un panel de 40 lignées cellulaires, grâce à la technique des puces géniques. Nous avons observé que les ARN de *NOTCH1* et *NOTCH2* sont présents dans respectivement 75% et 100% des cas. L'ARN de *JAG1* est détecté dans 75% des lignées alors que *JAG2* n'est présent que dans 45% des cas, l'expression de ce dernier étant particulièrement élevée dans 25% des lignées. Ces résultats, validé par une étude protéique (western blot et cytométrie en flux), confirment donc l'expression fréquente de *NOTCH1*, *NOTCH2* et *JAG1* mais infirment une forte expression ubiquitaire de *JAG2*.

Afin d'évaluer l'expression sur les cellules primaires de patients nous avons utilisé une base de données publique comprenant le profil d'expression génique de 414 patients au diagnostic (Zhan et al., 2006). Nous observons que plus de 98% des échantillons de patients sont positifs pour *JAG1* et *NOTCH2* alors que seulement 50 % d'entre eux expriment *NOTCH1*. De façon intéressante, *NOTCH2* est surexprimé chez les patients de type MAF (MF) (voir p.14) et, l'analyse de ce récepteur par western blot révèle sa surexpression sur les lignées présentant une dérégulation des protéines C-MAF ou MAFB. Ces observations confirment des résultats récemment publiés sur le fait que *NOTCH2* est induit par c-

MAF/MAFB dans les cellules myélomateuses (Van Stralen et al., 2009). L'analyse de *JAG2* montre une expression élevée sur seulement 15% des patients. Cependant, la fiabilité de la sonde a été remise en cause dans une publication récente (Mahtouk et al., 2010). En effet, ils émettent l'hypothèse que le niveau d'expression observé pour *JAG2* dans les cellules primaires de MM est à la limite de la sensibilité permise par la technique des puces géniques.

Une étude par PCR ou par cytométrie en flux sur un grand nombre de patients reste nécessaire pour confirmer les expressions géniques observées.

Étant donné que les cellules myélomateuses expriment à la fois les ligands et les récepteurs de la voie Notch, une activation hétérotypique mais aussi homotypique de cette dernière est envisageable.

D4.2 Implication de la voie Notch dans la biologie du Myélome multiple

A l'instar des différents travaux révélant l'expression des acteurs de la voie Notch, son étude fonctionnelle dans le MM montre aussi des résultats contradictoires.

- Co-stimulation par les cellules stromales

Une première étude a mis en évidence que la co-stimulation des lignées de MM par des fibroblastes surexprimant le ligand *JAG1* protège les cellules myélomateuses de l'apoptose induite par certaines drogues telles que le Melphalan. Le mécanisme impliqué dans cette résistance est une inhibition de prolifération des cellules de MM associée à un blocage en G0/G1 par une induction de $p21^{WAF/CIP}$ dépendante de NOTCH1 (Nefedova et al., 2004). Deux études confirment en partie ces résultats : d'une part, la transfection rétrovirale du NICD-1 protège les lignées de l'apoptose (Jia et al., 2004) ; d'autre part, la transfection des NICD 1 à 4 induit une forte inhibition de la prolifération médié par une augmentation de Hes1 dans les lignées de MM utilisées (Zweidler-Mckay et al., 2005).

Cependant, de façon surprenante, une autre étude démontre que la co-culture de ces mêmes lignées avec des fibroblastes surexprimant *JAG1* induit une augmentation de la prolifération des cellules myélomateuses. Cet effet prolifératif est décrit comme étant dépendant de l'activation de la voie Notch car d'un côté, une augmentation de Hes1 est détectée et d'un autre côté, l'effet est annulé en présence d'un inhibiteur de la voie (DAPT).

Ainsi, malgré le fait que ces études utilisent les mêmes lignées de myélome, l'implication de la voie Notch sur la prolifération est contradictoire. Ces différences doivent

être dépendantes des différents protocoles et de la nature très éloignée et non physiologique des fibroblastes utilisés dans ces études.

- Induction de la sécrétion d'IL-6

Les cellules myélomateuses exprimant fortement JAG2 induisent la sécrétion d'IL6 par les cellules stromales en co-culture *in vitro*. Bien que cette induction de cytokine soit dépendante de NOTCH1, car inhibée en présence d'un anticorps bloquant, il n'est pas démontré que cette induction soit vraiment médiée par JAG2. En effet, les lignées de MM exprimant aussi fréquemment JAG1, un rôle de ce dernier ne peut être exclu (Houde et al., 2004) (Figure 30).

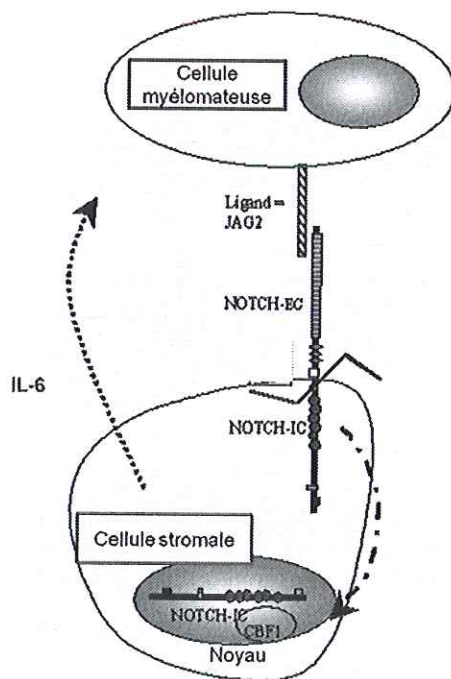


Figure 30 : JAG2 et induction d'IL6
D'après Houde et al., 2004

L'activation de NOTCH par JAG2 induit la translocation nucléaire du NICD dans les cellules stromales. Une fois dans le noyau, le NICD induit la transcription de plusieurs facteurs tels que l'IL6.

- Induction de l'activité ostéoclastique

Dans un modèle de co-culture *in vitro*, certaines lignées de MM ont la capacité d'activer la voie Notch dans les ostéoclastes via l'induction de Hes1. Cette activation, non reproductible en présence d'ostéoblastes ou encore de cellules souches mésenchymateuses, a pour conséquence d'augmenter l'activité ostéoclastique. La voie Notch pourrait donc participer aux mécanismes précurseurs de l'ostéoporose caractéristique du MM (Schwarzer et al., 2008).

- *Effet de l'inhibition de la voie Notch dans les cellules myélomateuses.*

Etant donné le rôle essentiel du clivage des récepteurs par la γ -sécrétase dans l'activation de la voie Notch, de nombreux inhibiteurs de cette protéase (GSI) ont été développés et évalués pour leurs capacités antitumorales potentielles. Ainsi, plusieurs études ont démontré, *in vitro*, les effets antiprolifératifs ou encore pro-apoptotiques de ces inhibiteurs dans certains modèles de tumeurs solides (poumons, ovaires, mélanomes) et hématologiques (T-ALL, AML, lymphomes B) (Nefedova et Gabrilovich, 2008). Un essai clinique de phase I a même été initié pour le T-ALL, mais malheureusement les résultats ne mettent en évidence qu'une faible réponse antitumorale accompagnée d'une toxicité intestinale trop importante (Ferrando, 2009).

Dans le MM, trois différents inhibiteurs de la γ -sécrétase ont été testés *in vitro* : le DAPT (Jundt et al., 2004), le GSI-15 (Schwarzer et al., 2008) et le GSI-XII (Nefedova et al., 2008). Le DAPT a pour propriété d'inhiber la prolifération des cellules myélomateuses stimulées par JAG1. Le GSI-15, induit l'apoptose des cellules myélomateuses exprimant le récepteur NOTCH1. De plus, cet inhibiteur a la capacité d'abolir l'augmentation de l'activité ostéoclastique dépendante de Notch et induite par les cellules myélomateuses.

Le GSI-XII a une forte activité proapoptotique dans les cellules myélomateuses alors que les cellules normales sont particulièrement résistantes. De façon intéressante, le processus apoptotique est dépendant de l'inhibition de Hes1 ainsi que de l'induction de la protéine NOXA. De plus, cette étude montre un effet synergique du GSI-XII avec la doxorubicine ou encore le melphalan dans différents modèles murins. Curieusement, et contrairement au GSI-15, la sensibilité des lignées au GSI-XII n'est pas liée à l'expression des différents acteurs de la voie NOTCH. Ainsi, la lignée U266 qui n'exprime ni NOTCH1 ni JAG1 et ni JAG2 est résistante à l'apoptose induite par le GSI-15 mais est très sensible à l'apoptose induite par le GSI-XII.

Il semble donc que ces différentes molécules, ciblant la même protéase, n'aient pas le même mécanisme d'action. Ceci remet en cause leur spécificité d'inhibition de la voie Notch. En effet, la γ -sécrétase est impliquée dans le clivage de nombreuses protéines transmembranaires (plus de 20 décrites aujourd'hui) ce qui a pour conséquence de moduler différentes voies de signalisation (Kopan et Ilagan, 2004).

Par ailleurs, le GSI-I est décrit pour avoir une forte activité inhibitrice du protéasome dans le cancer du sein (Han et al., 2009). Le GSI-I a une structure proche de celle du GSI-XII, et étant donné que les mécanismes impliqués dans l'apoptose induites par le GSI-XII dans le MM sont très similaires à ceux impliqués dans l'apoptose induite par le bortézomib (Gomez-

Bougie et al., 2007), il serait intéressant d'étudier l'implication de cet effet secondaire potentiel dans les mécanismes d'action décrits.

Les GSI inhibent de nombreuses voies de signalisation autres que la voie Notch, ne permettent pas de dissocier les voies de signalisation induites par les récepteurs NOTCH1 ou NOTCH2 et, provoquent une forte toxicité intestinale *in vivo*. Pour ces raisons, des anticorps à usage thérapeutique ciblant directement les récepteurs NOTCH1 ou NOTCH2 sont en cours de développement et des études préliminaires montrent une absence de toxicité intestinale (Wu et al., 2010). L'utilisation de ces nouveaux outils apparaît aussi nécessaire *in vitro* afin de vérifier les différents résultats acquis avec le GSI.

La majorité des études montre l'importance de la voie Notch dans l'interaction entre les cellules myélomateuses et leur microenvironnement. De plus, la capacité d'induction d'IL6, facteur de croissance paracrine essentiel dans la progression du MM, et la capacité d'augmenter l'activité ostéoclastique, symptôme clinique prépondérant, font de la voie Notch une voie oncogénique supplémentaire dans la biologie du MM.

Cependant, les résultats hétérogènes et contradictoires présentés dans les différentes études ne permettent pas de conclure sur l'importance de la voie Notch dans l'initiation ou encore la progression du MM. De plus, ceci montre les difficultés d'étude de cette voie notamment par le manque d'outils spécifiques.

PUBLICATION

ARTICLE 3 :

La clonogénicité des cellules de myélome multiple est médiée par une autocrinie IGF-1 et/ou SCF et dépend de l'expression de JAG2

→ Introduction et résultats

Modèle de clonogénicité

Dans cette étude, nous avons analysé la capacité clonogénique des cellules de MM dans un milieu semi-solide à base de collagène sans sérum ni cytokine. Ce milieu est originellement défini pour la culture clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques humains. Il est notamment utilisé dans les laboratoires d'hématologie pour évaluer la qualité fonctionnelle des greffons hématopoïétiques.

Les cellules de MM y sontensemencées à faible densité (1000 cellules/mL), ce qui permet de limiter les agrégats cellulaires et d'étudier la formation de colonies provenant exclusivement de cellules isolées. Après 21 jours d'incubation, les colonies formées sont transférées sur lames et comptées manuellement après coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG).

Tout d'abord, ce test nous a permis d'étudier le rôle des facteurs de croissance et des cytokines individuellement sans sérum. En effet, le sérum maintient les cellules en culture dans un milieu où elles peuvent survivre et proliférer indéfiniment. Cependant, la présence de protéines indéterminées dans le sérum est un frein quant à l'étude précise des mécanismes impliqués par l'ajout de facteurs exogènes. Ainsi, en utilisant ce modèle, notre équipe a mis en évidence que l'IGF-1 et l'IL6 sont deux facteurs essentiels dans la physiopathologie du MM (Collette et al., 2007 ; Ménoret et al., 2008).

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence que, sur un panel de 32 lignées de MM, 8 (25%) ont la capacité de former des colonies sans apport de facteur exogène et sont donc caractérisées par une capacité de clonogénicité spontanée (autorenouvellement). Le but de cette étude est de déterminer les mécanismes impliqués dans cette capacité d'autorenouvellement (Figure 31).

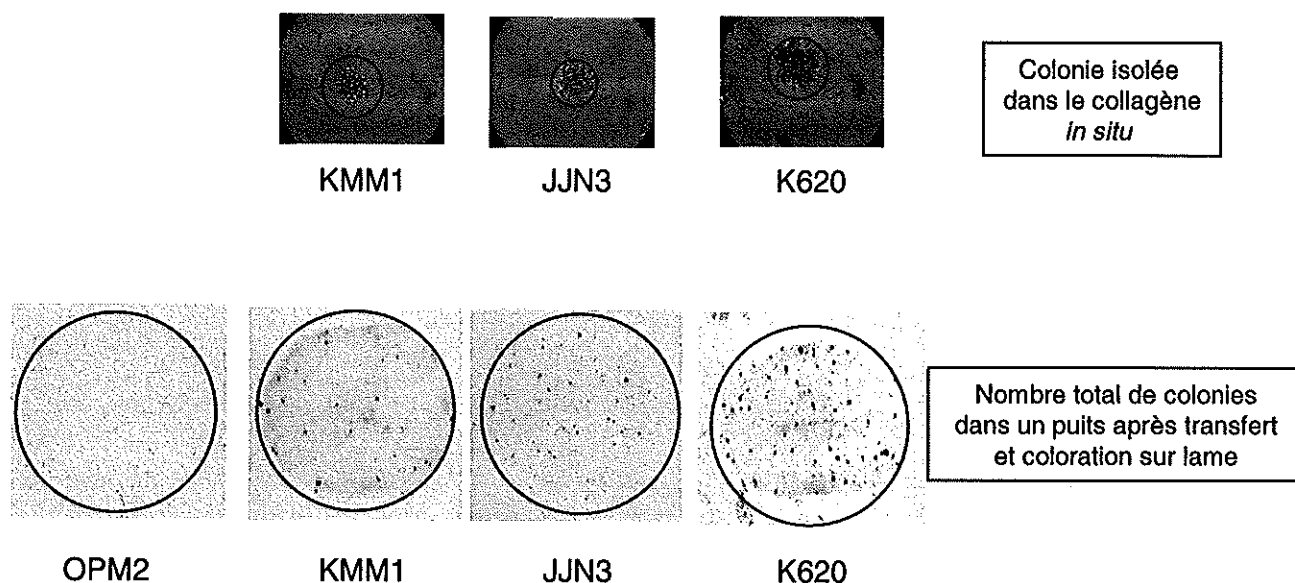


Figure 31 : Clonogénicité spontanée des cellules de MM en milieu semi-solide

Les lignées KMM1, JJN3 ou encore K620 forment des colonies spontanément à J+21 sans sérum, ni cytokine exogène. OPM2 ne montre pas cette propriété.

La capacité clonogénique corrèle avec la présence de mutation de RAS

Alors que la capacité de clonogénicité spontanée n'est pas liée à l'hétérogénéité génétique des lignées de MM (translocations) ou encore au statut p53, une forte association avec la présence de mutations de *RAS* (*NRAS* ou *KRAS*) est révélée. En effet, 88% des lignées qui clonent spontanément ont une mutation de *RAS* décrite contre seulement 37,5% pour les autres lignées ($p = 0,037$).

La capacité clonogénique corrèle avec la surexpression de JAG2

L'étude des profils d'expression génique des lignées, obtenus grâce à la technique des puces pangénomiques (Affimétrie), met en évidence une forte surexpression de JAG2, ligand de la voie Notch, dans les 8 lignées qui clonent de façon spontanée. Cette surexpression a

ensuite été confirmée par RT-PCR, Western Blot et cytométrie en flux. La capacité de clonogénicité spontanée est hétérogène, allant de 5% à 40% des cellules ensemencées en fonction de lignées. De façon intéressante, cette hétérogénéité est associée au niveau d'expression membranaire de JAG2, renforçant ainsi son rôle potentiel ($r=0,87$).

Afin de mettre en évidence le rôle fonctionnel de la voie Notch dans la clonogénicité, nous avons, dans un premier temps, utilisé des protéines NOTCH-Fc afin de bloquer les interactions entre les récepteurs NOTCH et leurs ligands. La présence des NOTCH-Fc induit une forte inhibition (90%) de la clonogénicité. Ensuite, afin d'étudier l'implication directe de JAG2, nous avons utilisé un système de modulation stable par shRNA dans 2 lignées (JN3, KMM1). La forte diminution de JAG2 résulte en une forte inhibition de la capacité clonogénique.

En ensemencant à faible densité les cellules de MM dans un milieu liquide sans sérum, ni cytokine, nous obtenons des conditions proches de celles présentes dans le milieu semi-solide. Nous avons alors constaté une baisse de prolifération accompagnée d'une augmentation de la mortalité des cellules shJAG2 par rapport aux contrôles.

Enfin, après injection sous-cutanée chez la souris immunodéficiente, nous avons mis en évidence que la réduction de l'expression membranaire de JAG2 sur les cellules myélomateuses induit une diminution de leur potentiel tumorigénique.

JAG2 est exprimé chez les patients

Afin d'étudier l'expression de JAG2 chez les patients, nous avons utilisé la technique de RT-PCR sur 30 échantillons. Nous observons alors des profils hétérogènes : 8 expriment fortement JAG2, 12 faiblement et 10 ne semblent pas l'exprimer. L'analyse cytométrique de JAG2 sur les plasmocytes primaires de 4 patients au diagnostic, ou encore de 2 patients en phase leucémique montre une faible sous population de cellules JAG2+, représentant de 0,05% à 1,7% des cellules CD138+.

Implication de l'IGF-1/IGF1R

L'IL6 et L'IGF-1 exogènes sont les 2 principaux inducteurs de colonies dans le MM (Colette et al., 2007). Alors que le CD45 inhibe les voies de signalisation induites par l'IGF-1, elle favorise celles induites par l'IL6 (voir p.20). En absence de CD45, les cellules myélomateuses répondent à l'IGF-1 par une forte induction des voies Erk et Akt. Les lignées cellulaires formant des colonies spontanées sont caractérisées par une activation constitutive de ces voies, de plus, elles ont un phénotype CD45- ou CD45+/- (sous populations CD45+ et

CD45- dans NCI-H929, JLN3 et XG11). Nous avons alors évalué l'implication d'une boucle autocrine IGF-1 dans la clonogénicité spontanée. D'une part, l'analyse des puces géniques révèle que la majorité des lignées de MM exprime à la fois l'IGF1 et l'IGF1R, confirmant l'implication potentielle de cette voie. Par ailleurs, la présence d'un anticorps neutralisant l'IGF1R dans le milieu semi-solide, inhibe partiellement ou totalement la formation spontanée de colonies selon les lignées.

- Implication de C-KIT/SCF

Nous avons mis en évidence que 2 des 8 lignées clonogéniques (XG11, JLN3) expriment fortement le récepteur C-KIT et sécrètent aussi le ligand SCF. L'utilisation de l'imatinib mesylate ou d'un anticorps neutralisant le SCF nous a permis de mettre en évidence l'implication d'une boucle autocrine SCF dans la clonogénicité de ces 2 lignées. De plus, nous avons démontré que le SCF induit une forte activation des voies Erk et Akt dans ces lignées. La lignée K620 exprime aussi C-KIT, ce dernier pourrait être constitutivement actif car bien qu'elle n'exprime pas le SCF, l'imatinib mesylate inhibe partiellement son potentiel clonogénique.

D'autre part, nous avons mis en évidence que les lignées C-KIT+, ont une expression de JAG2 beaucoup plus élevée que les lignées C-KIT-. L'imatinib induit une forte inhibition de l'expression membranaire de JAG2 sur les lignées C-KIT+ contrairement aux lignées C-KIT-. L'activation de cette voie pourrait donc être impliquée dans la surexpression observée.

IGF-1R et C-KIT exprimés chez la majorité des patients

Les deux récepteurs principalement impliqués dans la clonogénicité spontanée des lignées de MM sont donc l'IGF-1R et C-KIT. Afin de déterminer leur expression sur les cellules primaires de patients, nous avons utilisé une base de données publiques comprenant le profil d'expression génique de 414 patients au diagnostic (Zhan et al., 2006). 53% des patients expriment l'un ou l'autre, 27% expriment à la fois l'IGF1R et C-KIT, et 20% n'expriment aucun des 2. Ces récepteurs peuvent donc être impliqués dans la majorité des cas de MM.

Clonogenic ability of myeloma cells mediated by IGF1 or SCF loop depends on JAG2 expression

David Chiron^{1,2,3}, Sophie Maïga^{1,2,3}, Géraldine Descamps^{1,2,3}, Séverine Marionneau⁴, Thibault Ouiller⁴, Jérôme Moreaux^{5,6,7}, Bernard Klein^{5,6,7}, Philippe Moreau^{3,8}, Jean-Luc Harousseau^{3,9}, Régis Bataille^{1,2,3,10}, Martine Amiot^{1,2,3}, Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2,3}

1 INSERM, U892, Nantes, F-44007, France; 2 Therapeutic Research Institute of Nantes University, Université de Nantes, UFR Médecine, Nantes, France; 3 CERM, Center for Myeloma Research, CHU Nantes, Nantes, France; 4 Plate-forme in vivo, Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France; 5 INSERM, U847, Montpellier, F-34197 France; 6 Université Montpellier1, UFR Médecine, Montpellier, France ; 7 CHU Montpellier, Institute of Research in Biotherapy, F-34285 France; 8 Service d'Hématologie, CHU Nantes; 9 CRLC Nantes, Saint-Herblain, France; 10 CRLC Angers, Angers, France

Correspondence

Catherine Pellat-Deceunynck, PhD, INSERM, U892, Centre de Recherches en Cancérologie Nantes Angers, IRT-UN, 8, quai Moncousu, Nantes, BP70721 F-44007 France. Ph 33 2 28 08 02 98, Fax 33 2 28 08 03 29, catherine.pellat-deceunynck@inserm.fr

This work was supported by grants from INCa (PL06_070), Ligue Nationale Contre le Cancer Equipe labellisée 2008 and Cancéropôle Grand-Ouest (AO2009 Cellules souches). We thank Pr H Avet-Loiseau for providing us with purified bone marrow myeloma cells from patients at diagnosis and Dr P Hulin for image captures (MicroPICell, IFR26, IRT-UN, Nantes)

Author contribution

- DC performed research and participated in the design of the study and in writing the manuscript
- SM performed research
- GD performed research
- SM performed xenografts
- TO performed xenografts
- JM provided XG10, XG11, XG12, XG13 and XG16 cell lines and participated in the bioinformatic study
- BK provided XG10, XG11, XG12, XG13 and XG16 cell lines and participated in the bioinformatic study
- PM collected bone marrow samples
- JLH collected bone marrow samples
- RB participated in the design of the study and writing the manuscript
- MA participated in the design of the research and in writing the manuscript
- CPD performed research, participated in the design of the study, in the bioinformatic studies and in writing the manuscript

Abstract

The purpose of this study was to identify the pathways associated with the ability of human myeloma cells to provide colonies in a serum-free semi-solid human collagen-based assay. Only 25% (8 of 32) of human myeloma cell lines were able to provide colonies spontaneously and this capacity to grow correlated with *RAS* mutations ($p=0.04$). Gene expression profile analysis identified one gene, *JAG2*, overexpressed in cell lines that are able to provide colonies spontaneously. Blocking Jag-Notch interactions with Notch-Fc chimeric molecules impaired self-colony formation underlying a role for Jag-Notch pathway in colony formation. Furthermore, silencing *JAG2* blocked colony formation in two myeloma cell lines that was associated with proliferation arrest and cell death. Xenograft in immunocompromised mice showed that *JAG2* silencing impaired in vivo tumor growth. RT-PCR evaluation of *JAG2* expression showed that 20 of 30 CD138+ purified primary myeloma cells expressed *JAG2* and a subpopulation JAG2+ was identified by flow cytometry in CD138+ MM cells. Finally, we demonstrated that clonogenic growth of myeloma cell lines was mediated by either IGF1/IGF1R or SCF/C-KIT loop underlying the role of these two tyrosine kinase receptors.

Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a plasma-cell malignancy with a high degree of biological and genetic heterogeneity at presentation and a great variability with regards to the clinical outcome of the patients in response to chemotherapy, and survival ranging from a few weeks to more than 10 years (1). Combined studies of genotype, phenotype and response to treatments have brought up the now well-known concept of many and multiple myelomas (2,3). Despite heterogeneity and new treatments, MM remains a fatal disease suggesting that resistant MM cells are rarely eradicated. Indeed, remaining MM cells at day 100 after high-dose melphalan and autologous transplant is a powerful prognostic factor for relapse and overall survival (4). Cancer stem cells (CSCs) are a subpopulation of tumor cells that selectively possess tumor initiation, self-renewal capacity and the ability to give rise to bulk populations of non tumorigenic cancer cell progeny through differentiation. CSCs have been identified in both hematological and solid malignancies (5). Signaling in stem cells involve numerous pathways, including Notch, Kit, Wnt, Hedgehog and hypoxia (6-9). In MM, clonogenic cells have been addressed since more than 30 years (10). The origin of MM “stem” cells, plasma cells or B cells, is still a matter of debate, (11-12). Matsui et al have reported that CD138⁺CD19⁺CD20⁺ cells, even present in Human Myeloma Cell Lines (HMCLs), are the MM “stem cells” (11). However, a recent report has shown that clonotypic memory B cells bear Ig translocation but not Ras mutations of MM cells arguing against a malignant B-cell reservoir (12). HMCLs that represent a concentrate of clonogenic MM cells always derived from in vivo proliferating MM cells in refractory patients mostly in terminal relapse although we recently obtained a HMCL from a patient at diagnosis with acute refractory disease (13 and unpublished data).

The concept of CSCs is based on the capacity of some cells to provide colonies in semi-solid assay or tumors in immunocompromised animal models. Recently, the use of more highly immunocompromised NOD/SCID interleukin-2 receptor gamma chain null IL2R γ ^{-/-} mice has shown that detection of tumorigenic melanoma cells increased by several orders of magnitude suggesting that tumorigenic cells are common in some human cancers (14).

To evaluate the clonogenicity of myeloma cells, we have developed a serum-free semi-solid collagen-based clonogenic assay in which most HMCLs provide colonies only in the presence of IL6 or to a less extent of IGF1 (15). In the present study, we focused on HMCLs that were able to provide spontaneous colonies in the absence of serum, growth factors or cytokines. We demonstrated that self-colony formation correlates to the presence of *RAS* mutations, depends on JAG2 expression, and is mediated by IGF1/IGF1R or SCF/C-KIT loop.

Materials and Methods

Human Myeloma Cell Lines (HMCLs) and primary myeloma cells

XGs, NANs, BCN, MDN and SBN HMCLs were derived in our laboratories from primary myeloma cells cultured in the presence of 5% fetal calf serum (FCS) and 3 ng/ml recombinant (r) IL-6 as previously described (13,15-17). ANBL-6 was kindly provided by Dr Jelinek (Rochester, USA), KMS-11, KMS12-PE and KMM1 by Dr Otsuki (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan), JJN3 by Dr Van Riet (Brussels, Belgium), JIM3 by Dr MacLennan (Birmingham, UK), Karpas620 by Dr Karpas (Cambridge UK) and MM1S by Dr S. Rosen (Chicago, USA). LP1, L363, NCI-H929, U266 and OPM2 were from DSMZ (Braunschweig, Germany) and RPMI8226 from ATTC (USA). All HMCLs derived in our laboratories and ANBL-6 were cultured in the presence of r-IL-6. Bone marrow and peripheral blood of patients with MM were collected after informed consent at the Nantes University Hospital.

Reagents and antibodies

Notch-Ig and Control-Ig were purchased from R&D. Anti-human Jag2 mAb (clone 241002) and (clone C83A8) were purchased from R&D Systems and Cell Signaling Technology, respectively. APC and PE conjugated anti-CD117 (C-KIT), clone IM3638, was purchased from Beckman Coulter. Blocking anti-IGF1R mAb was purchased from Aventis and blocking Polyclonal Goat Anti-Human SCF Ab was purchased from Peprotech. Anti-phospho-Akt (Ser473) and anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/tyr204) were from Cell Signaling Technology. Imatinib mesylate (Gleevec®) was purchased from LC laboratories and puromycin dihydrochloride from Sigma.

Clonogenic assay

Clonogenic assays were performed in collagen semi-solid medium as previously described (15). This medium is currently used for evaluation of human clonogenic hematopoietic precursors before autologous stem cell transplant of patients with hematologic malignancies. Briefly, myeloma cells (10^3 cells) were plated in 1ml serum-free, cytokine-free, human purified collagen-based, semi-solid medium (Stemalpha III, StemAlpha SA, France) in triplicate (330 μ l/well) in 4-well plates (well diameter 1.5 cm) and grown for 21 days. The gels were harvested on glass slides, dried and stained with May-Grunwald-Giemsa. Number of colonies was counted on triplicate gels by microscopy and expressed as an average per 10^3 cells, only colonies with more than 10 cells were counted.

Jag2 shRNA cell lines

Mission® JAG2 shRNA Lentiviral transduction particles and non-target shRNA control transduction particles were provided by Sigma-Aldrich. The sense strand of the JAG2 shRNA had the following sequence, 5' CCGGCTGTGTGTAAACAAGGGTGTACTCGAGTACACCCTTGTTTACACACAGTTT TTG -3', (Clone ID : NM_002226.3-1132s1c1).

According to the manufacturer's instructions, KMM1 and JJN3 cells were infected with lentiviral vectors delivering JAG2 or non-target shRNAs to generate, cell lines displaying JAG2 silencing (KMM1/JJN3 sh-JAG2), or control cell lines (KMM1/JJN3 sh-CONT), respectively. Three days after infection, cells were selected using puromycin at a predetermined concentration of 8 μ g/mL.

The efficiency of infection was evaluated by Western blot analysis using the Anti-human Jag2 mAb 2 weeks after infection.

Western blotting

Myeloma cells (5 millions/10 ml) were pelleted and resuspended in lysis buffer (10mM Tris-HCL pH=7.6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 2mg/ml aprotinin, 1% Triton X100). After 40 minutes on ice, lysates were cleared by centrifugation at 10,000g for 30 min. at 4°C. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA Protein assay, Pierce, Rockford, IL). Cleared lysates (70 µg) were separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Western blot analysis was performed by standard techniques with ECL detection (Pierce Perbio Science France, Brebières, France).

Xenotransplant

Female SCID beige 6-week-old, mice were purchased from Charles River. Mice were bred and housed in INSERM U892 laboratory under the animal care license n°44565. Tumors were generated by implanting 10×10^6 cells in 100µl of PBS subcutaneously on the right flank above the hind leg of 4 mice per group. Tumor growth was recorded weekly in three dimensions using a digital caliper. Tumor volume was calculated as follows: length x width x depth.

RT-PCR detection of *Jag2* expression

For RT-PCR study, myeloma cells were purified with anti-CD138 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) from mononuclear cells isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation. RNA isolation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction were performed as previously described (17). Primers used for Jag2 detection had the following sequences: 5'AGGTGGAGACGGTTGTTACG3' and 5'TTGCACTGGTAGAGCACGTC3'.

The primary myeloma cells were isolated from bone marrow (n=30) or peripheral blood (n=2) from patients at diagnosis (n=20) or relapse (n=12).

Gene expression profiling

HMCLs were cultured with or without IL-6 (as described above) and RNA were prepared from exponentially growing cells. Biotinylated cRNA was amplified with a double *in vitro* transcription and hybridized to the human U133 2.0 plus GeneChips, according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). Fluorescence intensities were quantified and analyzed using the GECOS software (Affymetrix). Gene expression data of HMCLs (Moreaux et al, submitted) were normalized with the MAS5 algorithm and analyzed with our bioinformatics platforms: RAGE(<http://rage.montp.inserm.fr/>) and Amazonia (<http://amazonia.montp.inserm.fr/>).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Wilcoxon rank sum test, Fisher exact test, Chi-square, Pearson and Student t tests.

Results

Colony formation correlates with *RAS* mutations and IL6 independency

To evaluate the clonogenic ability of 32 HMCLs (Table 1, Figure 1A) we used a collagen-based semi-solid medium previously described where most HMCLs were unable to provide any colony without added FCS or cytokines (15). In this assay, we identified that IL6 and to a less extent IGF1 were the main factors able to induce colony formation. Without FCS, 24 HMCLs were unable to provide colonies (Group 1) and 8 HMCLs provided colonies spontaneously, Group 2 (Figure 1B, Table 1). Clonogenic ability of HMCLs was not related to the genetic heterogeneity of HMCLs ($p=0.96$, Fisher exact test, Table 1). Our HMCL collection gathers IL6-dependent and IL6-independent HMCLs. Ability to form colonies was significantly related to the IL6 status of HMCLs because IL6-type HMCLs were more frequent in Group 1 (17 of 24) than in Group 2 (2 of 8), $p=0.038$. We next wondered whether colony formation could be related to *RAS* or *TP53* mutations because both have been reported to favor colony formation. Indeed, spontaneous clonogenicity of HMCLs was associated with the presence of *RAS* (N or K), $p=0.037$ Fisher exact test (Table 1, Table S1). In contrast, no significant difference in *TP53* abnormalities was found between the 2 groups of HMCLs ($p=0.43$).

Clonogenic ability of HMCLs correlates to *JAG2* expression

To address the ability of spontaneous self-renewal of HMCLs, we looked for genes differentially expressed between the 2 HMCL groups. A SAM multiclass analysis (1000 permutations, False Discovery Rate=0) identified 3 probe sets differentially expressed, all overexpressed in Group 2: 2 specific for *JAG2* and 1 for *TEAD4*. As shown in Table 1, Figures 2A and S1A, *JAG2* and *TEAD4* expression correlated to spontaneous colony formation ($p=0.00017$ and $p=0.0005$, respectively). Jagged2 is a NOTCH ligand and TEAD4, a member of the transcription enhancer TEF family, is involved in the hippo pathway (18). Because both *RAS* mutations and *JAG2* expression were associated to clonogenicity, we wondered whether *RAS* mutations and *JAG2* expression were directly correlated. Indeed, we found that *JAG2* low/negative HMCLs (cut-off Affymetrix value of <100 corresponding to lack of protein detection by Western blot) were mostly *RAS* wt (73%) whereas *JAG2*⁺ HMCLs (≥ 100) were mostly *RAS* mutated (71%), $p=0.03$ Fisher exact test. Reciprocally, *RAS* wild-type HMCLs have a trend to express less *JAG2* (median 39, range 13-1089) than *RAS* mutated HMCLs (median 125, range 10-1696), $p=0.073$. On the other hand, no correlation was found between *TEAD4* expression and presence of *RAS* mutations ($p=0.43$).

JAG2 expression was reported inversely correlated to *SMRT/NCoR2* repressor expression in MM (19). However, *SMRT/NCoR2* was strongly expressed in quite all HMCLs (Figure S1B) and we did not find that *SMRT/NCoR2* was differentially expressed between *JAG2* positive+ HMCLs (≥ 100) as compared with low/negative (<100) ones ($p=0.9$) and none correlation was found, Spearman test (Figure S1C).

SAM analysis (1000 permutations, FRD=0) of *JAG2*⁺ (≥ 100) versus low/negative (<100) HMCLs only identified *TEAD4* ($p<0.001$) and a direct correlation ($r=0.73$) between *TEAD4* and *JAG2* expressions was found, $p<0.001$, Spearman test (Figure S1C). However, silencing *JAG2* did not decrease *TEAD4* expression and reciprocally silencing *TEAD4* did not decrease *JAG2* expression too (data not shown).

Silencing *JAG2* prevents colony formation and induces cell death

The microarray expression of *JAG2* fully correlated to both RT-PCR detection (data not shown) and protein detection measured either by Western blot or flow cytometry (Figure 2A-C). As previously reported, HMCLs widely expressed *JAG1* and the receptors *NOTCH1* and *NOTCH2* (20-21) but no correlation with colony formation was found (Figure S1D-F, $p>0.4$). Interestingly, flow cytometry analysis of *JAG2* expression showed that the level of membrane *JAG2* expression positively correlated ($r=0.87$) to the percentage of colony formation, $p=0.0045$, Spearman test (Figure 2C).

To further explore *JAG2* involvement in clonogenicity we first used Notch-Fc chimeric proteins that blocks NOTCH-JAG interactions. As illustrated in Figure 2C, addition of either NOTCH1-Fc or NOTCH2-Fc inhibited self-colony formation (90% inhibition, $p<0.01$). To specifically demonstrate a *JAG2* involvement, we used a shRNA approach to silence *JAG2* expression in two HMCLs, KMM1 and JJN3. Protein expression of *JAG2* was decreased by more than 90% in both KMM1 and JJN3 (Figure 2E). This decrease fully blocked the emergence of spontaneous colonies: the colony number was decreased by 90% for KMM1 and 82% for JJN3, respectively $p=0.001$ (Figure 2E).

To address whether lack of clonogenicity was related to cell death or lack of proliferation, we cultured KMM1 and JJN3 at very low concentration (30 000 cells/ml) in liquid medium containing RPMI 1640 supplemented with 0.5% BSA. In good correlation with spontaneous colony formation, both KMM1 and JJN3 cells were able to grow in this FCS-free medium: the fold increase within 3 days was 2.6 ± 0.1 for KMM1 and 2.3 ± 0.4 for JJN3, respectively (Figure S2A-B left). In contrast, growth of both sh*JAG2* KMM1 and JJN3 cells was significantly blocked: the fold increase within 3 days was 1.0 ± 0.5 for KMM1 and 0.4 ± 0 for JJN3, $p=0.01$ and $p=0.05$ respectively. The proportion of cell death was increased by 2.6 ± 0.8 fold (KMM1) and 2.6 ± 0.3 fold (JJN3) in sh*JAG2* cells as compared with respective shCONT cells, $p=0.006$ and $p=0.05$ respectively (Figure S2A-B right). Interestingly, in the presence of FCS, but not of IGF1, no more significant differential growth or survival was observed between shCONT and sh*JAG2* cells in both KMM1 (Figure S2A) and JJN3 (data not shown).

Silencing *JAG2* prevents in vivo growth in SCID mice

Control and *JAG2*-silenced JJN3 and KMM1 HMCLs were injected to the mice subcutaneously. As compared with the one of shCONT HMCLs, growth of both sh*JAG2* KMM1 and JJN3 was significantly impaired ($p<0.05$): 14 days after transplantation, the median tumor volumes were 10-fold lower in mice transplanted with sh*JAG2* KMM1 and JJN3 as compared with the ones transplanted with shCONT HMCLs, Figure 3. While shCONT tumors went on growing, sh*JAG2* tumors were undetectable after 3 weeks.

JAG2 is expressed in primary cells

Affymetrix microarray analysis of *JAG2* expression in primary cells was impossible because of a too weak signal (data not shown). Thus, we looked at *JAG2* expression by RT-PCR in purified myeloma samples. We found a strong expression in 8 patients, a weak one in 12 and no expression in 10 patients analyzed (as illustrated in Figure 4A). No correlation was found between *JAG2* expression and the disease stage (diagnosis versus relapse). Using a

recently available anti-JAG2 mAb that allows flow cytometry analysis, we could identify a very tiny population of JAG2⁺ cells among the CD138⁺ myeloma population in two consecutive patients with leukemic phase at relapse (patient A) or diagnosis (patient B): 0.5% and 1% of CD138⁺ MM cells express JAG2 in MM cells of patients A and B, respectively (Figure 4B). In bone marrow purified myeloma cells from 4 patients at diagnosis, few JAG2⁺ cells were also found: the median value was of 0.6% with a range from 0.05% to 1.7% (data not shown). For one of 4 patients (patient 8), both RT-PCR and cell staining of medullary myeloma cells could be performed: a weak expression was found by both RT-PCR and cell staining (Figure 4A-B).

Autonomous colony formation depends on autocrine activation of tyrosine kinase receptors, IGF1R or C-KIT.

We previously reported that IL6 and IGF1 were the main factors able to induce colony formation of myeloma cells and that colony formation in the presence of IGF1, but not IL6, correlated to a strong activation of both ERK and AKT (15-16). Moreover, IGF1 signaling, in contrast to IL6, is favored by a low or lack of expression of the tyrosine phosphatase CD45 (15,22-23). Because HMCLs providing spontaneous colony formation have a constitutive activation of both ERK and AKT (data not shown) and are all CD45⁻ except XG11 we wondered whether an IGF1 loop was involved. Indeed, a blocking IGF1R mAb prevented spontaneous colony formation (from 28% to 97%) in 7 of 8 HMCLs (Figure 5A). IGF1R expression of all HMCLs by Affymetrix microarray or flow cytometry showed that all HMCLs of group 2 express IGF1R with a fluorescence ratio of expression ranging from 2.8 up to 15 (Figure S3A-B). Inhibition of colony formation of XG11 was quite surprising since XG11 express CD45, although heterogeneously, that impairs IGF1 signaling (22-23). However, XG11 expresses strongly IGF1R (immunofluorescence ratio=15) suggesting that IGF1 signaling rather depends on the ratio between IGF1R and CD45 expression. Concerning KARPAS620, despite *IGF1R* and *IGF1* coexpression no inhibition was found suggesting that this HMCL does not use IGF1 loop for growth (Figure S3).

On the other hand, XG11, JJN3 (50% of cells), and KARPAS620 express C-KIT (Figure 5C,D), and the blocking IGF1R mAb did not inhibit (KARPAS620) or partially inhibited (JJN3, XG11) colony formation suggesting that these HMCLs use other pathway(s). Because XG11 and JJN3 also express *KITL* (SCF), we investigated the role of a possible SCF-C-KIT loop by using both an inhibitor of C-KIT signaling (Imatinib mesylate or Gleevec) and a blocking anti-SCF mAb (24-25). Imatinib mesylate (10 μ M) reduced the number of colonies of XG11, JJN3 and KARPAS620 (90% $\pm$ 10, 70% $\pm$ 5%, and 38% $\pm$ 1% inhibition, respectively) but did not affect KMM1 and RPMI8226 colony formation (Figure 5E). Involvement of SCF loop in colony formation was confirmed in XG11 with a blocking SCF mAb (5 μ g/ml) that reduced the colony formation (55% $\pm$ 5.6% inhibition) but did not affect KMM1 colony formation (data not shown). In XG11 and JJN3, SCF induces a strong activation of both AKT and ERK (Figure 5F). Concerning KARPAS620, despite lack of *KITL* expression, AKT and ERK1/2 were self-phosphorylated and SCF did not increase their phosphorylation level. However, since Imatinib mesylate reduced KARPAS620 colony formation, we can propose that C-KIT signaling is abnormally regulated in this cell line and requires further investigation.

In summary, autonomous self-renewal of MM cells was mediated by an autocrine IGF1 or SCF activation of their respective tyrosine kinase receptors, IGF1R or C-KIT, that both activate AKT and ERK1/2 signaling (Figure 5, 22-25).

All 3 *C-KIT*⁺ HMCLs highly express *JAG2* with a significant higher expression as compared with the 11 other *JAG2*⁺*C-KIT*⁺ HMCLs ($p=0.038$), Figure 2C. It has been reported in mice that *JAG2* expression is dependent on C-KIT in DCs and increased through C-KIT on endothelial cells (26,9). To address a possible relationship between C-KIT and *JAG2*, we treated HMCLs with Imatinib mesylate and monitored *JAG2* expression by flow cytometry. In all the *C-KIT*⁺ HMCLs, but not in negative ones (as illustrated by KMM1), *JAG2* expression decreased by $69\%\pm 8\%$ after a 48-h culture with $20\mu\text{M}$ Imatinib mesylate (Figure S4A).

On the other hand, U0126 that is well known to prevent RAS-MAPK activation (16) reduced *JAG2* expression in the 4 HMCLs evaluated, $50\%\pm 9\%$ (Figure S4B).

Primary myeloma cells frequently express either *IGF1R* or *C-KIT*

The self-growth of 8 HMCLs revealed that it is mainly dependent on autocrine tyrosine receptor activation, either IGF1R or C-KIT (or on both). To address expression of *C-KIT* and *IGF1R* in primary myeloma cells, we used Amazonia database containing public data from 414 patients at diagnosis published by Arkansas University (27,28). Expression of *C-KIT* and *IGF1R* was found in 56% and 50% of patients at diagnosis, respectively: 53% of patients express one or the other receptor, 27% express both and 20% express none, Table 2A. Expression of receptors is not similar with regard to the molecular classification of patients as previously shown by cytometry (28-32): indeed, MS patients underexpress *C-KIT* ($p<0.001$) but overexpress *IGF1R* ($p<0.001$), in full contrast to HY patients who overexpress *C-KIT* ($p<0.001$) but underexpress *IGF1R* ($p<0.001$). Moreover, *IGF1R* expression is lower on *C-KIT*⁺ patients as compared with *C-KIT*⁺ ones ($p=0.049$). Of note, CD-1 and CD-2 patients underexpress both *C-KIT* ($p=0.039$) and *IGF1R* ($p<0.001$), Table 2B.

Discussion

In this study we explored the molecular bases of spontaneous myeloma clonogenicity in a collagen-based assay. The self-growth of 8 HMCLs was mainly dependent on autocrine tyrosine receptor activation, either IGF1R or C-KIT. Interestingly, 53% of primary myeloma cells at diagnosis express one or the other receptor, 27% express both and 20% do not express any, suggesting that most MM cells could grow through IGF1R and/or C-KIT. IGF1R expression at diagnosis is associated with a reduced survival (29). Interestingly, most primary MM cells do express *IGF1*, although it remains unclear whether this expression is autonomous or depends on microenvironment (Table 2, 28). IGF1R signaling is favored by a lack of CD45 expression and MM patients lacking CD45 overexpress IGF1R (29,31). C-KIT expression is associated with a rather good prognosis reflecting perhaps that quite all hyperdiploid patients (88%), who have the best survival prognosis, express C-KIT (27,32). KITL/SCF is produced by the microenvironment, only 1.9% of the patients (8 of 414) express *KITL*. Interestingly, these few patients belong to the CCND1-2 (n=5), MAF (n=2) and hyperdiploid (n=1) groups and most of them (75%) coexpress *C-KIT*. In HMCLs, C-KIT is expressed by JJN3 (MAF), KARPAS620 and XG11 (CCND1), and XG4 (without recurrent 14q32 translocation) and both JJN3 and XG11 coexpress *KITL*. Of note, previous evaluation of C-KIT expression on JJN3 and KARPAS620 did not show any expression probably because of a lower efficiency of the previously mAb used (32). Interestingly, although self-renewal is mediated either by IGF1R or C-KIT (or both for JJN3 and XG11), signaling through IGF1R or C-KIT induces AKT and ERK phosphorylation mediating both growth of myeloma cells (15,22-25). PI3K/AKT/mTOR is an identified pathway of myeloma resistance to treatment (33).

Although required, IGF1 or SCF loop remains insufficient to promote self-growth. Indeed, we showed that HMCLs that do spontaneously grow are heavily RAS mutated (all but XG11) and overexpress JAG2.

It is well known that *RAS* mutations favor permanent RAS activation and thus downstream ERK signaling and proliferation. In normal condition of liquid culture, in the presence of FCS with IL6 for IL6-dependent HMCLs or without for the others, no significant difference in gene expression was found between *RAS* wildtype and *RAS* mutated HMCLs suggesting that RAS pathway was always activated in all HMCLs (data not shown). However, in clonogenic assay without FCS, *RAS* wild-type HMCLs were far less able than mutated ones to survive and grow, $p=0.02$ Fisher exact test. Of note, all HMCLs with a spontaneous clonogenicity exhibit a basal P-ERK in RPMI1640 alone. In MM, *RAS* mutations are found at all stages of the pathology and their frequency increases with transitions from MGUS to MM and from intramedullary to extramedullary MM (34-35). Of major interest, in mice knockout for *Ras-GFR1*, a RAS effector, microarray analysis has shown that 7 genes, including *JAG2*, were down regulated in the hippocampus (36). Of note, *JAG2* expression decreased on HMCLs treated with U0126, an inhibitor of RAS-MAPK pathway. In breast cancer, Ras and Notch pathway also cooperates for survival and proliferation in semi-solid assays (37).

Colony formation was clearly correlated to JAG2 because blocking JAG-NOTCH interactions or *JAG2* silencing prevented colony formation. Interestingly, silencing *JAG2* expression blocked short-term autonomous growth and induced cell death in the absence of FCS. IGF1 could not rescue the *JAG2*-silenced cells indicating that IGF1 could not account for FCS. Moreover, in vivo growth of *JAG2* silenced HMCLs in immunocompromised mice was abrogated. Notch pathway is mainly involved in self-renewal of normal hematopoietic stem cells and *JAG2*, but not *JAG1*, expression at the cell membrane is increased by SCF on

endothelial cells (9). Interestingly, Yustein et al reported that ectopic expression of JAG2 increases hypoxic growth and tumorigenesis in a B-cell model (38). In MM, JAG-NOTCH pathway has been reported associated with proliferation and cell survival (20-21,39). NOTCH triggering by JAG1 increases proliferation of HMCLs, activation of NOTCH1 pathway protects myeloma cells from drug-induced apoptosis and gamma-secretase inhibitor induces MM cell death (20-21,39). JAG2 expression has been addressed by Houde et al who reported an ubiquitous expression of JAG2 expression in MM (linked to hypomethylation of JAG2 promotor) identifying JAG2 as a myeloma associated marker (40). More recently, the same team reported that JAG2 expression was not due to hypomethylation but to lack of expression of SMRT/NCoR2 since modulation of SMRT/NCoR2 expression induced JAG2 expression change (19). In contrast and in good correlation with our data, Nefedova et al have shown that JAG2 was not expressed by all HMCLs (21) and microarray data shows that SMRT/NCoR2 is widely expressed by all HMCLs (confirmed by RT-PCR, data not shown) and without any link with JAG2 expression (Figure S1C).

On the other hand, we found that *JAG2* expression positively correlated to *TEAD4* expression and *RAS* mutation. TEAD1 and TEAD4, through their interaction with YAP, have been reported to mediate the hippo pathway that is essential in development in insect and mammalian at least through its regulation of organ size (18,41). Target genes of hippo pathway include SURVIVIN, MYC, SOX4 and MCL1 (42). In numerous cancer cells, hippo pathway is aberrantly activated deregulating both proliferation and survival (43). On the other hand, *JAG2* is a target of Hedgehog pathway frequently deregulated in cancer cells and involved in tumor maintenance of myeloma cells (8,42). Silencing *TEAD4* in KMM1 did not impact JAG2 expression and reciprocally, silencing *JAG2* did not modify TEAD4 expression (data not shown). These data suggest that both *TEAD4* and *JAG2* expressions could be rather under the control of a same pathway and not related to each other.

Some HMCLs express (weakly) JAG2 but were unable to clone spontaneously. This inability could be related to an inactive IGF1 loop because of either lack of *IGF1* expression (JIM3, KMS11), or lack of *IGF1R* expression (XG2, XG16) or strong expression of CD45 (XG6) or lack of IGF1R signaling downstream IGF1R (NAN3). Of note, none of these HMCLs does express C-KIT. It was quite surprising that self-renewal of none HMCL was dependent on IL6 loop although IL6 was the most potent cytokine for inducing colony formation (15). Moreover, HMCLs unable to clone spontaneously are more of IL6-dependent type as compared with HMCLs that clone spontaneously ($p=0.038$). Finally, XG11 should be considered as IL6-independent because XG11 cells spontaneously grow in semi-solid medium and removal of IL6 from the liquid culture only very weakly decreased cell growth (data not shown). Concerning XG7, the situation is less clear because only a minor population provides colonies and removal of IL6 from liquid culture partially decreases the growth (data not shown). Taken all these data together, it seems that none spontaneous colony formation was IL6-dependent. However, addition of IL6 has allowed reproducible establishment of 27 HMCLs. Moreover, for several HMCLs established in Montpellier or Nantes, primary cells were cultured with or without added IL6 and primary cells failed to provide HMCLs in the absence of added IL6 (data not shown). This is in favor of a strict exogenous IL6-dependence of MM cells that could explain the lack of IL6 loop involvement in HMCLs that do spontaneously grow.

In primary medullary myeloma cells, RT-PCR analysis of *JAG2* expression suggests that all (strong expression in 8 of 30 samples) or some (weak expression in 12 of 30 samples) tumor cells express *JAG2*. At least in 6 samples, we have identified a medullary or circulating JAG2⁺ CD138⁺ subpopulation in patients. In contrast to *JAG2*, *JAG1*, *NOTCH1* and

NOTCH2 were frequently expressed in primary myeloma cells since a positive expression was found in 98%, 51% and 99% of samples respectively (Amazonia and 44). This pattern of expression is similar to the one of our HMCL panel.

In summary, our data are the first to identify a functional role of JAG2 in MM even though previous reports have pointed out the importance of NOTCH pathway. Survival of MM cells in the absence of serum or growth factors, both *in vitro* and *in vivo* in immunocompromised mice, depends on JAG2 expression and autonomous growth is supported by IGF1R/IGF1 or C-KIT/SCF loop both involving ERK and AKT pathways.

It remains to determine whether the JAG2 subpopulation of primary MM cells is related to cancer progression and/or to tumor cells resistant to treatment. Further work is required to address the function of these JAG2⁺ MM cells in patients.

Legends to figures

Figure 1. Clonogenic growth of HMCLs in semi-solid collagen based assay

A Clonogenic growth of HMCLs in semi-solid collagen based assay. HMCL cells (1000 cells) were seeded 21 days in collagen-based semi-solid medium. Left: images of one CFU-MM (colony forming unit of MM cells) in 3 HMCLs were captured in situ. Right: number of CFU-MM formation was determined after transfer of whole well on glass slide followed by May-Grünwald staining.

B Data represent the number of spontaneous colonies of HMCLs seeded in collagen-based semi-solid medium (1000 cells). Values are the mean $\pm$ SD of at least 5 experiments for each HMCL.

Figure 2. Clonogenic growth of HMCLs depends on JAG2 expression

A,B,C JAG2 expression in HMCLs. (A) Analysis of *JAG2* mRNA expression in HMCLs by micro-array. (B) Analysis of JAG2 expression by Western blot. (C) Mean fluorescence intensity of JAG2 expression in HMCLs; Left: cells were stained with PE-anti-JAG2 mAb (thick line) or with PE-control mAb (thin line). Level of JAG2 expression was evaluated by the mean fluorescence ratio (specific over control staining); Right: the intensity of JAG2 expression correlated to the colony formation frequency. Mean fluorescence intensity ratio of JAG2 expression was plotted against the frequency of colony formation (expressed as % of total seeded cells) for all 8 HMCLs.

D NOTCH-Fc molecules prevented colony formation. Cells were seeded in semi-solid collagen wells in the presence of NOTCH1-Fc, NOTCH2-Fc or Control-Fc molecules (10 μ g/ml). Data represent the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments

E Silencing JAG2 prevented colony formation. Left: Western blot analysis of JAG2 expression in shControl and shJAG2 KMM1 and JJN3 HMCLs. Right: ShControl or shJAG2 KMM1 and JJN3 were seeded in semi-solid collagen wells. Data represent the mean $\pm$ sd of 3 independent experiments. ShJAG2 colonies were expressed as the percentage of shControl CFU-MM formation.

Figure 3. Silencing *JAG2* prevents in vivo growth

Cells (10x10⁶ per mouse) were injected subcutaneously. Data represent the mean $\pm$ SD of tumor volume from four mice for each condition. *: (p<0.05).

Figure 4. Primary MM cells express JAG2.

A RT-PCR expression of *JAG2* mRNA expression in purified CD138+ primary MM cells.

B Flow cytometry expression of JAG2 in myeloma cells. Mononuclear cells were double stained with anti-CD138-PE and control-APC or anti-JAG2-APC mAbs. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the CellQuest program (BD Biosciences). Patient A and B, peripheral blood, patient 8 CD138+ BM MM cells.

Figure 5. Clonogenic growth of HMCLs is mediated by IGF1R or C-KIT autoactivation

A Inhibition of colony formation in the presence of blocking IGF1R mAb (6 μ g/ml). The data represent the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments.

B C-KIT and KITL expression by HMCL collection. Analysis of mRNA expression of *C-KIT* and *KITL* was performed by microarray.

C Flow cytometry analysis of C-KIT expression on XG11, JJN3, KARSPAS620 and KMM1. Overlay histograms represent cells stained with APC-anti-CKIT mAb (thick line) or APC-Control mAb (dashed line). The expression level was expressed as the mean fluorescence intensity ratio of positive staining over control staining (r).

D Clonogenic assays were performed in the presence of 10 μ M Imatinib mesylate. Mean $\pm$ SD of 3 independent experiments.

E Western blot analysis of AKT and ERK1/2 activation induced by SCF (100 ng/ml) in JJN3, XG11 and KARPAS620.

References

1. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1997;336:1657-64.
2. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-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 therapies. *Haematologica* 2006 91:1234-40
3. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome area. *Leukemia*. 2009;23:1941-56.
4. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, Sureda A, Montejano L, Gutiérrez NC, García de Coca A, de Las Heras N, Mateos MV, López-Berges MC, García-Boyero R, Galende J, Hernández J, Palomera L, Carrera D, Martínez R, de la Rubia J, Martín A, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112:4017-23
5. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010;120:41-50
6. Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity*. 2010 Jan 29;32:14-27.
7. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 2010;222:17-22.
8. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4048-53
9. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6:251-64.
10. Hamburger A, Salmon SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest*. 1977;60:846-54.
11. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008;26:2895-900.
12. Rasmussen T, Haaber J, Dahl IM, Knudsen LM, Kerndrup G, Lodahl M, Johnsen HE, Kuehl M. Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2010 May 29. [Epub ahead of print]
13. Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*. 1994;83:3654-63.
14. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008;456:593-8.
15. Collette M, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Amiot M. Crucial role of phosphatase CD45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells. *Eur Cytokine Netw*. 2007;18:120-6.

16. Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than *ras*/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol.* 1999;29:3945-50
17. Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G and Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 2006;20:1130-37.
18. Chen L, Chan SW, Zhang X, Walsh M, Lim CJ, Hong W, Song H. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes Dev.* 2010;24:290-300.
19. Ghoshal P, Nganga AJ, Moran-Giuati J, Szafrank A, Johnson TR, Bigelow AJ, Houde CM, Avet-Loiseau H, Smiraglia DJ, Ersing N, Chanan-Khan AA, Coignet LJ. Loss of the SMRT/NCOR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2009;69:4380-7.
20. Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, Bargou RC, Manz R, Stein H, Dörken B. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood.* 2004;103:3511-5.
21. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood.* 2004;103:3503-10.
22. Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Szpak Y, Bataille R, Robillard N, Amiot M. The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells. *J Immunol.* 2004;173:4953-9.
23. Descamps G, Wuillème-Toumi S, Trichet V, Venot C, Debussche L, Hercend T, Collette M, Robillard N, Bataille R, Amiot M. CD45neg but not CD45pos human myeloma cells are sensitive to the inhibition of IGF-1 signaling by a murine anti-IGF-1R monoclonal antibody, mAVE1642. *J Immunol.* 2006;177:4218-23.
24. Pandiella A, Carvajal-Vergara X, Tabera S, Mateo G, Gutiérrez N, San Miguel JF. Imatinib mesylate (STI571) inhibits multiple myeloma cell proliferation and potentiates the effect of common antimyeloma agents. *Br J Haematol.* 2003;123:858-68.
25. Montero JC, López-Pérez R, San Miguel JF, Pandiella A. Expression of c-Kit isoforms in multiple myeloma: differences in signaling and drug sensitivity. *Haematologica.* 2008;93:851-9.
26. Krishnamoorthy N, Oriss TB, Paglia M, Fei M, Yarlagaadda M, Vanhaesebroeck B, Ray A, Ray P. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med.* 2008;14:565-73.
27. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:2020-8.
28. Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Réme T, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Seckinger A, Moreaux J, Hundemer M, Jourdan M, Meissner T, Jauch A, Mahtouk K, Kassambara A, Bertsch U, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood.* 2009;113:4614-26.
29. Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica.* 2005;90:706-7.
30. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez N, Rosiñol L, Montejano L, Bladé J, Martínez R, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Sureda A, Ribera JM, Ojanguren JM, de Arriba F, Palomera L, Terol MJ, Orfao A, San Miguel JF; PETHEMA Study Group; GEM

Study Group. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2737-44.

31. Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, Pineau D, Morineau N, Milpied N, Harousseau JL, Bataille R. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*. 2004 May;89:547-51.

32. Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leuk Res*. 2008, 32:379-82

33. Mahindra A, Cirstea D, Raje N. Novel therapeutic targets for multiple myeloma. *Future Oncol*. 2010;6:407-18.

34. Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*. 2005;105:317-23.

35. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP, Bataille R. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat*. 2001;18:212-24.

36. Fernández-Medarde A, Porteros A, de las Rivas J, Núñez A, Fuster JJ, Santos E. Laser microdissection and microarray analysis of the hippocampus of Ras-GRF1 knockout mice reveals gene expression changes affecting signal transduction pathways related to memory and learning. *Neuroscience*. 2007;146:272-85.

37. Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2009;8:128.

38. Yustein JT, Liu YC, Gao P, Jie C, Le A, Vuica-Ross M, Chng WJ, Eberhart CG, Bergsagel PL, Dang CV. Induction of ectopic Myc target gene JAG2 augments hypoxic growth and tumorigenesis in a human B-cell model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:3534-9

39. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*. 2008 ;111:2220-9.

40. Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, Nand S, Toor A, Alkan S, Smadja NV, Avet-Loiseau H, Lima CS, Miele L, Coignet LJ. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*. 2004;104:3697-704

41. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*. 2007;130:1120-33.

42. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*. 2010;24:862-74.

43. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*. 2009;9:873-86.

44. Mahtouk K, Moreaux J, Hose D, Rème T, Meissner T, Jourdan M, Rossi JF, Pals ST, Goldschmidt H, Klein B. Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays. *BMC Cancer*. 2010;10:198

Figure 1

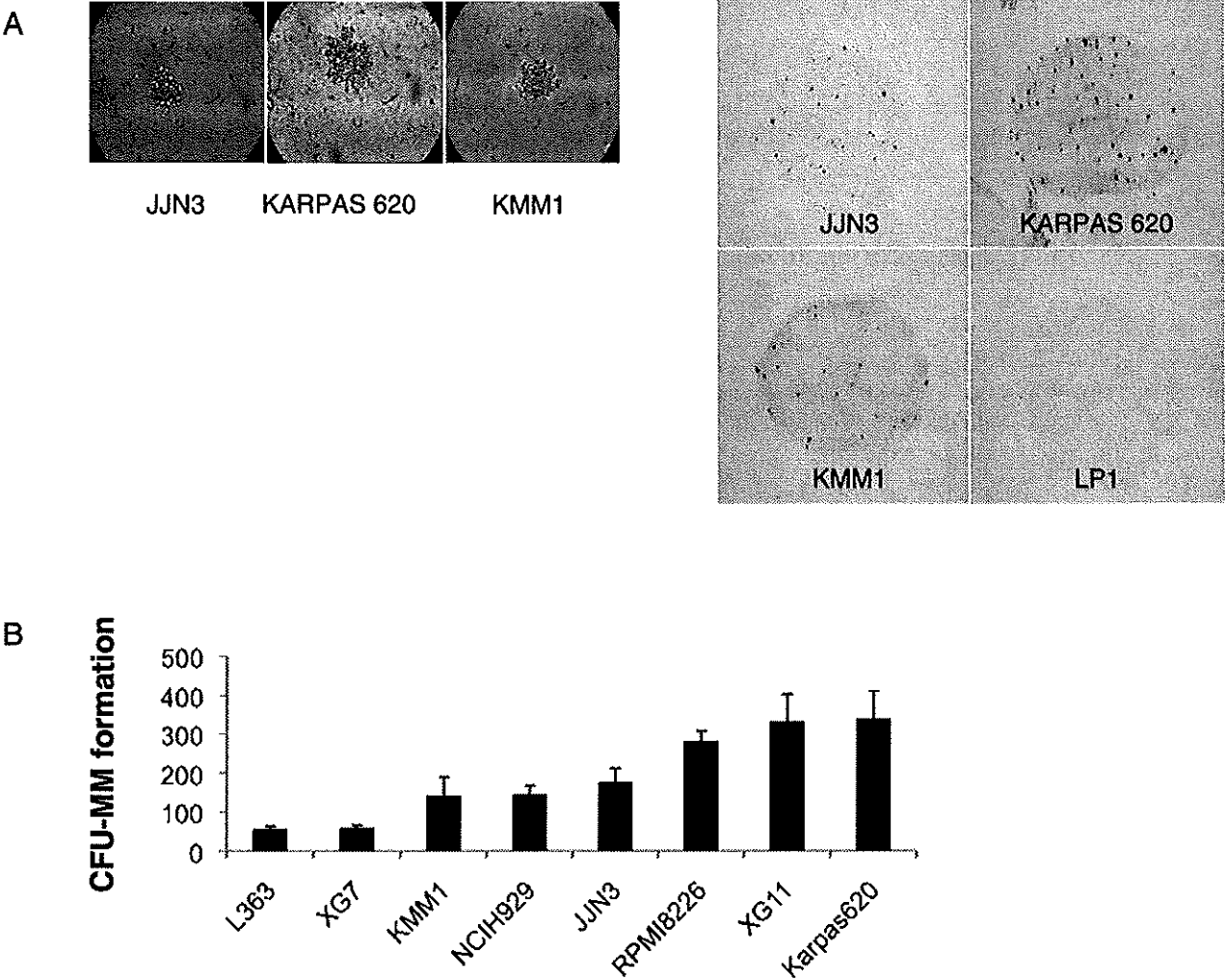


Figure 2

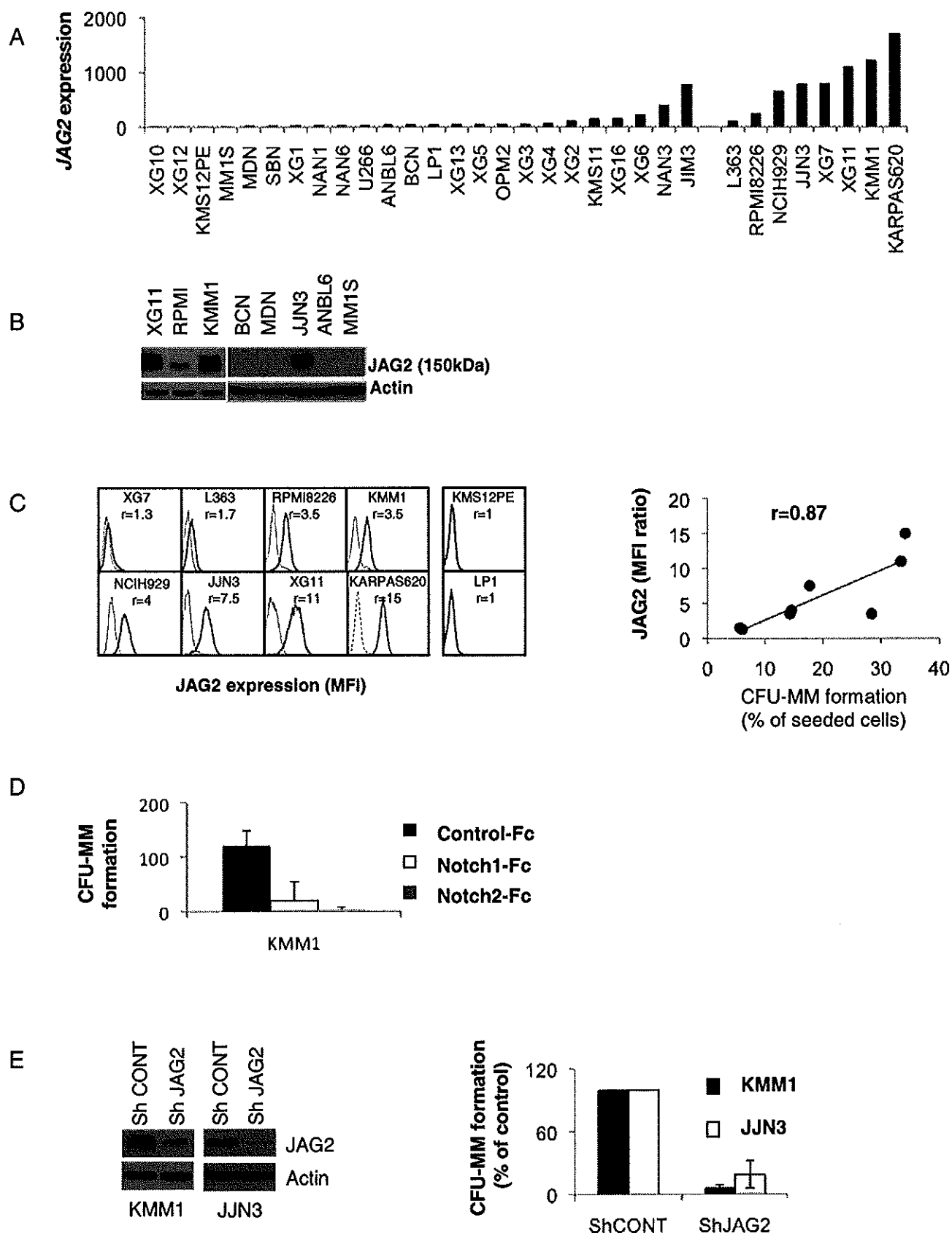


Figure 3

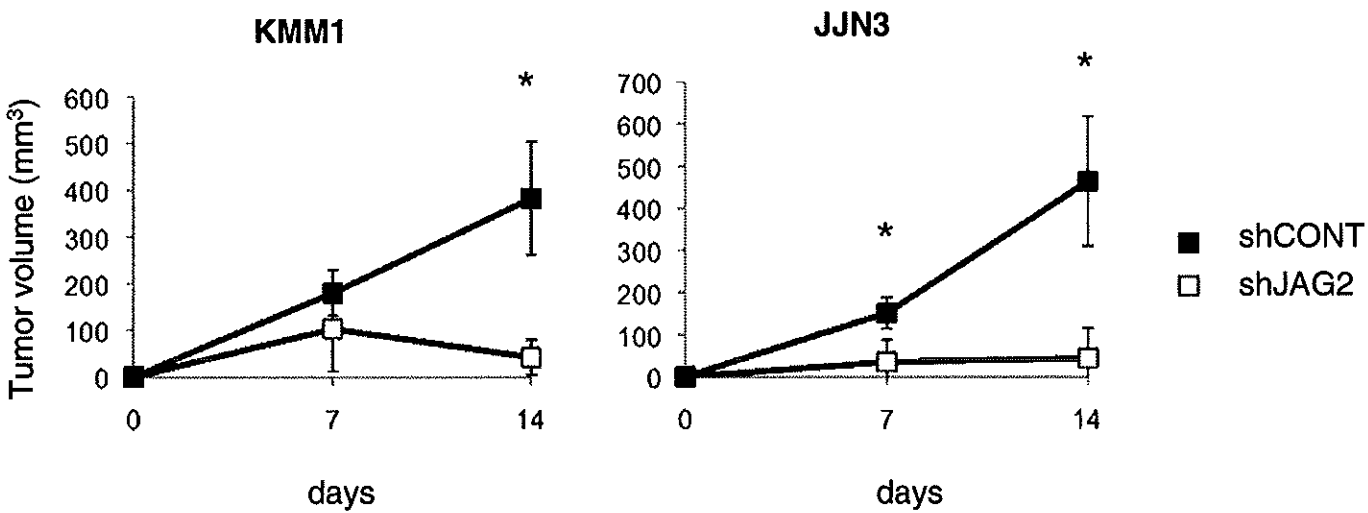


Figure 4

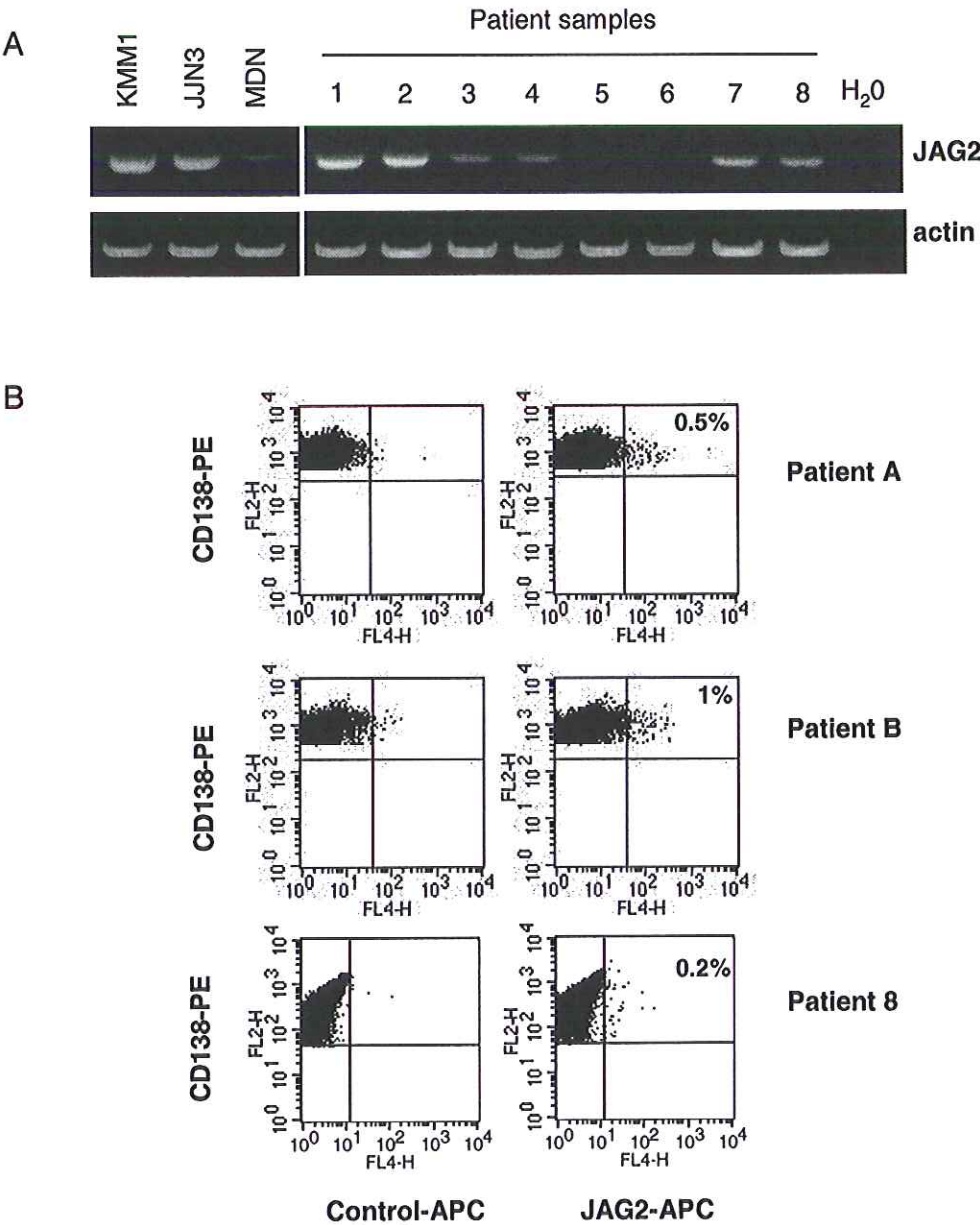


Figure 5

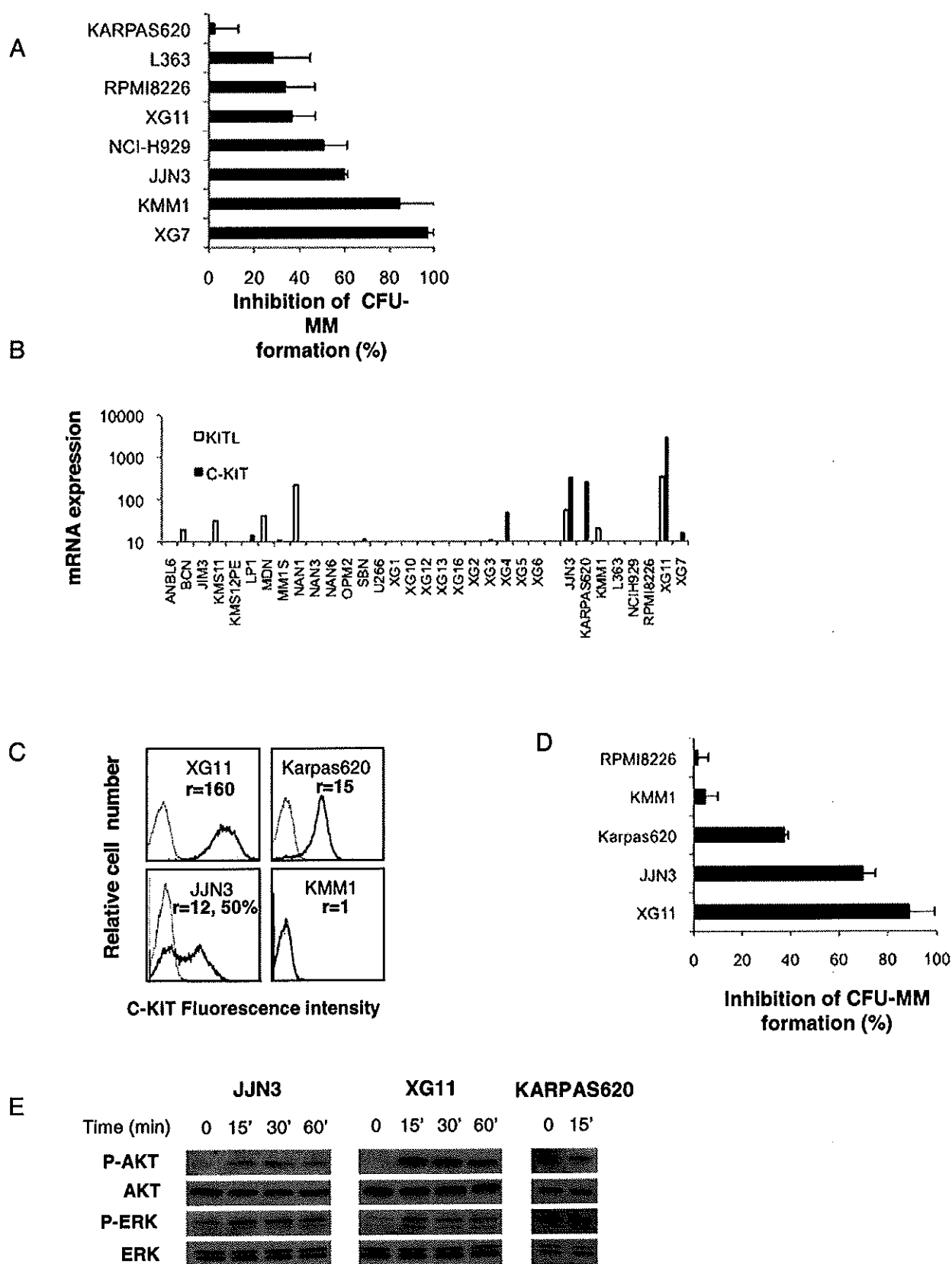


Figure S1

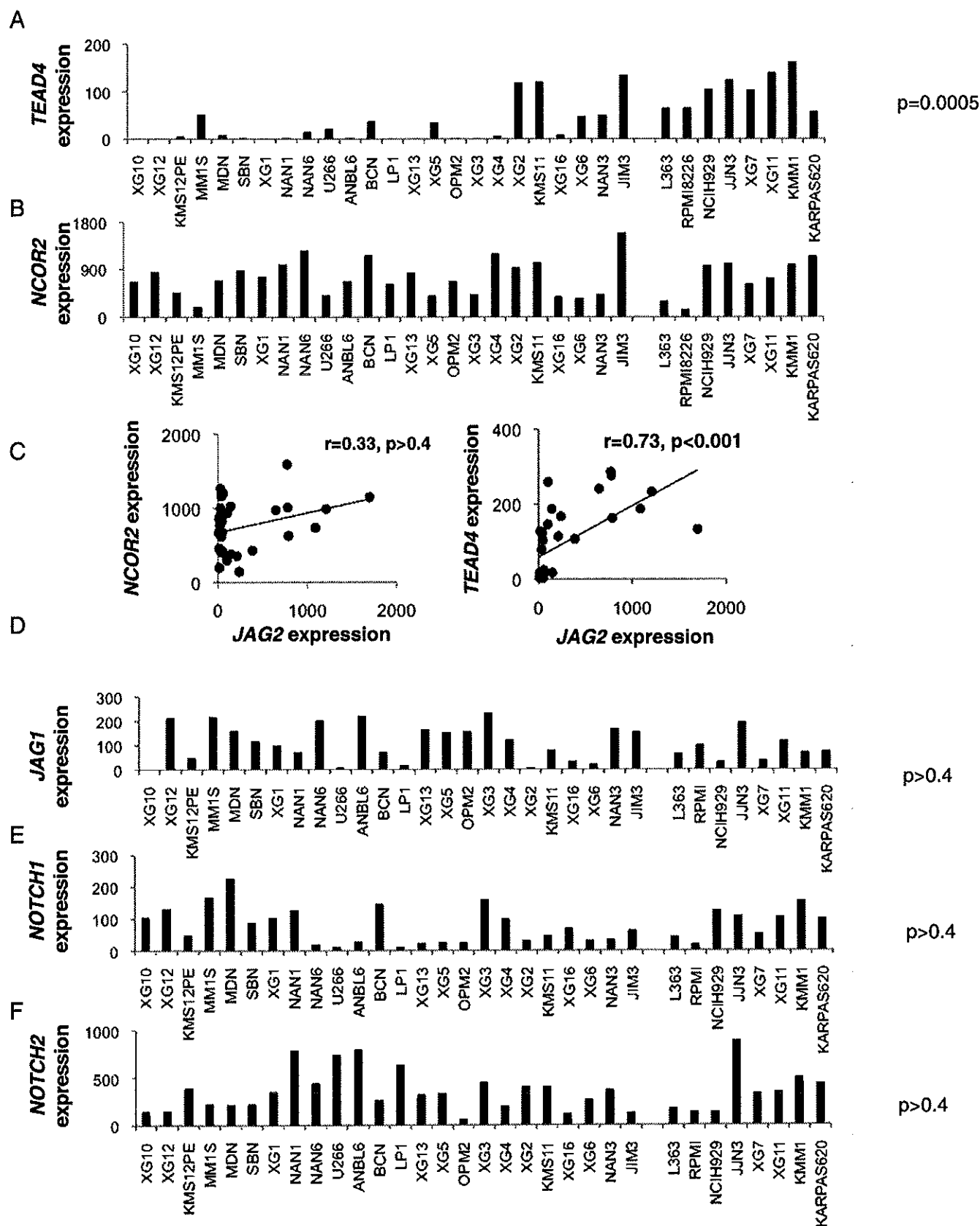
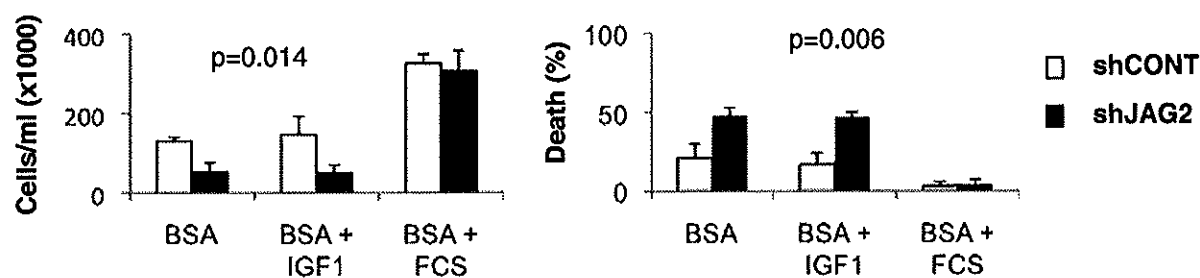


Figure S1. Microarray analysis of *TEAD4*, *NCOR2*, *JAG1*, *NOTCH1*, *NOTCH2* mRNA expression in relation to spontaneous clonogenic growth.

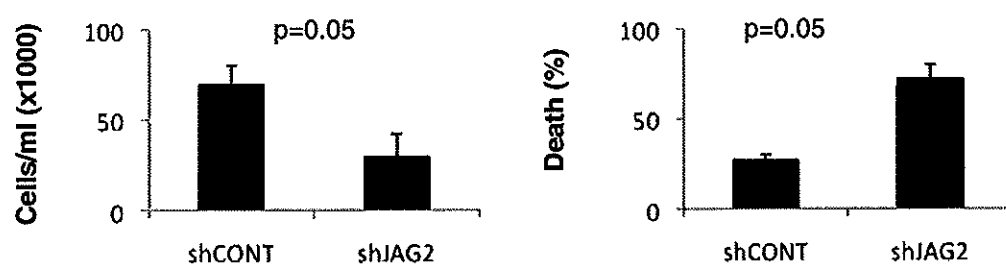
(A) *TEAD4*, (B) *NCOR2*, (D) *JAG1*, (E) *NOTCH1*, (F) *NOTCH2*. (C) *JAG2* mRNA expression is not correlated to *NCOR2* but to *TEAD4* mRNA expression,

Figure S2

A KMM1



B JJN3



Silencing JAG2 prevents self growth in liquid medium and induces cell death

ShControl and shJAG2 KMM1 (A) and JJN3 (B) were seeded in RPMI1640 supplemented by BSA (0.5%) with or without IGF1 (50ng/ml) or FCS (5%) at the concentration of 50,000 or 30,000 cells/ml, respectively. Growth was evaluated by direct counting of cell density (left) and cell viability (right) was measured by eosin exclusion as well as by APO2.7 staining (FACS analysis) after 3 days. Data represent the mean $\pm$ SD of 3 (KMM1) or 2 (JJN3) experiments.

Figure S3

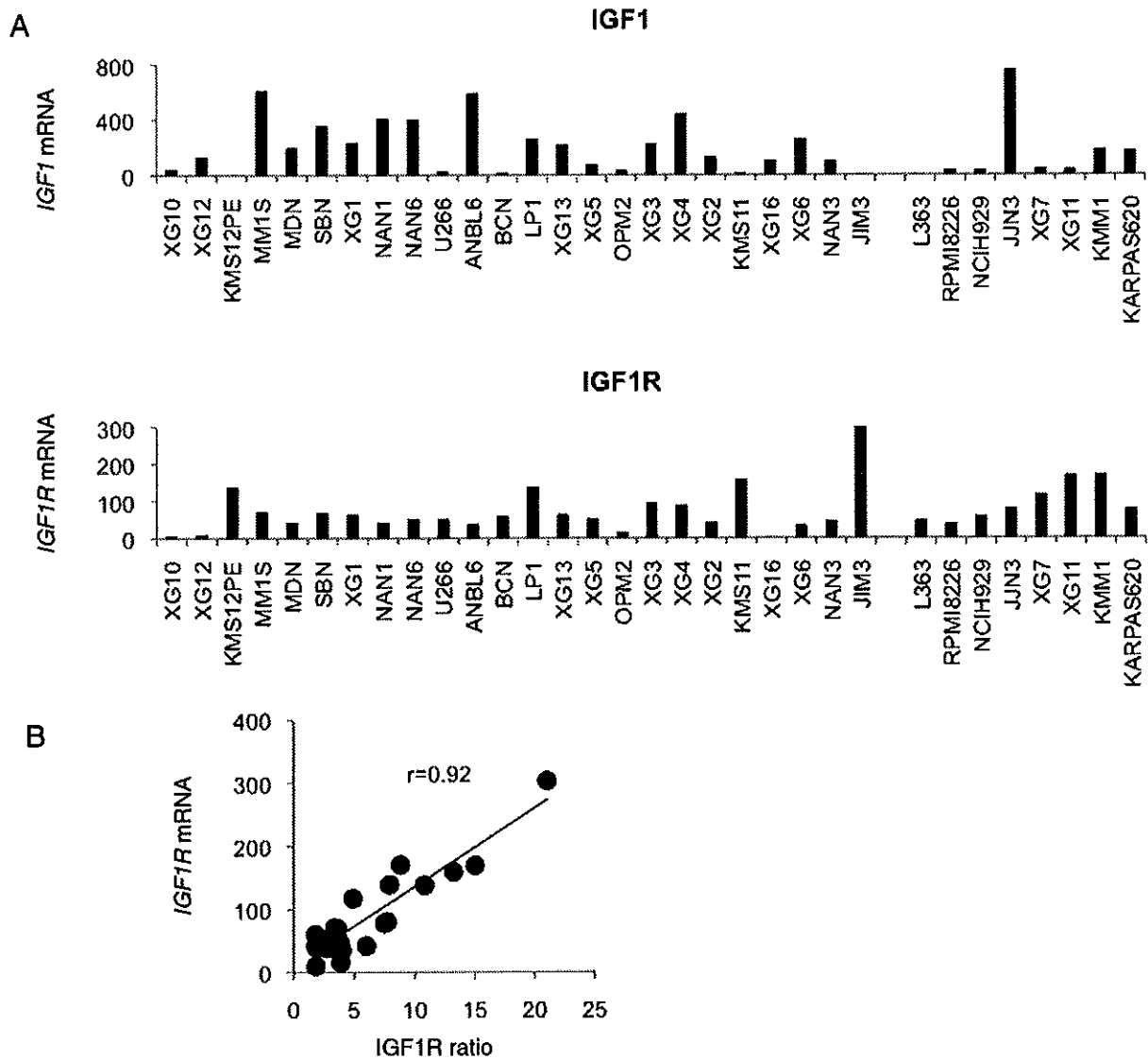


Figure S3. mRNA expression of IGF1 and IGF1R in HMCLs

A. mRNA expression was performed by affymetrix microarray. B IGF1R expression was measured by cytometry and ratio of expression (IGF1R over control staining) was plotted against *IGF1R* mRNA expression.

Figure S4

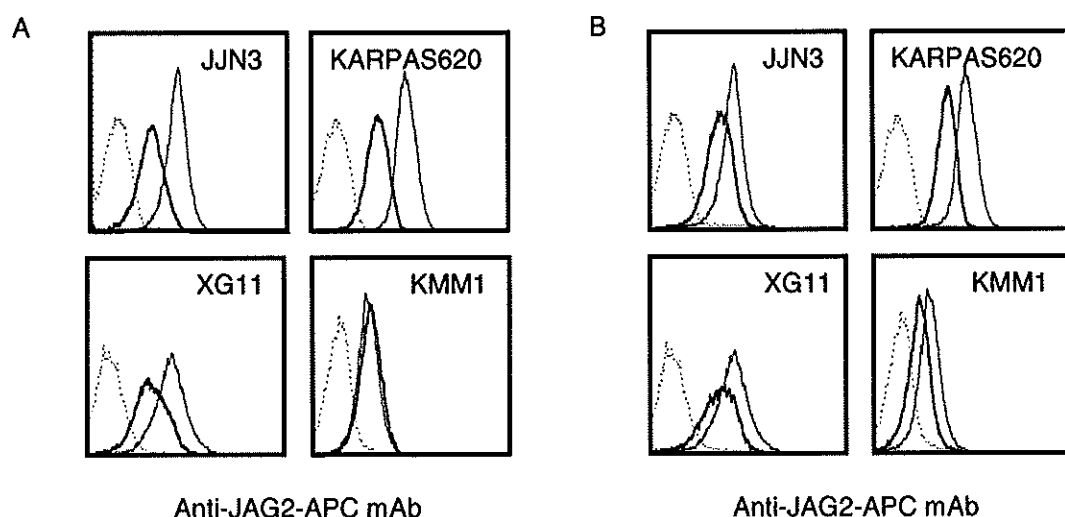


Figure S4. Imatinib mesylate and U0126 decrease JAG2 expression

Cells (200 000/ml) were incubated 48h with 20 μ M Imatinib mesylate (A) or 10 μ M U0126 (B), stained with APC-anti-JAG2 mAb or APC-control mAb, fixed with 1% paraformaldehyde. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Dashed line represents control expression on untreated cells, thin line represents JAG2 expression on untreated cells and thick line represents JAG2 expression on Imatinib mesylate or U0126 treated cells (representative experiment out of 3).

Table 1 Characteristics of HMCL groups

HMCL Groups	HMCLs	Deregulated genes	IL6	RAS mutations	TP53 abnormalities	JAG2 median (range)	TEAD4 median (range)
Group 1 (no spontaneous colony)	ANBL6*, BCN*, MM1S, NAN1*,3*,6*, U266, SBN*,JIM3,KMS11 KMS12PE,LP1,MDN*,OPM2 XG1-6*,10*,12*,13*,16*	29%MAF, 21%CCND1 21%MMSET, 25%other 4% none	71%	37.5%	62.5%	38.5 (10-773)	7.5 (1-134)
Group 2 (spontaneous colonies)	JJN3,KARPAS620, KMM1,L363,NCIH929 RPMI8226,XG7*,XG11*	37.5% MAF 25% CCND1, 25% MMSET, 12.5% other	25%	88%	75%	783 (100-1209)	104 (58-162)

Deregulated genes designate genes deregulated by 14q32 or 22q11 translocation. XG3, XG4, XG10 and SBN have a not-recurrent 14q32 translocation deregulating other genes than CCNDs, MAFs or MMSET (designated as other), XG16 has a wild-type 14q32 locus.

IL6 designates HMCLs (marked by *) that have been derived in the presence of IL6 and maintained with IL6.

N-RAS, *K-RAS* mutation and *TP53* abnormality (punctual mutation, deletion, insertion, lack of expression) were identified as previously described.

TEAD4 and *JAG2* mRNA expression was measured by microarray.

Table 2. *C-KIT* and *IGF1R* expression in primary myeloma cells

Table 2A. *C-KIT* and *IGF1R* expression in MM patients

	% (n)	<i>IGF1R</i> median (range)	<i>C-KIT</i> median (range)
IGF1R- C-KIT-	20% (84/414)	-	
IGF1R+ C-KIT-	23% (97/414)	433 (89-6332)	-
IGF1R- C-KIT+	30% (122/414)	-	2615 (418-17988)
IGF1R+ C-KIT+	27%(111/414)	360 (54-2872)	2104 (350-13612)

Expression was defined by Affymetrix microarray. Expression was considered negative when the call was absent. Median and range were calculated for positive calls only.

Table 2B. *C-KIT* and *IGF1R* expression in MM patients with respect to MM molecular classification

	<i>C-KIT</i> expression				<i>IGF1R</i> expression			
	% (n)	P value	Median (range)	P value	% (n)	P value	Median (range)	P value
All (414)	56 (233)		2334 (350-17988)		50 (208)		403 (54-6332)	
PR (47)	51 (24)	NS	2084 (799-8160)	NS	72 (34)	0.001	404 (98-1536)	NS
LB (58)	48 (28)	NS	1860 (608-9689)	NS	50 (29)	NS	361 (124-6332)	NS
MS (68)	29 (20)	<0.001	983 (350-4937)	<0.001	81 (55)	<0.001	474 (224-1174)	<0.001
HY (116)	88 (102)	<0.001	3279 (412-15807)	<0.001	30 (35)	<0.001	267 (89-781)	<0.001
CCND1 (88)	43 (38)	0.007	1700 (487-6009)	0.039	36 (32)	0.004	284 (54-2872)	<0.001
MF (37)	57 (21)	NS	3356 (409-17988)	NS	62 (23)	NS	457 (145-1472)	NS

Expression was defined by Affymetrix microarray: only values with an Affymetrix present call were kept for analysis. Groups CD-1 and CD-2 were pooled (CCND1).

Table S1. Ras and TP53 mutations in HMCLs

	translocation	N, K-ras cd	nt Change	P53 cd	nt Change	exon
BCN	t(14;16)	wt		wt		
SBN	t(14;?)	wt		wt		
XG6	t(16;22)	wt		wt		
ANBL-6	t(14;16)	wt		331 Q>STOP	CAG>TAG	9
JIM3	t(4;14)	wt		273 R>S	CGT>TGT	8
KMS11	t(4;14)	wt		No PCR product		
KMS12PE	t(11;14)	Wt		337 R>L	CGC>CTC	10
LP1	t(4;14)	wt		286 E>K	GAA>AAA	8
NAN1	t(14;16)	wt		180 E>STOP	GAG>TAG	5
NAN6	t(14;20)	wt		Deletion exons 7-9		
OPM2	t(4;14)	wt		175 R>H	CGC>CAC	5
U266	t(11;14)	wt		161 A>T	GCC>ACC	5
XG13	t(14;16)	wt		248 R>Q	CGG>CAG	7
XG4	t(14;?)	wt		181 R>R+C	CGC>CGC+TGC	5
XG5	t(11;14)	wt		282 R>W	CGG>TGG	8
MDN	t(11;14)	N13 G>D	GGT>GAT	wt		
MM1S	t(14;16)	K12 G>A	GGT>GCT	Wt		
XG3	t(14;?)	N61 Q>L	CAA>AAA	wt		
XG10	t(14;?)	K13 S>S+C	GGC>GGC+TGC	wt		
XG12	t(14;16)	N61 Q>L	CAA>AAA	wt		
NAN3	t(4;14)	N61 Q>H	CAA>AAA	248 R>R+Q	CGG>CGG+CAG	7
XG1	t(11;14)	N12 G>R	GGT>CGT	126 Y>N	TAC>AAC	5
XG16	none	N 61Q>H	CAA>CAC	220 Y>C	TAT>TGT	6
XG2	t(12;14)	K12 G>A	GGT>GCT	176 C>Y	TGC>TAC	5
XG11	t(11;14)	wt		135 C>Y	TGC>TAC	5
NCI-H929	t(4;14)	N13 G>D	GGT>GAT	wt		
XG7	t(4;14)	K12 G>C	GGT>TGT	wt		
L363	t(20;22)	N61 Q>H	CAA>CAC	Insertion intron 7-8		
RPMI 8226	t(14;16)	K12 G>A	GGT>GCT	285 E>K	GAG>AAG	8
JJN3	t(14;16)	N12 G>D	GGT>GAT	No PCR product		
Karpas 620	t(11;14)	K12 G>D	GGT>GAT	135 C>Y	TGC>TAC	5
KMM1	t(6;14)	N13 G>D	GGT>GAT	135 C>C+F	TGC>TGC+TTC	5

Ras and TP53 mutations were identified by direct sequencing of RT-PCR products. Sequences (forward and reverse) were performed on RT-PCR products of the cDNAs from HMCLs by the « Plate-Forme de Séquençage-Génotypage OUEST Génopole ® ». For K and N-ras, a region spanning codons 12,13 and 61 was amplified using the following primer pairs: GGC CTG CTG AAA ATG ACT GAA TA and CCC ACC TAT AAT GGT GAA TAT CT for K-ras , ACT GAG TAC AAA CTG GTG GTG GTT GGA and CAA ATG ACT TGC TAT TAT TGA TG for N-ras. For TP53, two overlapping amplifications, a 750 pb (codons 1-250) and a 819 pb (codons 187-370) products, were performed using the following primer pairs: ATG GAG GAG CCG CAG TCA and GGC CTC CGG TTC ATG CCG (1-250), GGC CCC TCC TCA GCA TCT T and TCC CCA TCC TCC CCA (187-370).

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons étudié les bases moléculaires impliquées dans la capacité clonogénique spontanée des cellules myélomateuses en milieu semi-solide. Nous avons démontré que ce processus nécessite une coopération entre les voies Ras/Mapk, Pi3k/Akt et Notch.

D'une part, les voies Ras/Mapk et Pi3k/Akt sont induites par des mutations oncogéniques de *RAS* (*NRAS* et *KRAS*) et, par une activation autocrine des récepteurs à tyrosine kinase IGF-1R et C-KIT. D'autre part, l'activation de la voie Notch est médiée par une forte surexpression du ligand JAG2 (Figure 32).

Implication des mutations de RAS dans la clonogénicité

Les mutations *KRAS* et *NRAS* résultent en la traduction de protéines RAS oncogéniques constitutivement actives. Dans le MM, cette suractivation dérégule principalement les voies Erk et Akt, et participe à une augmentation de la prolifération, de la capacité de migration ou encore de la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Hu et al., 2003 ; Hoang et al., 2006 ; Chng et al., 2008). De plus, ces dérégulations sont associées à la progression et à l'agressivité de la maladie et procurent aux cellules myélomateuses une certaine indépendance aux facteurs microenvironnementaux tels que l'IL6 (Billadeau et al., 1995). On peut donc penser que les cellules qui clonent de façon spontanée sont en partie indépendantes de l'apport d'IL6 exogène grâce à la présence de ces mutations de *RAS*.

De façon intéressante, certaines études mettent également en évidence une coopération entre l'activation constitutive de RAS et la voie Notch dans l'oncogenèse de plusieurs pathologies. Ainsi, les oncogènes RAS activent la voie Notch en augmentant l'activité intracellulaire de NOTCH1. L'activation de ce dernier est nécessaire à la transformation néoplasique RAS-dépendante des fibroblastes humains (Weijzen et al., 2002). Ensuite, les mutations *KRAS* induisent une augmentation de la prolifération des CSH, et sont responsables de l'émergence de désordres myéloprolifératifs, ou encore de l'émergence des T-ALL quand elles sont associées avec certaines mutations de *NOTCH1* (Chiang et al., 2008 ; Sabnis et al., 2009). De plus, les voies Notch et Ras coopèrent dans la survie et la prolifération des cellules initiatrices de cancer du sein en milieu semi-solide (Mittal et al., 2009). Enfin, l'inactivation de *Ras-GFRI*, un effecteur de RAS, dans des souris invalidées pour ce gène, diminue fortement l'expression de JAG2 dans l'hippocampe (Fernández-Medarde et al., 2007). Dans

notre étude, l'inhibition de la voie RAS induit aussi une baisse de l'expression membranaire de JAG2, suggérant une interaction directe entre ces 2 voies.

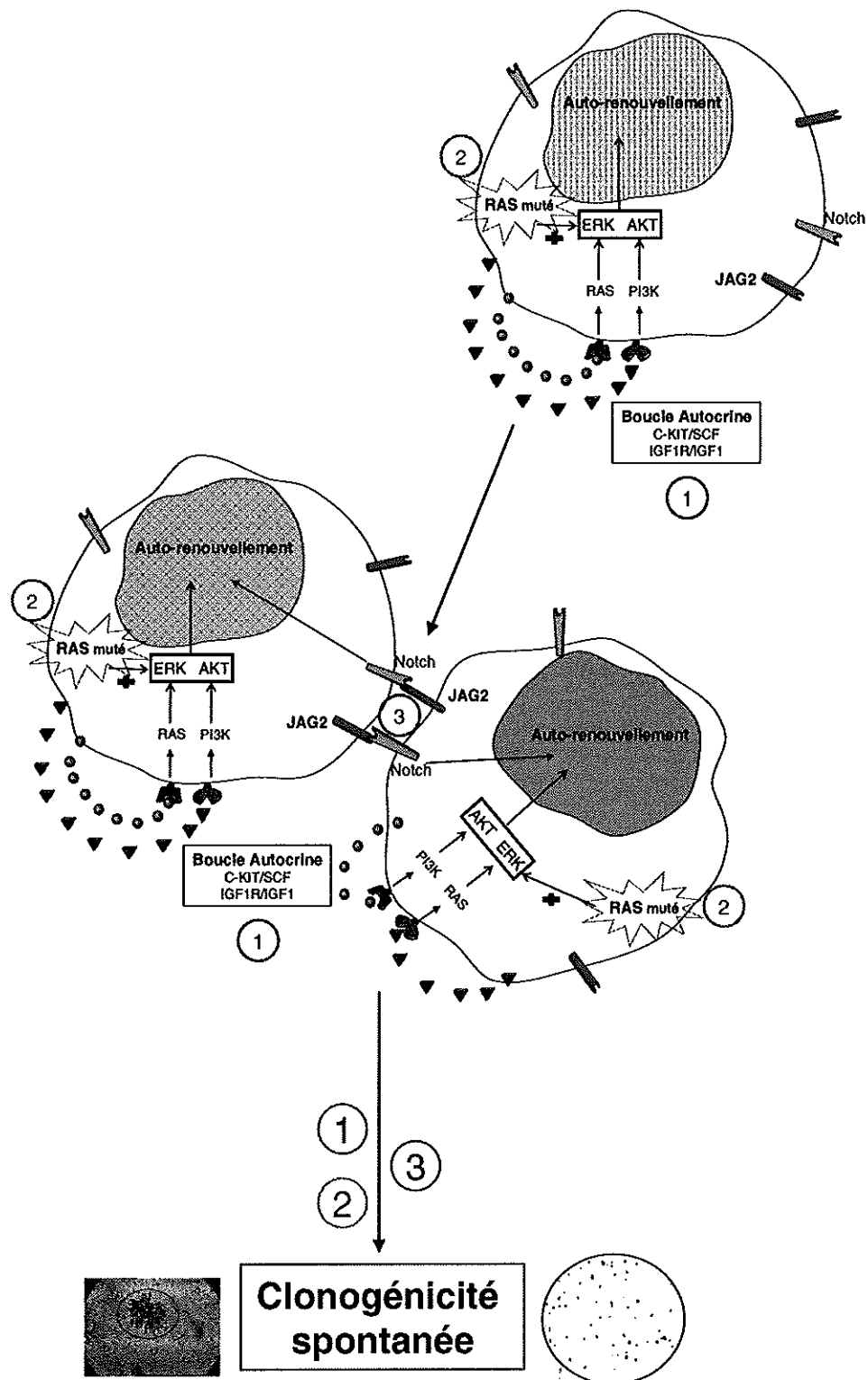


Figure 32 : Mécanismes impliqués dans la clonogénicité spontanée des cellules myéломateuses

Implication des récepteurs à tyrosine kinase

Nous avons démontré que des boucles autocrines IGF-1/IGF-1R et SCF/C-KIT avaient un rôle essentiel dans la clonogénicité spontanée des lignées de MM. De façon intéressante dans 80% des cas, les plasmocytes primaires de patients expriment au moins un de ces deux récepteurs, suggérant que la plupart des cellules myélomateuses peuvent proliférer à travers leur activation.

L'IL6 est un facteur majeur dans la physiopathologie du MM (voir p.25). Toutes les cellules myélomateuses expriment l'IL6R et 36% d'entre elles ont la capacité de sécréter l'IL6 de façon autocrine. Cependant, le niveau d'expression d'IL6 autocrin est beaucoup plus faible que celui sécrété par l'environnement médullaire, l'IL6 est donc défini comme un facteur majoritairement paracrin (Mahtouk et al., 2010). Ce concept semble se confirmer dans notre étude étant donné que cette cytokine n'est pas impliquée dans le processus de clonogénicité spontanée. On peut aussi noter que, dans notre panel de 32 lignées, 8 (25%) ne forment pas de colonie en milieu semi-solide que se soit spontanément ou en présence d'IL-6 et IGF-1. Nous avons cependant observé la formation de quelques colonies en présence de sérum. Il est donc probable que ces lignées puissent former des colonies en milieu semi-solide mais sous la dépendance d'un facteur exogène, présent dans le sérum, mais encore non identifié.

→ IGF-1R

L'implication des voies de signalisation induites par l'IGF-1, facteur majeur dans la biologie du MM, est aujourd'hui bien connue (voir p.27). Toutes les cellules myélomateuses semblent avoir la capacité de sécréter de l'IGF-1 et l'expression de l'IGF-1R (CD221) est un facteur de mauvais pronostic (Bataille et al., 2005 ; Mahtouk et al., 2010). Son activation est à la fois paracrine et autocrine et pourrait permettre aux cellules myélomateuses CD45- de devenir indépendantes à l'environnement médullaire et de fait, favoriser l'envahissement extramedullaire (Menu et al., 2009 ; Sprinsky et al., 2009). Notre étude confirme ces informations étant donné que sans sérum, ni cytokine exogène, la clonogénicité spontanée est largement supportée par une boucle autocrine IGF1/IGF1R. Les différentes études menées par notre équipe, nous ont permis de déterminer un rôle prépondérant de l'IGF-1 dans la prolifération et la résistance aux drogues des cellules myélomateuses CD45-, via une forte activation des voies Erk et Akt (Descamps et al., 2004, Descamps et al., 2006, Descamps et al., 2009).

→ C-KIT

C-KIT (CD117) est un récepteur à tyrosine kinase essentiel dans le développement et la survie des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques (Figure 22). Cependant, sa dérégulation via la surexpression de son ligand, le SCF, ou encore via la présence de mutations activatrices, a été décrite dans plusieurs cancers tels que le GIST et le mélanome (Corless et al., 2004 ; Lefevre et al ; 2004 ; Miettinen et Lasota, 2005).

Malgré le fait que plus de 50% des patients l'expriment de façon aberrante au diagnostic, peu de travaux ont étudié son implication dans la biologie du MM (voir p.28). Dans notre étude, nous confirmons la forte activation des voies Erk et Akt après stimulation de 2 lignées C-KIT+ par le SCF.

Paradoxalement C-KIT est associé à un pronostic plutôt favorable dans le MM. Ceci pourrait être la conséquence indirecte de sa surexpression chez 88% des patients du groupe hyperdiploïde (HY), qui sont de bon pronostic, alors que seulement 29% des patients du groupe MS (MMSET), qui sont de très mauvais pronostic, sont C-KIT+.

Contrairement à l'IGF-1, seul un faible pourcentage de lignées et cellules primaires de MM sécrètent du SCF. C-KIT serait alors activé de façon paracrine et pourrait de fait rendre les cellules myélomateuses C-KIT+ dépendante du microenvironnement. Les MM hyperdiploïdes sont les plus ostéolytiques suggérant une forte dépendance à l'environnement médullaire. De plus, étant donné la forte expression de C-KIT dans le groupe HY, il serait intéressant d'estimer la dépendance des cellules myélomateuses hyperdiploïdes au SCF. Si ce groupe de MM est vraiment dépendant de l'activation de ce récepteur à tyrosine kinase, l'addition de SCF à la place de l'IL6 dans les protocoles d'immortalisation des lignées de MM devrait être envisagée. En effet l'hyperdiploïdie est caractéristique de 50% des patients et on observe pourtant une faible incidence de lignées hyperdiploïdes.

De façon intéressante, quelques études mettent en évidence une coopération entre la signalisation C-KIT et la voie Notch. En effet, il a été démontré chez la souris que l'expression de JAG2 est dépendante de C-KIT dans les CD et les cellules endothéliales de la moelle osseuse (Krishnamoorthy et al., 2008 ; Butler et al., 2010). Ce mécanisme peut être étendu aux lignées de MM. En effet, nous avons mis en évidence que les lignées C-KIT+ expriment plus fortement le ligand JAG2 et que l'imatinib mesylate réduit fortement cette surexpression.

Malgré un rôle potentiel de C-KIT dans l'oncogenèse du MM, un essai clinique de phase II a conclu que l'imatinib mesylate n'avait pas d'effet sur la survie des patients C-KIT+. Cependant, cet essai a été effectué sur un faible nombre de patients en rechute (11

patients C-KIT+) (Dispenzieri et al., 2006). Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'intérêt potentiel de l'imatinib mesylate sur les patients hyperdiploïdes au diagnostic.

Que se soit l'IGF1 ou le SCF, les facteurs impliqués dans la clonogénicité spontanée induisent majoritairement les voies Akt et Erk et, sont principalement des inducteurs de prolifération dans les cellules myélomateuses. L'activation de ces voies est donc centrale dans les mécanismes de clonogénicité spontanée et sont induites à la fois par des mutations (RAS) et pas des boucles autocrines (IGF-1, SCF). Cependant, la formation de colonies spontanées nécessite l'activation d'une autre voie. En effet, dans notre étude, seules les lignées exprimant fortement JAG2 ont cette capacité d'autorenouvellement.

Caractérisation des cellules clonogéniques

Contrairement aux précédentes études qui ont défini JAG2 comme un marqueur ubiquitaire des cellules myélomateuses, nous avons démontré que ce ligand n'est exprimé que par un groupe spécifique de lignées de MM (Houde et al., 2004 ; Takeuchi et al., 2005 ; Ghoshal et al., 2009). De plus, nous avons mis en évidence que cette surexpression est nécessaire à la capacité de clonogénicité spontanée. Bien que plusieurs travaux aient montré un rôle oncogénique de la voie Notch, notre étude est la première à démontrer un rôle direct de JAG2 dans les lignées de MM.

Nos résultats montrent que l'expression de JAG2 n'est pas nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules myélomateuses en milieu liquide contenant du sérum. Son activation est cependant nécessaire en condition stringente caractéristique de la clonogénicité spontanée ainsi que dans les processus de tumorigenèse chez la souris immunodéprimée.

L'étude des différents gènes cibles induit par JAG2 devra alors être effectuée, *in situ*, dans les colonies formées à partir de cellules isolées. De plus, l'utilisation d'anticorps bloquant spécifiques de NOTCH1 ou NOTCH2 nous permettrait d'évaluer l'implication de ces récepteurs dans le processus d'autorenouvellement. Par ailleurs, étant donné la description de signaux bidirectionnels dans cette voie (voir p.96), nous ne pouvons pas exclure l'existence d'une réponse directement induite par le clivage et la libération, dans la cellule, d'un fragment intracellulaire actif de JAG2. Enfin, il serait intéressant de confirmer le rôle de JAG2 dans l'oncogenèse du MM via l'utilisation du modèle murin 5TMM qui est plus représentatif de la physiopathologie du MM que les modèles de xénogreffes chez la souris SCID.

L'analyse de son expression sur les cellules primaires révèle l'existence de sous population CD138+JAG2+. Si les lignées JAG2+ dérivent directement de ces sous populations, il est possible que celles-ci soient dotées des mêmes capacités d'autorenouvellement. Cependant la faible proportion de cellules CD138+JAG2+, de 0,05% à 1,7%, est un frein à leur purification en nombre suffisant. Nous devons à présent mettre en place des protocoles permettant leur enrichissement, ce qui permettrait d'évaluer leur capacité clonogénique et de déterminer si elles peuvent représenter une population de cellules initiateurs de cancer dans le MM.

Hypoxie

Les conditions hypoxiques sont essentielles à la survie et au maintien des propriétés d'autorenouvellement des cellules souches dans leurs niches. Cependant, de nombreux travaux ont démontré que les microenvironnements hypoxiques contribuent aussi largement à la progression tumorale. De plus, des études récentes mettent en évidence que ces conditions faibles en O₂ jouent un rôle critique dans le maintien des cellules initiateurs de cancer dans la masse tumorale (Keith et Simon, 2007).

Les facteurs de transcription HIF (hypoxia-inducible factors), HIF1 α et HIF-2 α , induisent l'expression de nombreux gènes, dont certains impliqués dans la voie Notch. Ainsi, une étude démontre que l'hypoxie augmente la stabilisation du NICD et induit des gènes spécifiques de la voie Notch, tels que Hes-1 et Hey-2, dans les cellules souches neurales et musculaires (Gustafsson et al., 2005). De plus, plusieurs études montrent un rôle important de la voie Notch en condition hypoxique dans l'oncogenèse de modèles tumoraux tels que le mésothéliome ou encore l'adénocarcinome pulmonaire (Graziani et al., 2008 ; Elias et al., 2010). Enfin, dans un modèle de LB humain immortalisé par le virus EBV, similaire à un lymphome de Burkitt, la surexpression de JAG2 provoque une augmentation de la prolifération en milieu hypoxique. Cette observation n'étant pas reproduite en normoxie, elle montre une coopération essentielle entre l'hypoxie et la voie Notch (Yustein et al., 2009).

Certaines études récentes mettent en évidence un rôle essentiel de l'hypoxie dans le microenvironnement médullaire myélomateux (Hu et al., 2010). Il serait donc intéressant d'évaluer les coopérations entre la voie Notch et l'hypoxie MM. Il serait aussi important d'évaluer l'implication des HIFs dans la surexpression de JAG2 ainsi que dans le processus de clonogénicité spontanée.

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.* 2009 Jan 15;15(2):425-430.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001 Oct 18;413(6857):732-738.
- Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 2004 May 14;117(4):515-526.
- Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2007 Aug;12(2):115-130.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* 2007 Sep;13(9):1050-1059.
- Arora T, Jelinek DF. Differential myeloma cell responsiveness to interferon-alpha correlates with differential induction of p19(INK4d) and cyclin D2 expression. *J. Biol. Chem.* 1998 May 8;273(19):11799-11805.
- Asosingh K, Radl J, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K. The 5TMM series: a useful in vivo mouse model of human multiple myeloma. *Hematol. J.* 2000;1(5):351-356.
- Assaf A, Esteves H, Curnow SJ, Browning MJ. A threshold level of TLR9 mRNA predicts cellular responsiveness to CpG-ODN in haematological and non-haematological tumour cell lines. *Cell. Immunol.* 2009;259(1):90-99.
- Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Dec;20(4):625-635.
- Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp M, Harousseau J, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2185-2191.
- Bai L, Weng J, Tsai C, Sargeant A, Lin C, Chiu C. OSU-03012 sensitizes TIB-196 myeloma cells to imatinib mesylate via AMP-activated protein kinase and STAT3 pathways. *Leuk. Res.* 2010 Jun;34(6):816-820.
- Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br. J. Haematol.* 1994 May;87(1):68-74.
- Barillé S, Thabard W, Robillard N, Moreau P, Pineau D, Harousseau JL, et al. CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 1999 Aug;106(2):532-535.
- Bataille R, Durie BG, Grenier J. Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br. J. Haematol.* 1983 Nov;55(3):439-447.

- Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest.* 1989 Déc;84(6):2008-2011.
- Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau J, Moreau P. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica.* 2005 Mai;90(5):706-707.
- Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau J, Moreau P. CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leuk. Res.* 2008 Mar;32(3):379-382.
- Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):509-512.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007 Mai 1;67(9):4010-4015.
- Bekeredjian-Ding IB, Berkeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J. Immunol.* 2005 Avr 1;174(7):4043-4050.
- Bekeredjian-Ding I, Jegou G. Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. *Immunology.* 2009 Nov;128(3):311-323.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):296-303.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2005 Sep 10;23(26):6333-6338.
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood.* 2003 Jun 1;101(11):4500-4504.
- Bertrand FE, Eckfeldt CE, Lysholm AS, LeBien TW. Notch-1 and Notch-2 exhibit unique patterns of expression in human B-lineage cells. *Leukemia.* 2000 Déc;14(12):2095-2102.
- Beverly LJ, Felsher DW, Capobianco AJ. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res.* 2005 Aoû 15;65(16):7159-7168.
- Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J. Exp. Med.* 1993 Sep 1;178(3):1023-1031.
- Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, LeBien TW, Van Ness B. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res.* 1995 Aoû 15;55(16):3640-3646.
- Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood.* 1996 Jul 1;88(1):289-296.

- Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* 2005 Fév 21;201(4):545-554.
- Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Fløttum M, Knudsen L, Børset M, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2006 Jun;20(6):1138-1144.
- Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* 2007 Mai;28(3):339-363.
- Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood.* 2003 Aoû 1;102(3):956-963.
- Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig W, Tolle G, et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006 Aoû 15;108(4):1151-1157.
- Brennan SK, Meade B, Wang Q, Merchant AA, Kowalski J, Matsui W. Mantle cell lymphoma activation enhances bortezomib sensitivity. *Blood.* 2010 Jun 22; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570863>
- Brody JD, Ai WZ, Czerwinski DK, Torchia JA, Levy M, Advani RH, et al. In Situ Vaccination With a TLR9 Agonist Induces Systemic Lymphoma Regression: A Phase I/II Study. *J Clin Oncol.* 2010 Aoû 9; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697067>
- Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood.* 2008 Avr 1;111(7):3388-3394.
- Bruns I, Czibere A, Fischer JC, Roels F, Cadeddu R, Buest S, et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia.* 2009 Mai;23(5):892-899.
- Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010 Mar 5;6(3):251-264.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):841-846.
- Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marsico SA, et al. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J. Cell. Physiol.* 2005 Fév;202(2):323-335.
- Carbone PP, Kellerhouse LE, Gehan EA. Plasmacytic myeloma. A study of the relationship of survival to various clinical manifestations and anomalous protein type in 112 patients. *Am. J. Med.* 1967 Jun;42(6):937-948.
- Carlesso N, Aster JC, Sklar J, Scadden DT. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood.* 1999 Fév 1;93(3):838-848.

- Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 2005 Apr 1;175(3):1551-1557.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999 Jan;10(1):105-115.
- Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J. Exp. Med.* 2008 Oct 27;205(11):2609-2621.
- Chang H, Jiang N, Jiang H, Saha M, Qi C, Xu W, et al. CKS1B nuclear expression is inversely correlated with p27Kip1 expression and is predictive of an adverse survival in multiple myeloma. *Haematologica.* 2010 Apr 26; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421271>
- Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell.* 2009 Oct 6;16(4):309-323.
- Chen H, Li M, Campbell RA, Burkhardt K, Zhu D, Li SG, et al. Interference with nuclear factor kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase signaling by TRAF6C small interfering RNA inhibits myeloma cell proliferation and enhances apoptosis. *Oncogene.* 2006 Oct 19;25(49):6520-6527.
- Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.* 2010 Sep 1;80(5):654-665.
- Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M, Tiedemann R, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell.* 2008 Fév;13(2):167-180.
- Chiang MY, Xu L, Shestova O, Histen G, L'heureux S, Romany C, et al. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J. Clin. Invest.* 2008 Sep;118(9):3181-3194.
- Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH, Dachs Cabanas E, Protheroe RKM, Stockley DM, et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica.* 2009 Déc;94(12):1708-1713.
- Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N, Van Wier S, Jacobus S, Blood E, et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia.* 2007 Mar;21(3):582-584.
- Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, Jacobus S, Rajkumar SV, Oken MM, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia.* 2008 Déc;22(12):2280-2284.
- Chng WJ, Fonseca R. Cell lines of hyperdiploid myeloma, are we there yet? *Br. J. Haematol.* 2008 Mar;140(5):579-580.
- Cho OH, Shin HM, Miele L, Golde TE, Fauq A, Minter LM, et al. Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2009 Mar 15;182(6):3380-3389.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9339-9344.

- Collette M, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Amiot M. Crucial role of phosphatase CD45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells. *Eur. Cytokine Netw.* 2007 Sep;18(3):120-126.
- Conforti R, Ma Y, Morel Y, Paturel C, Terme M, Viaud S, et al. Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):490-500.
- Corless CL, McGreevey L, Town A, Schroeder A, Bainbridge T, Harrell P, et al. KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J Mol Diagn.* 2004 Nov;6(4):366-370.
- Corthals SL, Wynne K, She K, Shimizu H, Curman D, Garbutt K, et al. Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2006 Fév;132(4):452-458.
- Crowder C, Dahle Ø, Davis RE, Gabrielsen OS, Rudikoff S. PML mediates IFN-alpha-induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction. *Blood.* 2005 Fév 1;105(3):1280-1287.
- Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* 2003 Jul;112(1):126-135.
- Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, De Silvestro G, Gaidano G, Schena M, et al. Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995 Avr;75(1):26-32.
- de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2009 Jun;70(3):183-194.
- De Vos J, Couderc G, Tarte K, Jourdan M, Requirand G, Delteil MC, et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood.* 2001 Aoû 1;98(3):771-780.
- Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2000 Fév 1;95(3):999-1006.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp M, Harousseau J, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):194-199.
- Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Szpak Y, Bataille R, Robillard N, Amiot M. The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells. *J. Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):4953-4959.
- Descamps G, Wuillème-Toumi S, Trichet V, Venot C, Debussche L, Hercend T, et al. CD45neg but not CD45pos human myeloma cells are sensitive to the inhibition of IGF-1 signaling by a murine anti-IGF-1R monoclonal antibody, mAVE1642. *J. Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):4218-4223.
- Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Bataille R, Amiot M. A humanised anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances Bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. *Br. J. Cancer.* 2009 Jan 27;100(2):366-369.
- Dispenzieri A, Gertz MA, Lacy MQ, Geyer SM, Greipp PR, Rajkumar SV, et al. A phase II trial of imatinib in patients with refractory/relapsed myeloma. *Leuk. Lymphoma.* 2006 Jan;47(1):39-42.

- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 2002 Aug;8(8):793-800.
- Dorner M, Brandt S, Tinguely M, Zucol F, Bourquin J, Zauner L, et al. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. *Immunology.* 2009 Dec;128(4):573-579.
- Dotto GP. Notch tumor suppressor function. *Oncogene.* 2008 Sep 1;27(38):5115-5123.
- Drewinko B, Alexanian R, Boyer H, Barlogie B, Rubinow SI. The growth fraction of human myeloma cells. *Blood.* 1981 Fév;57(2):333-338.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 2008 Sep 1;27(38):5148-5167.
- Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* 2005 Mar;6(3):314-322.
- Durie BG, Levy HB, Voakes J, Jett JR, Levine AS. Poly(I,C)-LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma. *J Biol Response Mod.* 1985 Oct;4(5):518-524.
- Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 2008 Fév;9(2):129-136.
- Eliasson P, Jönsson J. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* 2010 Jan;222(1):17-22.
- Eliasz S, Liang S, Chen Y, De Marco MA, Machek O, Skucha S, et al. Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene.* 2010 Avr 29;29(17):2488-2498.
- El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene.* 2008 Jan 7;27(2):244-252.
- Ermolaeva MA, Michallet M, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2008 Sep;9(9):1037-1046.
- Ferlin-Bezombes M, Jourdan M, Liautard J, Brochier J, Rossi JF, Klein B. IFN-alpha is a survival factor for human myeloma cells and reduces dexamethasone-induced apoptosis. *J. Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):2692-2699.
- Fernández-Medarde A, Porteros A, de las Rivas J, Núñez A, Fuster JJ, Santos E. Laser microdissection and microarray analysis of the hippocampus of Ras-GRF1 knockout mice reveals gene expression changes affecting signal transduction pathways related to memory and learning. *Neuroscience.* 2007 Avr 25;146(1):272-285.
- Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;353-361.
- Ferreri AJM, Zucca E. Marginal-zone lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007 Sep;63(3):245-256.

- Feyerabend TB, Terszowski G, Tietz A, Blum C, Luche H, Gossler A, et al. Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):67-79.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009 Déc;23(12):2210-2221.
- Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest.* 2010 Jan 4;120(1):41-50.
- Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2003;53:139-158.
- Gang AO, Arpi M, Gang UJO, Vangsted AJ. Early infections in patients undergoing high-dose treatment with stem cell support: a comparison of patients with non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma. *Hematology*. 2010 Aoû;15(4):222-229.
- Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* 2009 Aoû 31;206(9):1983-1994.
- Ganley-Leal LM, Liu X, Wetzler LM. Toll-like receptor 2-mediated human B cell differentiation. *Clin. Immunol.* 2006 Sep;120(3):272-284.
- Gastinne T, Leleu X, Duhamel A, Moreau A, Franck G, Andrieux J, et al. Plasma cell growth fraction using Ki-67 antigen expression identifies a subgroup of multiple myeloma patients displaying short survival within the ISS stage I. *Eur. J. Haematol.* 2007 Oct;79(4):297-304.
- Ghoshal P, Nganga AJ, Moran-Giusti J, Szafrank A, Johnson TR, Bigelow AJ, et al. Loss of the SMRT/NCOR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2009 Mai 15;69(10):4380-4387.
- Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barillé S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*. 2001 Déc 15;98(13):3527-3533.
- Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 2006 Déc 15;108(13):3992-3996.
- Gómez-Benito M, Balsas P, Carvajal-Vergara X, Pandiella A, Anel A, Marzo I, et al. Mechanism of apoptosis induced by IFN- α in human myeloma cells: role of Jak1 and Bim and potentiation by rapamycin. *Cell. Signal.* 2007 Avr;19(4):844-854.
- Gomez-Bougie P, Bataille R, Amiot M. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.* 2004 Nov;34(11):3156-3164.
- Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, Bataille R, Amiot M. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene*. 2005 Déc 1;24(54):8076-8079.
- Gomez-Bougie P, Wuillème-Toumi S, Ménoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, et al. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5418-5424.

- González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3112-3121.
- Graziani I, Elias S, De Marco MA, Chen Y, Pass HI, De May RM, et al. Opposite effects of Notch-1 and Notch-2 on mesothelioma cell survival under hypoxia are exerted through the Akt pathway. *Cancer Res*. 2008 Déc 1;68(23):9678-9685.
- Greipp PR, Witzig TE, Gonchoroff NJ, Habermann TM, Katzmann JA, O'Fallon WM, et al. Immunofluorescence labeling indices in myeloma and related monoclonal gammopathies. *Mayo Clin. Proc*. 1987 Nov;62(11):969-977.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-899.
- Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):937-941.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell*. 2005 Nov;9(5):617-628.
- Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):315-323.
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):15-19.
- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 1977 Jul 29;197(4302):461-463.
- Han J, Ma I, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J. The cytotoxicity of gamma-secretase inhibitor I to breast cancer cells is mediated by proteasome inhibition, not by gamma-secretase inhibition. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R57.
- Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Visan I, Guidos CJ. Notch signaling in development and disease. *Clin. Genet*. 2003 Déc;64(6):461-472.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Avr 26;410(6832):1099-1103.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660-2669.
- Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Avr;9(4):293-307.
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2003;21:107-137.
- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001 Avr 1;61(7):3071-3076.

- Hilbert DM, Kopf M, Mock BA, Köhler G, Rudikoff S. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J. Exp. Med.* 1995 Jul 1;182(1):243-248.
- Hoang B, Zhu L, Shi Y, Frost P, Yan H, Sharma S, et al. Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood.* 2006 Jun 1;107(11):4484-4490.
- Hock H. Some hematopoietic stem cells are more equal than others. *J. Exp. Med.* 2010 Jun 7;207(6):1127-1130.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 2002 Mai 1;168(9):4531-4537.
- Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood.* 2004 Déc 1;104(12):3697-3704.
- Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, et al. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2004 Jun;5(6):638-644.
- Hu L, Shi Y, Hsu J, Gera J, Van Ness B, Lichtenstein A. Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood.* 2003 Avr 15;101(8):3126-3135.
- Hu J, Handisides DR, Van Valckenborgh E, De Raeve H, Menu E, Vande Broek I, et al. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood.* 2010 Jun 7; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530289>
- Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* 2008 Avr 18;133(2):235-249.
- Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Taniguchi O, et al. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2172-2178.
- Ishikawa H, Tsuyama N, Obata M, Kawano M. Mitogenic signals initiated via interleukin-6 receptor complexes in cooperation with other transmembrane molecules in myelomas. *J Clin Exp Hematop.* 2006 Nov;46(2):55-66.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004 Oct;5(10):987-995.
- Jahrsdorfer B, Mühlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, et al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin. Cancer Res.* 2005 Fév 15;11(4):1490-1499.
- Jasani B, Navabi H, Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine.* 2009 Mai 26;27(25-26):3401-3404.
- Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001 Mar 15;97(6):1817-1822.

- Jego G, Palucka AK, Blanck J, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 2003 Aoû;19(2):225-234.
- Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006 Jun;20(6):1130-1137.
- Jia X, Lu Z, Wang H, Duan H, Zhang Q, Wu C, et al. [Suppressive effect of Notch signal activation on apoptosis of multiple myeloma cells]. (Abstract) *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2004 Jun;12(3):335-339.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med*. 2001 Avr 5;344(14):1052-1056.
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol*. 2002 Mai 15;168(10):5233-5239.
- Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med*. 2010 Jun 7;207(6):1247-1260.
- Jourdan M, Zhang XG, Portier M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. IFN-alpha induces autocrine production of IL-6 in myeloma cell lines. *J. Immunol*. 1991 Déc 15;147(12):4402-4407.
- Juge-Morineau N, François S, Puthier D, Godard A, Bataille R, Amiot M. 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*. 1995 Jul;90(3):707-710.
- Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2002 Mai 1;99(9):3398-3403.
- Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Mai 1;103(9):3511-3515.
- Jundt F, Acikgöz O, Kwon S, Schwarzer R, Anagnostopoulos I, Wiesner B, et al. Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2008 Aoû;22(8):1587-1594.
- Kalambokis GN, Christou L, Tsianos EV. Multiple myeloma presenting with an acute bacterial infection. *Int J Lab Hematol*. 2009 Aoû;31(4):375-383.
- Kapoor P, Greipp PT, Morice WG, Rajkumar SV, Witzig TE, Greipp PR. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br. J. Haematol*. 2008 Avr;141(2):135-148.
- Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med*. 2000 Nov 6;192(9):1365-1372.

- Kared H, Adle-Biassette H, Foïs E, Masson A, Bach J, Chatenoud L, et al. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity*. 2006 Nov;25(5):823-834.
- Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12542-12550.
- Karp JE, Burke PJ, Saylor PL, Humphrey RL. Correlation of proliferative and clonogenic tumor cells in multiple myeloma. *Cancer Res.* 1984 Sep;44(9):4197-4200.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007 Nov;13(11):460-469.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*. 1988 Mar 3;332(6159):83-85.
- Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng W, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007 Aoû;12(2):131-144.
- Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007 Mai 4;129(3):465-472.
- Khvalevsky E, Rivkin L, Rachmilewitz J, Galun E, Giladi H. TLR3 signaling in a hepatoma cell line is skewed towards apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 2007 Avr 1;100(5):1301-1312.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1109-1121.
- Kijima M, Yamaguchi T, Ishifune C, Maekawa Y, Koyanagi A, Yagita H, et al. Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2-Notch interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Mai 13;105(19):7010-7015.
- Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 2004 Oct;14(5):359-372.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000 Jun;12(6):611-620.
- Kleef R, Jonas WB, Knogler W, Stenzinger W. Fever, cancer incidence and spontaneous remissions. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(2):55-64.
- Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*. 1989 Fév;73(2):517-526.
- Klein B, Lu ZY, Gu ZJ, Costes V, Jourdan M, Rossi JF. Interleukin-10 and Gp130 cytokines in human multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*. 1999 Jun;34(1-2):63-70.
- Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int. J. Hematol.* 2003 Aoû;78(2):106-113.

- Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, et al. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* 2006 Mai 15;176(10):6211-6218.
- Kolev V, Kacer D, Trifonova R, Small D, Duarte M, Soldi R, et al. The intracellular domain of Notch ligand Delta1 induces cell growth arrest. *FEBS Lett.* 2005 Oct 24;579(25):5798-5802.
- Kopan R, Ilagan MXG. Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004 Jun;5(6):499-504.
- Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009 Avr 17;137(2):216-233.
- Kovacs E. Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells? *Leuk. Res.* 2010 Jul;34(7):912-916.
- Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 2007 Mai;117(5):1184-1194.
- Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene.* 2008 Jan 7;27(2):161-167.
- Krishnamoorthy N, Oriss TB, Paglia M, Fei M, Yarlagadda M, Vanhaesebroeck B, et al. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* 2008 Mai;14(5):565-573.
- Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Mar;2(3):175-187.
- Kukreja A, Hutchinson A, Dhodapkar K, Mazumder A, Vesole D, Angitapalli R, et al. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2006 Aoû 7;203(8):1859-1865.
- Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, et al. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity.* 2003 Mai;18(5):699-711.
- Kyle RA, Kumar S. The significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica.* 2009 Déc;94(12):1641-1644.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008 Mar 15;111(6):2962-2972.
- Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell.* 2008 Fév 22;132(4):612-630.
- Landgren O, Rapkin JS, Mellekjær L, Gridley G, Goldin LR, Engels EA. Respiratory tract infections in the pathway to multiple myeloma: a population-based study in Scandinavia. *Haematologica.* 2006 Déc;91(12):1697-1700.
- Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmán JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009 Mai 28;113(22):5412-5417.

- Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer*. 2003 Mai 15;97(10):2440-2452.
- LaVoie MJ, Selkoe DJ. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J. Biol. Chem.* 2003 Sep 5;278(36):34427-34437.
- Lefevre G, Glotin A, Calipel A, Mouriaux F, Tran T, Kherrouche Z, et al. Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31769-31779.
- Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Gollasch H, Dörken B, et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2004 Nov;18(11):1883-1890.
- Li X, Pennisi A, Zhan F, Sawyer JR, Shaughnessy JD, Yaccoby S. Establishment and exploitation of hyperdiploid and non-hyperdiploid human myeloma cell lines. *Br. J. Haematol.* 2007 Sep;138(6):802-811.
- Li Z, Chen H, Campbell RA, Bonavida B, Berenson JR. NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr. Opin. Hematol.* 2008 Jul;15(4):391-399.
- Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2010 Jun 17;115(24):5041-5052.
- Link BK, Ballas ZK, Weisdorf D, Wooldridge JE, Bossler AD, Shannon M, et al. Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. *J. Immunother.* 2006 Oct;29(5):558-568.
- Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):296-304.
- Lode' L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wullemme S, Richebourg S, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010 Jul 15; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634494>
- Lovell R, Dunn JA, Begum G, Barth NJ, Plant T, Moss PA, et al. Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br. J. Haematol.* 2005 Apr;130(4):542-548.
- Mahtouk K, Moreaux J, Hose D, Rème T, Meissner T, Jourdan M, et al. Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays. *BMC Cancer*. 2010;10:198.
- Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Apr 10;2(4):356-366.

- Mancini SJC, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2340-2342.
- Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2009 Jun;10(6):587-594.
- Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 2009 Apr;21(4):185-193.
- Månsson A, Adner M, Höckerfelt U, Cardell L. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology*. 2006 Apr;118(4):539-548.
- Martinez-Climent JA, Fontan L, Gascoyne RD, Siebert R, Prosper F. Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence? *Haematologica*. 2010 Fév;95(2):293-302.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2332-2336.
- Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):190-197.
- McDermott SP, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 2010 Jun 17; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599450>
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, Daniels S, Moreau P, Le Gouill S, et al. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood*. 2006 Apr 15;108(4):1346-1352.
- Ménoret E, Maïga S, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Fraslon C, Cappellano M, et al. IL-21 stimulates human myeloma cell growth through an autocrine IGF-1 loop. *J. Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6837-6842.
- Menu E, van Valckenborgh E, van Camp B, Vanderkerken K. The role of the insulin-like growth factor 1 receptor axis in multiple myeloma. *Arch. Physiol. Biochem*. 2009 Mai;115(2):49-57.
- Miele L. Notch signaling. *Clin. Cancer Res*. 2006 Fév 15;12(4):1074-1079.
- Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005 Sep;13(3):205-220.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*. 2004 Mar;5(3):221-230.
- Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol. Cancer*. 2009;8:128.
- Montero JC, López-Pérez R, San Miguel JF, Pandiella A. Expression of c-Kit isoforms in multiple myeloma: differences in signaling and drug sensitivity. *Haematologica*. 2008 Jun;93(6):851-859.
- Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880-1885.

- Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, Pineau D, Morineau N, Milpied N, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*. 2004 Mai;89(5):547-551.
- Moreau P, Robillard N, Jégo G, Pellat C, Le Gouill S, Thoumi S, et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br. J. Haematol*. 2006 Jan;132(2):168-170.
- Morikawa T, Sugiyama A, Kume H, Ota S, Kashima T, Tomita K, et al. Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2007 Oct 1;13(19):5703-5709.
- Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J. Cell. Sci*. 2005 Oct 15;118(Pt 20):4589-4592.
- Myeloma Trialists' Collaborative Group. Interferon as therapy for multiple myeloma: an individual patient data overview of 24 randomized trials and 4012 patients. *Br. J. Haematol*. 2001 Jun;113(4):1020-1034.
- Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*. 2004 Mai 1;103(9):3503-3510.
- Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*. 2008 Fév 15;111(4):2220-2229.
- Nefedova Y, Gabrilovich D. Mechanisms and clinical prospects of Notch inhibitors in the therapy of hematological malignancies. *Drug Resist. Updat*. 2008 Déc;11(6):210-218.
- Nucci M, Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma. *Semin. Hematol*. 2009 Jul;46(3):277-288.
- Oancea M, Mani A, Hussein MA, Almasan A. Apoptosis of multiple myeloma. *Int. J. Hematol*. 2004 Oct;80(3):224-231.
- Okamoto M, Furuichi S, Nishioka Y, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, et al. Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res*. 2004 Aoû 1;64(15):5461-5470.
- Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, et al. Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J. Biol. Chem*. 2006 Mar 24;281(12):7890-7898.
- Olivier A, Lauret E, Gonin P, Galy A. The Notch ligand delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2006 Avr 1;107(7):2694-2701.
- O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2007 Mai;7(5):353-364.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Fév 22;132(4):631-644.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-245.

- Paiva B, Vidriales M, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4017-4023.
- Panaretakis T, Hjortsberg L, Tamm KP, Björklund A, Joseph B, Grandér D. Interferon alpha induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell*. 2008 Jan;19(1):41-50.
- Pandiella A, Carvajal-Vergara X, Tabera S, Mateo G, Gutiérrez N, San Miguel JF. Imatinib mesylate (STI571) inhibits multiple myeloma cell proliferation and potentiates the effect of common antimyeloma agents. *Br. J. Haematol*. 2003 Déc;123(5):858-868.
- Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 2008 Jul;29(7):1334-1342.
- Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Mar 6;104(10):4048-4053.
- Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*. 1994 Oct 15;84(8):2597-2603.
- Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol. Dis*. 2004 Avr;32(2):293-301.
- Pilarski LM, Giannakopoulos NV, Szczepek AJ, Masellis AM, Mant MJ, Belch AR. In multiple myeloma, circulating hyperdiploid B cells have clonotypic immunoglobulin heavy chain rearrangements and may mediate spread of disease. *Clin. Cancer Res*. 2000 Fév;6(2):585-596.
- Pilarski LM, Belch AR. Circulating monoclonal B cells expressing P glycoprotein may be a reservoir of multidrug-resistant disease in multiple myeloma. *Blood*. 1994 Fév 1;83(3):724-736.
- Pilarski LM, Belch AR. Clonotypic myeloma cells able to xenograft myeloma to nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice copurify with CD34 (+) hematopoietic progenitors. *Clin. Cancer Res*. 2002 Oct;8(10):3198-3204.
- Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):10-24.
- Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Haematol*. 2007 Sep;138(5):563-579.
- Purdue MP, Lan Q, Wang SS, Kricker A, Menashe I, Zheng T, et al. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2009 Fév;30(2):275-281.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol*. 1999 Déc;29(12):3945-3950.
- Qiang Y, Yao L, Tosato G, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):301-308.

- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 2006 Fév 20;203(2):413-424.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008 Déc 4;456(7222):593-598.
- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet.* 2009 Jul 25;374(9686):324-339.
- Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity.* 2010 Jan 29;32(1):14-27.
- Rasmussen T, Haaber J, Dahl IM, Knudsen LM, Kerndrup G, Lodahl M, et al. Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2010 Mai 29; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511669>
- Ray P, Krishnamoorthy N, Ray A. Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells: regulators of T cell differentiation. *Cell Cycle.* 2008 Sep 15;7(18):2826-2832.
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res.* 2005 Sep 15;65(18):8530-8537.
- Reid GSD, She K, Terrett L, Food MR, Trudeau JD, Schultz KR. CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood.* 2005 Mai 1;105(9):3641-3647.
- Reiman T, Seeberger K, Taylor BJ, Szczepek AJ, Hanson J, Mant MJ, et al. Persistent preswitch clonotypic myeloma cells correlate with decreased survival: evidence for isotype switching within the myeloma clone. *Blood.* 2001 Nov 1;98(9):2791-2799.
- Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood.* 2005 Jun 15;105(12):4845-4848.
- Romagnoli M, Desplanques G, Maïga S, Legouill S, Dreano M, Bataille R, et al. Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin. Cancer Res.* 2007 Oct 15;13(20):6010-6018.
- Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia.* 2009 Mar;23(3):435-441.
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood.* 2009 Jan 22;113(4):856-865.
- Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 2006 Avr;36(4):810-816.
- Sabnis AJ, Cheung LS, Dail M, Kang HC, Santaguida M, Hermiston ML, et al. Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2009 Mar 17;7(3):e59.
- Salaun B, Coste I, Rissoan M, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.* 2006 Avr 15;176(8):4894-4901.

- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin. Cancer Res.* 2007 Aoû 1;13(15 Pt 1):4565-4574.
- Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 2007 Déc;37(12):3311-3318.
- Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BG, Alberts DS, Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 1978 Jun 15;298(24):1321-1327.
- Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, et al. JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):6854-6857.
- Santos MA, Sarmiento LM, Rebelo M, Doce AA, Maillard I, Dumortier A, et al. Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Sep 25;104(39):15454-15459.
- Schulz O, Diebold SS, Chen M, Näslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature.* 2005 Fév 24;433(7028):887-892.
- Schwarzer R, Kaiser M, Acikgoez O, Heider U, Mathas S, Preissner R, et al. Notch inhibition blocks multiple myeloma cell-induced osteoclast activation. *Leukemia.* 2008 Déc;22(12):2273-2277.
- Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* 2010 Fév;11(2):141-147.
- Shin D, Shaffer DJ, Wang H, Roopenian DC, Morse HC. NOTCH is part of the transcriptional network regulating cell growth and survival in mouse plasmacytomas. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9202-9211.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401.
- Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Jul 6;101(27):10116-10121.
- Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity.* 2002 Déc;17(6):781-793.
- Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2006 Fév;20(2):286-295.
- Spaner DE, Foley R, Galipeau J, Bramson J. Obstacles to effective Toll-like receptor agonist therapy for hematologic malignancies. *Oncogene.* 2008 Jan 7;27(2):208-217.
- Spaner DE, Shi Y, White D, Shaha S, He L, Masellis A, et al. A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2010 Jan;24(1):222-226.
- Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Réme T, Shaughnessy JD, Barlogie B, et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood.* 2009 Mai 7;113(19):4614-4626.

- Standal T, Borset M, Lenhoff S, Wisloff F, Stordal B, Sundan A, et al. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002 Déc 1;100(12):3925-3929.
- Starnes CO. Coley's toxins. *Nature*. 1992 Nov 5;360(6399):23.
- Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*. 2002 Avr 1;99(7):2369-2378.
- Sun D, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat. Immunol*. 2006 Avr;7(4):375-381.
- Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest*. 2007 Mai;117(5):1137-1146.
- Szcepek AJ, Bergsagel PL, Axelsson L, Brown CB, Belch AR, Pilarski LM. CD34+ cells in the blood of patients with multiple myeloma express CD19 and IgH mRNA and have patient-specific IgH VDJ gene rearrangements. *Blood*. 1997 Mar 1;89(5):1824-1833.
- Tai Y, Li X, Breitkreutz I, Song W, Neri P, Catley L, et al. Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6675-6682.
- Takahashi T, Lim B, Jamal N, Trichter D, Lockwood G, McKinney S, et al. Colony growth and self renewal of plasma cell precursors in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol*. 1985 Déc;3(12):1613-1623.
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J. Immunol*. 2006 Avr 15;176(8):4520-4524.
- Takauji R, Iho S, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Kitagawa H, et al. CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J. Leukoc. Biol*. 2002 Nov;72(5):1011-1019.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-820.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999 Oct;11(4):443-451.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):10-14.
- Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y. Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *Am. J. Pathol*. 2005 Jun;166(6):1817-1826.
- Thomas M, Calamito M, Srivastava B, Maillard I, Pear WS, Allman D. Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation. *Blood*. 2007 Avr 15;109(8):3342-3350.
- Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. 2008 Mai;22(5):1044-1052.

- Tsai S, Fero J, Bartelmez S. Mouse Jagged2 is differentially expressed in hematopoietic progenitors and endothelial cells and promotes the survival and proliferation of hematopoietic progenitors by direct cell-to-cell contact. *Blood*. 2000 Apr;96(3):950-957.
- Tseng P, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DAA, Karin M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 2010 Jan;11(1):70-75.
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect. Immun.* 2000 Dec;68(12):6883-6890.
- Van Geelen CMM, de Vries EGE, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist. Updat.* 2004 Dec;7(6):345-358.
- Van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJEG. Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp. Hematol.* 2009 Jan;37(1):78-86.
- Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP, Zannettino ACW. Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):766-774.
- Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat. Med.* 2000 Nov;6(11):1278-1281.
- Wagner H. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. *Curr. Opin. Immunol.* 2008 Apr;20(4):396-400.
- Wandl U, Hoang T, Minden M, Messner HA. Segregation of precursors with high proliferative potential from their differentiated progeny in a myeloma cell line. *J. Cell. Physiol.* 1988 Apr;136(2):384-388.
- Wang R, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2008 Jan 7;27(2):181-189.
- Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat. Med.* 2002 Sep;8(9):979-986.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2006 Feb;6(2):93-106.
- Witzig TE, Timm M, Larson D, Therneau T, Greipp PR. Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 1999 Jan;104(1):131-137.
- Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 2010 Apr 15;464(7291):1052-1057.
- Guillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*. 2005 Jul;19(7):1248-1252.

- Xu FH, Sharma S, Gardner A, Tu Y, Raitano A, Sawyers C, et al. Interleukin-6-induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the JNK/SAPK pathway. *Blood*. 1998 Jul 1;92(1):241-251.
- Xu Y, Zhao Y, Huang H, Chen G, Wu X, Wang Y, et al. Expression and function of toll-like receptors in multiple myeloma patients: toll-like receptor ligands promote multiple myeloma cell growth and survival via activation of nuclear factor-kappaB. *Br J Haematol*. 2010 Jul 14; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629663>
- Yaccoby S, Epstein J. The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host. *Blood*. 1999 Nov 15;94(10):3576-3582.
- Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009 Nov 5;462(7269):99-103.
- Yang Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3639-3646.
- Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia*. 2004 Nov;18(11):1891-1897.
- Yustein JT, Liu Y, Gao P, Jie C, Le A, Vuica-Ross M, et al. Induction of ectopic Myc target gene JAG2 augments hypoxic growth and tumorigenesis in a human B-cell model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 Fév 23;107(8):3534-3539.
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):2020-2028.
- Zhang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood*. 1989 Jul;74(1):11-13.
- Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J. Exp. Med.* 1994a Avr 1;179(4):1337-1342.
- Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*. 1994b Jun 15;83(12):3654-3663.
- Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*. 2005 Déc 1;106(12):3898-3906.

ANNEXES

Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells

David Chiron,¹ Isabelle Bekeredjian-Ding,² Catherine Pellat-Deceunynck,¹ Régis Bataille,¹ and Gaëtan Jégou¹¹Inserm U892, Nantes, France; and ²Department of Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

The humoral immune system senses microbes via recognition of specific microbial molecular motifs by Toll-like receptors (TLRs). These encounters promote plasma cell differentiation and antibody production. Recent studies have demonstrated the importance of the TLR system in enhancing antibody-mediated defense against infections and maintaining memory B cells. These results have led the way to the design of vaccines that

target B cells by engaging TLRs. In hematologic malignancies, cells often retain B cell-specific receptors and associated functions. Among these, TLRs are currently exploited to target different subclasses of B-cell leukemia, and TLR agonists are currently being evaluated in clinical trials. However, accumulating evidence suggests that endogenous TLR ligands or chronic infections promote tumor growth, thus providing a need for

further investigations to decipher the exact function of TLRs in the B-cell lineage and in neoplastic B cells. The aim of this review is to present and discuss the latest advances with regard to the expression and function of TLRs in both healthy and malignant B cells. Special attention will be focused on the growth-promoting effects of TLR ligands on leukemic B cells and their potential clinical impact. (*Blood*. 2008;112:2205-2213)

Introduction

The human immune system is continuously challenged by commensal microflora as well as invasive infectious agents. The decision to mount a rapid and protective immune response to a pathogen is a consequence of the activation of the innate immune system via pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs), that sense microbial products.¹ TLR polymorphisms have been implicated in increased severity and predisposition to infection and septic shock² in both mice and humans. TLRs recognize highly conserved structures of viral (TLR3, 7, 8, and 9) and bacterial (TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, and 9) origin, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs; Figure 1). TLR2 heterodimerization with TLR1 or TLR6 is triggered by bacterial lipopeptides, whereas TLR3 is activated by double-stranded RNA, TLR4 is activated by lipopolysaccharide (LPS), TLR5 is activated by flagellin, TLR7 and TLR8 are activated by single-stranded RNA (ssRNA), and TLR9 is activated by unmethylated CpG DNA motifs. Moreover, endogenous ligands released during cellular stress or matrix degradation (eg, heat-shock proteins, fibronectin, heparan sulfates) are thought to activate TLRs.³ Numerous reports have described how TLRs orchestrate the immune response to pathogens in dendritic cells (DCs) and macrophages.⁴ Much less is known about the effects of TLR-mediated B-cell activation, although the design of vaccines could benefit from a more detailed understanding of this process.

Leukemic B cells often retain the expression of markers specific for their cellular origin (eg, CD5, CD10, CD138). Furthermore, several reports have demonstrated TLR expression and function in neoplastic B cells. Because DCs can be activated and matured upon triggering of TLRs, immunotherapeutic protocols in leukemia have recently included TLR agonists to improve tumor antigen presentation and subsequent T-cell activation.⁵ However, recent reports have indicated that leukemic cells could hijack the TLR machinery to their own benefit. A better understanding of the effects of TLR ligands on normal

B cells and their leukemic counterparts could therefore help avoid adverse vaccination effects. In this review, we will discuss the role of TLRs in generating the humoral immune response and their dual effects on different leukemic cell types.

TLR expression in normal and neoplastic B cells

Normal B-cell subsets and modulation of expression

The TLR expression pattern is specific for each cell type and is summarized in Figure 2 for human B cells. TLRs expression in human B cells is characterized by high expression of TLR1, 6, 7, 9, and 10.⁶⁻⁸ Low expression of TLR2 allows for the formation of the functional heterodimers TLR1/2 and TLR2/6, which are required to respond to diacylated and triacylated lipoproteins. The inability to be activated by LPS is a hallmark of human B cells because they lack TLR4, in contrast to mouse B cells. However, human B cells are well equipped to recognize nucleic acids given their expression of TLR7 and TLR9. This profile allows them to act synergistically as part of the innate immune system with plasmacytoid dendritic cells (pDCs) that bear the same TLR expression pattern. This cellular duo can be further stimulated with immune complexes (Ab-RNA/DNA, Ab-viruses), and therefore represents a crucial player in the initiation and amplification of antimicrobial responses as well as the propagation of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus.⁹⁻¹¹ More detailed studies on human B-cell populations have shown that peripheral blood-derived naive and memory B cells express distinct levels of TLR6, 7, and 9. Indeed, TLR6, 7, 9, and 10 are barely expressed by circulating naive B cells,⁷ whereas memory B cells display a higher sensitivity to TLR activation with a concomitant higher capacity for differentiation into plasma cells. Naive B cells are thus

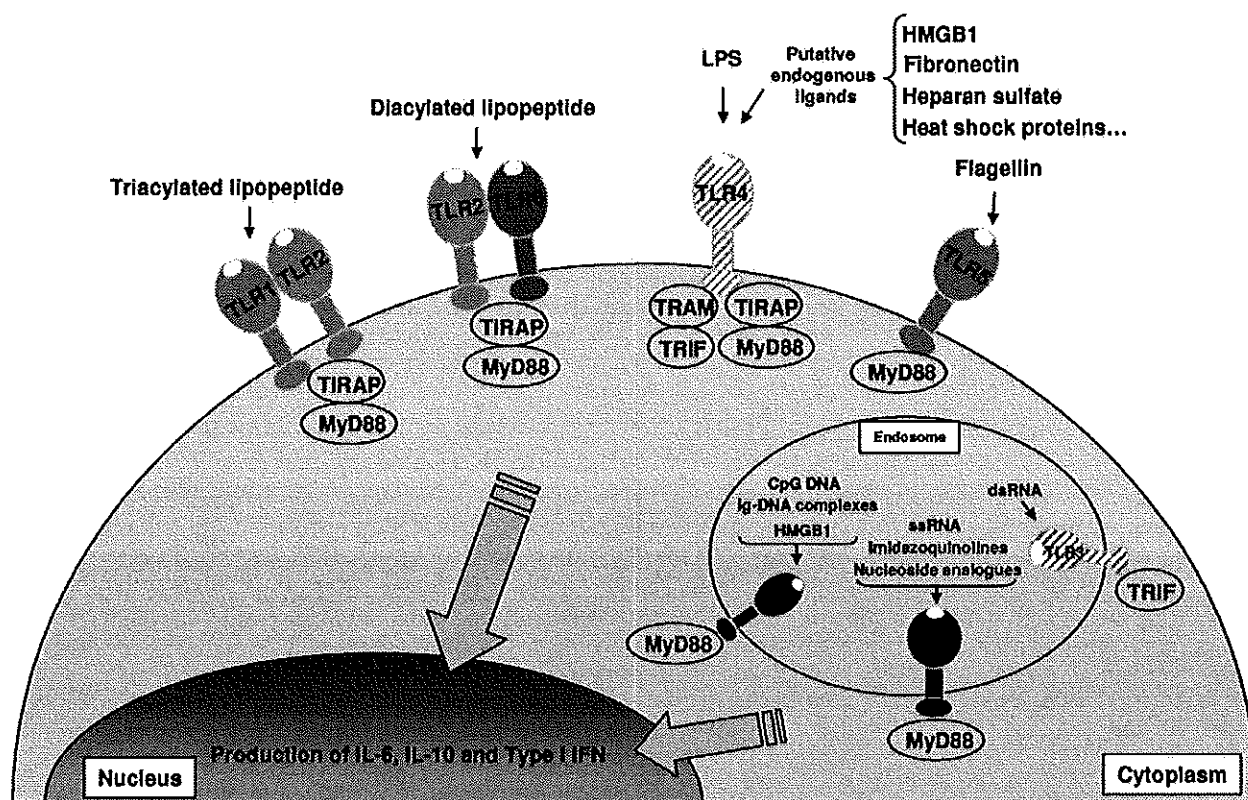


Figure 1. Overview of TLRs-TLR ligands and their signaling complexes in normal and malignant human B cells. TLR2 associates with TLR6 or TLR1 to form receptors that recognize diacylated and triacylated lipopeptides, respectively. TLR3 recognizes virally derived dsRNA. TLR4 recognizes LPS from Gram-negative bacteria, and several putative endogenous ligands. TLR5 recognizes bacterial flagellin. TLR7 and TLR8 recognize ssRNA from viruses, imidazoquinolines, and nucleoside analogues. TLR9 recognizes CpG DNA from bacteria and viruses, immunoglobulin-DNA complexes, and HMGB1. Unlike TLR1, 2, 5, 6, 7/8, and 9, which are expressed by normal and malignant human B cells, TLR3 and TLR4 are expressed solely by malignant B cells and are shown hatched. A total of 4 signaling adaptors are involved in TLR signaling: MyD88, TRIF, TRAM, and TIRAP. TLR signaling pathways result in the production of IL-6, IL-10, and type I IFN.

poorly responsive to circulating PAMP and require additional signals to mature into plasma cells.

Human B-cell localization seems to influence their TLR expression profile, as similarly high expression levels of TLR are found in naive, germinal center (GC), and memory B cells in the tonsils, while TLR9 levels are lower in circulating blood B cells.¹² Interestingly, TLR2 expression is restricted to a fraction of circulating B cells (IgG⁺, CD27⁺) that are characterized by intermediate expression levels of CD19 and CD69, whereas most tonsillar B cells express TLR2.^{12,13} Increased TLR expression in tonsillar B cells may thus result from local infections.¹⁴ Indeed, activation via the B-cell receptor (BCR) and/or CD40L, or by CpG oligodeoxynucleotides (ODNs), temporarily increases expression of TLR7, 9, and 10 in resting B cells.^{7,8} Furthermore, type I interferon (IFN), which is highly produced by pDCs during infections, induces TLR7 and MyD88 expression in naive peripheral blood B cells.¹⁵ However, TLR levels in B cells of infected and uninfected hyperplastic tonsils were found to be similar.¹² TLR expression regulation may therefore also differ depending on the local environment.

TLR expression studies in different subsets of murine B cells reveal a pattern slightly different from that found in human B cells, as murine naive B cells express high levels of TLRs. While TLR1, 2, 6, 7, and 9 are expressed to various degrees, TLR3 expression is primarily restricted to marginal zone B cells. Of note, TLR4 is conserved independently of the B-cell subtype. As in humans, expression of TLR5 and TLR8 is absent or negligible.^{16,17}

Human B cells and DCs share the expression of several TLRs. In both cell types, intracellular signal transduction initiated by TLR activation depends on the key signaling molecule MyD88 (except for TLR3) and results in nuclear translocation of NF- κ B, activation of PKB/Akt, Erk, and JNK mitogen-activated protein (MAP) kinases, and phosphorylation of interferon regulatory factor (IRF) transcription factor family members¹⁸ (Figure 1). These pathways induce similar cytokine secretion patterns (IL-6 and IL-10) and up-regulation of activation markers (ie, CD80, CD86, MHC II) in both cell types.¹⁹

Notably, TLR3 and TLR4, which both signal via TRIF, an adapter molecule that promotes MyD88-independent signaling, are not expressed in human B cells. To date, it is unclear whether TRIF plays a role in TLR-mediated B-cell activation. Similarly, a role for the TLR2/4-associated adapter proteins Mal/TIRAP and TRAM has thus far not been described in B cells. Another discrepancy exists in the recognition of LPS between B cells and DCs. Indeed, CD180 (RP105) structurally resembles TLRs but lacks a Toll/IL-1 receptor (TIR) domain and promotes LPS-driven B-cell responses in mice. In contrast, CD180 acts as a negative regulator of TLR4 signaling in monocytes and DCs.²⁰ Furthermore, human B cells are much less responsive than DCs to bacterial cell wall components due to their low or absent expression of surface TLRs. Thus, recognition of microbes is restricted to endosomal activation of nucleic acid-sensing TLRs in pDCs and B cells. This stands in marked contrast to human myeloid DCs, which are characterized by the absence of TLR7 and TLR9 but are fully equipped to react quickly to LPS and lipopeptides.

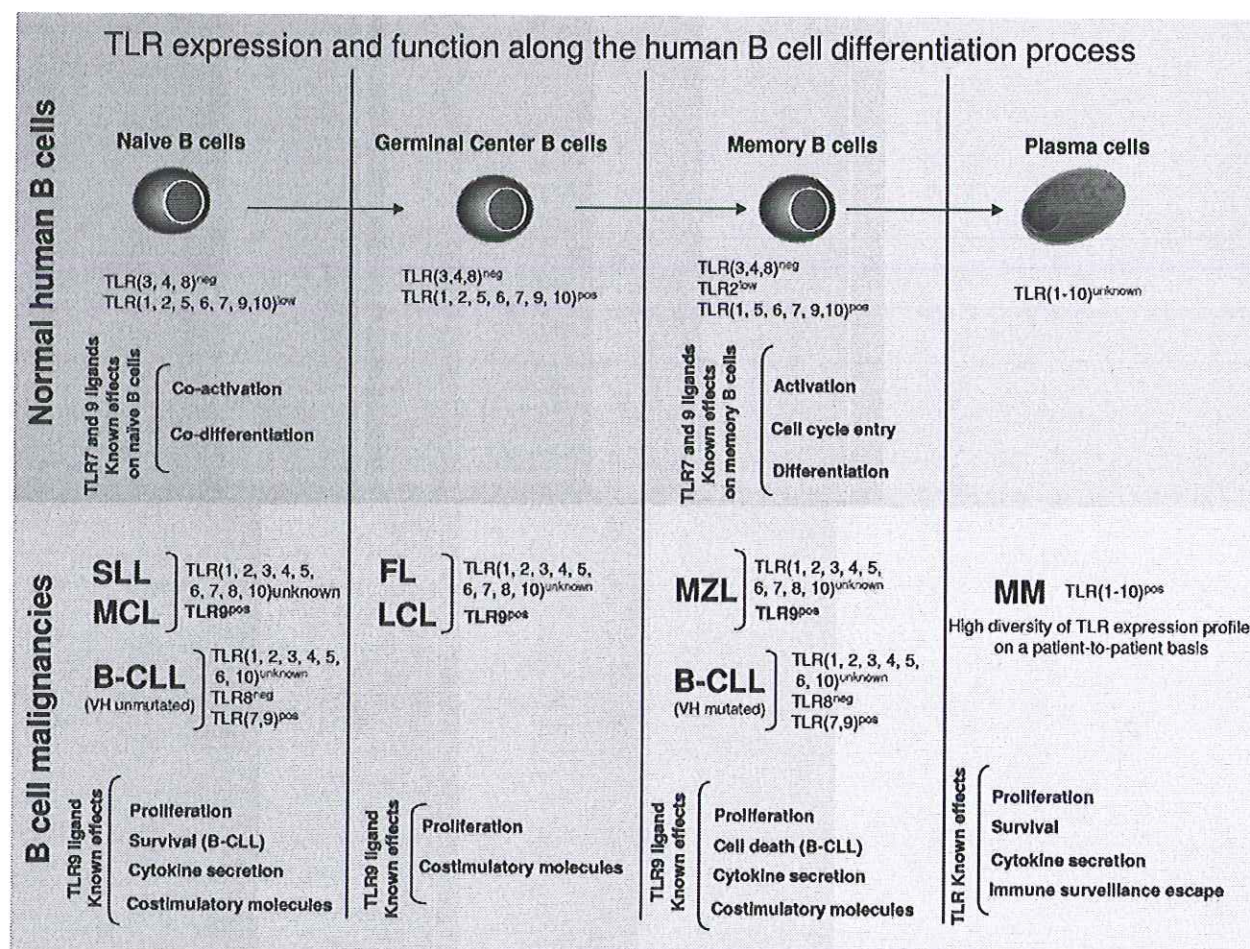


Figure 2. TLR expression and function during normal B-cell differentiation and in B-cell malignancies. MCL, B-cell SLL, B-CLL, FL, diffuse LCL, MZL, and MM.

Heterogeneous TLR expression in B-cell neoplasms

Information regarding TLR expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is restricted to TLR7, 8, and 9, and mirrors expression in normal B cells (Figure 2). Although variations exist among patients and cell lines, TLR7 and TLR9 have been detected in most samples,²¹⁻²⁵ whereas TLR8 was found to be absent.²⁵ Molecules involved in TLR signaling (IRAK1, IRAK4, TRAF6, and MyD88) are also expressed with high heterogeneity.²² B-CLL cells express TLR9 levels similar to those of peripheral blood B cells. TLR7 expression is frequently lower than in human peripheral blood mononuclear cells, where it is expressed by pDCs and memory B cells.²²

Precursor B acute lymphoblastic leukemia (pre-B-ALL) cells express TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 9; however, the question remains as to whether the aberrant expression of TLR3, 4, and 5 is a consequence of malignant differentiation or just a reflection of the normal B-cell precursor phenotype.

In multiple myeloma (MM), most primary tumors and cell lines express TLR1, 2, 3, 4, 7, 8, and 9. Among those, TLR1, 4, 7, and 9 are most frequently expressed.^{26,27} This expression pattern does not correlate with that of B cells or normal plasma cells (G.J. et al, unpublished data, August 2006), as TLR10 is lost, while TLR3, 4, and 8 are acquired by MM cells. A high level of heterogeneity exists among patients and cell lines; in some cases, this can be associated with disease activity markers. Indeed, DNA microarray analysis of a large panel of patients with MM has identified that

TLR4 is overexpressed in patients bearing activated *c-MAF* and *MAFB* proto-oncogenes, a condition that represents approximately 6% of patients and is associated with a poor outcome (Zhan et al²⁸ and G.J., unpublished data, December 2006). Furthermore, a recent report presented at the 11th International Myeloma Workshop suggested that high levels of TLR and MyD88 expression could be acquired during the transition from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) to overt MM (Munshi et al, meeting report). Thus, TLR expression may be associated with disease progression or even with poor outcome. Monitoring TLR and MyD88 expression during long-term follow-up of individuals with MGUS is necessary to confirm this observation.

Physiologic responses to TLR binding in normal B cells

The first encounter of naïve B cells with a pathogen induces secretion of both antigen-specific and -unspecific IgM. Accumulating evidence suggests that TLR engagement in B cells could be instrumental in the initiation and amplification of this response. Bacterial cell walls contain various molecules that activate surface TLRs (TLR1/2, TLR2/6, or TLR4). However, expression of these TLRs is low or even absent in naïve human B cells. In marked contrast, endosomally located nucleic acid-sensing TLR7 and TLR9 are present in naïve human B cells and are thought to be

major players in B-cell stimulation by microbes. Due to their endosomal localization, TLR7 and TLR9 stimulation must be preceded by endocytosis of microbial nucleic acids, which may occur upon bacterial disintegration or cellular infection via cell-surface receptor-mediated uptake. This leads to spatial and temporal segregation of TLR ligand availability, which translates into different levels of B-cell activation. Indeed, activation of human B cells by *Staphylococcus aureus* cell walls or TLR2 ligands depends on the presence of a costimulus, such as BCR ligation with anti-human Ig, or virulence factors, such as staphylococcal surface protein A (SpA). Only dual stimulation by SpA- and TLR2-active lipopeptides induces cell cycling, and additional IL-2 is required to fully differentiate a small number of Ab-secreting cells.²⁹ On the contrary, CpG ODN and synthetic TLR7 ligands are more potent stimuli that are sufficient to induce Ig synthesis. These findings suggest that safety mechanisms have evolved to avoid premature responses to ubiquitous TLR2 ligand-bearing commensal bacteria while allowing potent B-cell activation in the context of proliferation-induced microbial disintegration.

Another level of TLR-mediated B-cell activation control resides in the nature of naive B cells themselves. Indeed, in contrast to memory B cells, activation of naive B cells is difficult,³⁰ and TLR stimulation alone only induces limited activation.^{15,31} Full activation requires a combination of 3 signals³²: BCR triggering, assistance by T cells, and TLR stimulation. The absence of the latter prevents strong activation and plasma cell differentiation. This triple requirement suggests that full responsiveness of human naive B cells to TLR-activating PAMPs occurs only after specific antigenic engagement of the BCR.

Adjacent immune cells can regulate B-cell sensitivity to TLR ligands and provide costimulatory signals, such as BAFF and APRIL, that enhance TLR signaling (I.B.-D., unpublished data, April 2007).¹⁵ It has also been shown that DCs and particularly pDCs can control the humoral memory response to viruses through TLR expression and subsequent secretion of type I IFN.^{33,34} Thus, TLR activation can regulate the humoral response at several checkpoints.

In many aspects, the murine immune system is more sensitive to stimulation than that of humans. This is true for TLR function, as both naive and memory murine B cells respond equally to TLR agonists in vitro despite the absence of BCR activation.^{16,17} Furthermore, the murine B-cell subsets that are involved in T-independent responses (marginal zone B cells, B-1a and B-1b cells) respond to various TLR agonists (with the exception of flagellin and polyI:C) with strong proliferation and differentiation into plasma cells in vitro. This permits polyclonal secretion of antibodies during infections and thus increases the innate response. However, the role of TLRs in T-dependent immune responses has been explored with controversial results. One in vivo study showed that TLR4 and MyD88 in B cells were necessary for optimal GC formation and plasma cell differentiation.³⁵ In marked contrast, 2 other studies showed either no difference in Ab responses as compared with wild-type mice³⁶ or only a role restricted to response amplification.³⁷ The reasons for this discrepancy are still a matter of intense debate that will not be discussed in this review.³⁸

Ig class-switch recombination (CSR) permits the transition from IgM to the IgG, IgE, and IgA isotypes that have higher affinity to the target antigen and can enhance opsonization of microbes via Fc receptors. Studies in mouse models have shown that TLR can initiate CSR through up-regulation of the activation-induced cytidine deaminase (AID).³⁹ Additional signals from BCR, CD40L, BAFF, APRIL, IL-4, and/or IL-10 are needed, however, to fully

produce the Ig CSR. Furthermore, active CSR has been observed during murine B-cell bone marrow development after BCR or TLR engagement.^{40,41} In humans, CSR has been demonstrated upon TLR9 stimulation in combination with IL-10, BAFF, CD40L, or APRIL, the latter having been shown to induce CSR to IgA.

Formation of long-term humoral immunity is obtained through a persistent pool of memory B cells and long-lived plasma cells. Indeed, Ag-specific memory B cells must survive in the absence of cognate Ag, a situation that can last for months or even years. Their reactivation permits replenishment of their pool and is a source for new plasma cells. Recent reports suggest that TLRs play a role in this particular aspect of long-term memory. Because TLR triggering induces memory B-cell proliferation in the absence of BCR triggering, polyclonal activation by TLR ligands can occur during any kind of infection. In the absence of infection, minute amounts of TLR ligands may be sufficient to sustain homeostasis by allowing self-perpetuation of the system. Furthermore, this process represents a very efficient means for generating plasma cells. Indeed, vaccine boosts are accompanied by increased numbers of circulating plasma cells that are specific for vaccine antigens in addition to plasma cells specific for other recall antigens.⁴² However, the origin of the circulating polyclonal plasma cells has been challenged by studies suggesting that these cells represent resident bone marrow plasma cells that are reconstituted to the blood by the newly formed antigen-specific plasma cells.^{43,44} This mechanism is thought to generate space in the bone marrow niches, which have a finite capacity. However, because MyD88 is necessary to maintain long-lived mouse plasma cells,⁴⁵ and we have detected TLRs in normal plasma cells generated in vitro (G.J. et al, unpublished data, August 2006), we hypothesize that direct activation of plasma cells by TLR ligands could contribute to plasma cell-derived Ig secretion in addition to migration and survival.

B-cell neoplasms' response to TLR ligands

Proliferation

The effects of TLR activation in leukemic cells frequently mirror those observed in normal B cells. Upon CpG ODN stimulation, increased proliferation was observed in different lymphomas (mantle cell, B-cell small lymphocytic, follicular, and diffuse large B cell).²¹ Despite this common increase in proliferation, a highly heterogeneous level of response was observed when comparing different lymphomas and even on a patient-to-patient basis. Together with the variability in TLR expression, the variability in the response of malignant B cells to TLR binding is representative of the heterogeneity of B-cell neoplasias.

The highest proliferation induction was seen in marginal zone lymphomas (MZLs), possibly because MZL is derived from memory B cells. Memory B cells are very sensitive to TLR9 activation when compared with naive and GC B cells. However, a broader panel of patients in each category is necessary to validate these data and fully explore the cause of the variability because the number of patients was limited.

In contrast to data on B-cell lymphomas, several reports have shown a frequent increase of proliferation in B-CLLs. Stimulating B-CLLs with CpG ODNs induces cell-cycle entry and increases thymidine incorporation.^{21,46,47} Synergy with IL-2- or CD40L-induced proliferation of B-CLLs has also been observed.^{46,48} The latter effect could be explained by up-regulation of CD40 expression in B-CLLs upon CpG ODN stimulation.²¹ On the contrary, heterogeneous and mostly weak proliferation of B-CLL cells has

been observed upon TLR7 stimulation.^{49,50} TLR9-induced proliferation is mainly observed in samples from patients with progressive diseases or bearing unmutated immunoglobulin variable heavy chain genes (V_H), which correlate with bad prognoses.²³ Contrarily, CpG ODNs frequently induce apoptosis in patients with stable disease, V_H mutations,²³ or low serum thymidine kinase activity.⁵¹ Interestingly, the differences observed between patients in these 2 B-CLL subgroups do not correlate with TLR9 expression levels^{23,52} but rather with prolonged activation of signaling pathways, including Akt, MAP kinase p38, and NFκB.

Unlike findings obtained in other B-cell leukemic cell types, no change in proliferation was observed for pre-B-ALL cells in the presence of ligands for TLR2, 7, and 9 despite changes in cell-surface marker expression.^{53,54}

Similar to B-CLLs, MM cells frequently respond with strongly increased proliferation when challenged with ligands for TLR2, 3, 4, 5, 7, or 9. Cell viability and absolute cell numbers for cell lines and primary MM cells increase over the time in culture.²⁶ In several MM cell lines, TLR-induced proliferation and survival is mediated by autocrine secretion of IL-6, which is the major MM growth factor. IL-6-independent increases in proliferation have also been observed for some MM cell lines (G.J. et al, unpublished observation, June 2007). The TLR responsiveness of MM cells raises the question of whether this phenomenon can be considered a hallmark of the plasma cell differentiation that is conserved throughout the oncogenic process or rather a characteristic of malignant transformation. However, evidence of a central role for MyD88 in bone marrow plasma cell formation supports the former.⁴⁵

Immunomodulatory effects of TLR on neoplastic B cells

Because triggering TLRs induces DC maturation and increases their stimulatory properties, several studies have focused on the use of TLR ligands to improve the immunostimulatory potential of leukemic B cells as a therapeutic tool.

B-CLL cells display poor antigen-presenting capacity and costimulatory activity when cocultured with autologous or allogeneic T cells. This is partially due to low expression of costimulatory molecules.⁵⁵ Interestingly, ligands for TLR7 and TLR9 but not ligands for TLR2 and TLR3 can induce changes in costimulatory molecule expression in B-CLLs. CpG ODNs and imidazoquinolines equal or even surpass CD40L in their ability to up-regulate CD40, CD54, CD80, CD86, and MHC class I and II.^{21,22,48}

Lymphoma cells similarly respond to TLR9 triggering by increasing their expression of these costimulatory molecules. However, differences exist because mantle cell lymphoma (MCL) cells show no significant up-regulation of CD80, CD86 or MHC class I, and large cell lymphoma (LCL) cells do not show increased MHC class I and II expression.

Recent questions have addressed whether these phenotypic changes are sufficient to trigger T-cell responses against tumor antigens or whether they actually contribute to tumor evasion of the immune response. It should be noted that partial or inappropriate T-cell activation can induce anergy and regulatory T cells.⁵⁶ This may be particularly true for ALLs because the effect of CpG ODNs on the costimulatory capacity of pre-ALL cells is limited; CD40 is the only costimulatory molecule that is up-regulated. Furthermore, ALL cells treated with CpG ODNs are unable to induce proliferative allogeneic T-cell responses, and their cytokine profile is shifted toward IFNγ and IL-10 secretion without IL-5 production, a phenotype that closely corresponds to that of Tr1 cells. This cytokine secretion profile is further accompanied by high levels of

IL-6 and IL-10, 2 cytokines with known immunosuppressive function in the absence of IL-12p70.⁵³ This cytokine profile is reminiscent of normal B cells upon CpG ODN stimulation (I.B.-D. et al, unpublished data, September 2007). Similarly, stimulation of B-CLL cells with CpG ODNs or imidazoquinoline induces little or no T-cell proliferation,^{46,50} but generates high levels of IL-6 and IL-10 synthesis. Upon restimulation with imidazoquinoline, this cytokine pattern is either sustained or slightly enhanced, while TNFα secretion is strongly inhibited.²⁴ Given that TNFα is a DC maturation factor, we hypothesize that repeated stimulation may shift the immune response toward tolerization. Interestingly, increased IL-10 levels have been described in patients with B-CLL with progressive disease.⁵⁰

Moreover, MM cell stimulation via activation of TLR2, 4, or 9 inhibits cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation by inducing B7-H1 expression.⁵⁷ Furthermore, our unpublished data (June 2006) suggest that the resistance of MM cells to these effectors is increased. Altogether, there are abundant data that support a direct role for TLR ligands in the shaping of the immune response via activation of leukemic B cells.

Therapeutic approaches to improve the immunostimulatory potential of leukemic cells must be combined with a therapeutic tool that will abrogate protumoral machinery while preserving or even enhancing the expression of costimulatory molecules. In B-CLLs, exogenous IL-2 strongly increases CD80 and CD86 expression and allogeneic T-cell stimulation when combined with CpG ODNs or imidazoquinoline.^{46,50} However, recent *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that IL-2 contributes to regulatory T-cell development,^{58,59} thus bringing the potential benefit of this combination into question. More recently, protocols including concomitant administration of a protein kinase C (PKC) agonist with a TLR7 ligand have attracted attention. Initial studies have observed inhibition of tumor cell proliferation and reduced IL-10 secretion, in addition to increased T-cell proliferation.⁵⁰

Drug sensitivity in the context of TLR stimulation

Targeting TLRs on malignant B cells results in phenotypic and functional changes that affect cellular sensitivity to pharmacologic substances. These alterations can induce resistance to chemotherapeutic agents but can also be exploited for combined therapeutic approaches. For example, CD20 expression is increased in many different types of malignant B cells after CpG ODN stimulation (small lymphocytic lymphoma [SLL], MZL, and CLL strongly; MCL, LCL, and follicular lymphoma [FL] weakly).²¹ Because increased CD20 expression could improve the efficacy of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, clinical trials are under way to investigate the efficacy of this combination. Moreover, the sensitivity of B-CLL cells to fludarabine alone or in combination with mafosfamide can be strongly enhanced by a TLR7 ligand (loxoribine).⁶⁰ It has also become clear that the time of TLR ligand administration is critical to properly enhance the effect of cytotoxic drugs. For example, a single treatment of B-CLL cells with a TLR7 ligand protected the cells against high-dose vincristine toxicity, whereas repeated exposure sensitized the cells.²⁴ In MM, however, CD20 expression has not been observed after stimulation with TLR ligands (Jahrsdorfer et al²¹ and G.J., unpublished data, November 2007), and TLR7 and TLR9 ligands protect MM cells from dexamethasone-induced apoptosis.²⁶ Therefore, MM cells may form a separate entity with different characteristics.

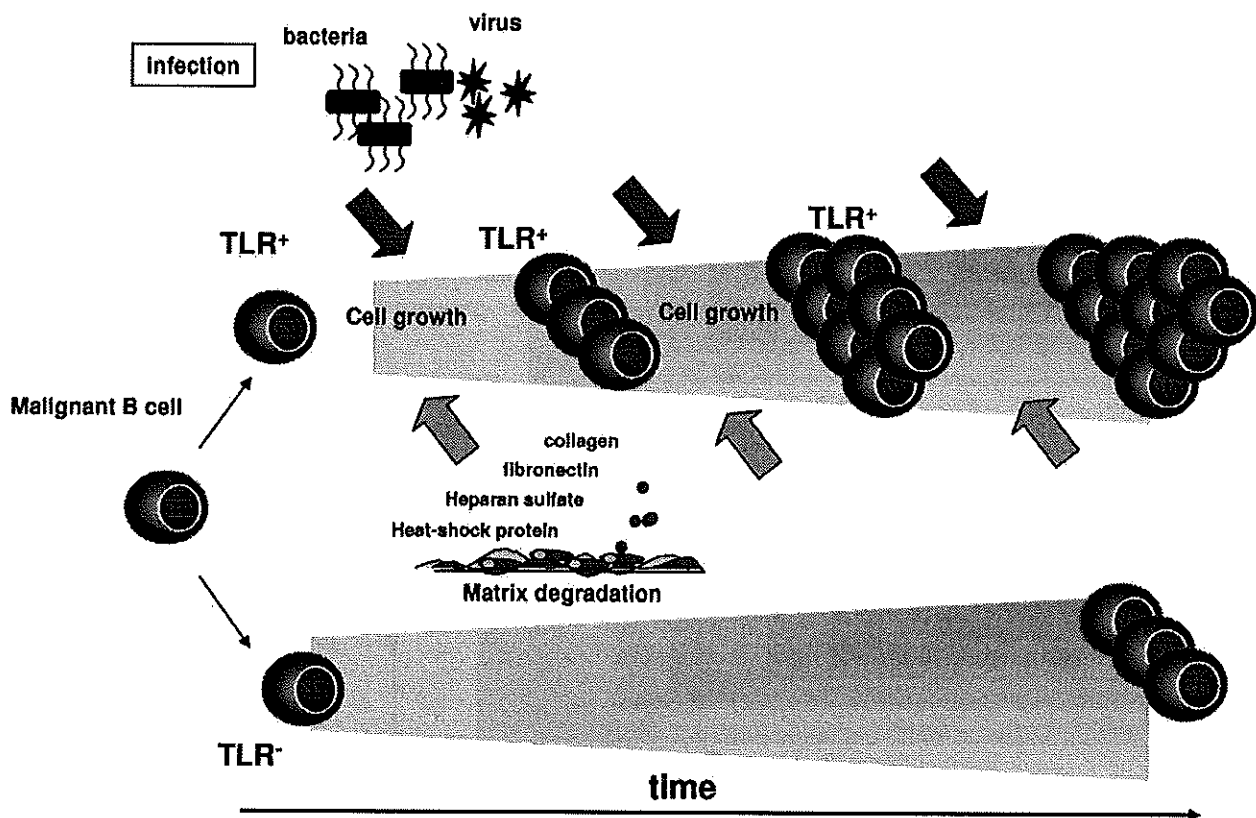


Figure 3. Model of cell growth-promoting effects of TLR ligands on malignant B cells. Recurrent bacterial or viral infections, or endogenous TLR ligands released by cellular stress (eg, collagen, fibronectin, heparin sulfate, heat-shock proteins) could favor the expansion of TLR-expressing malignant B-cell clones over those that have not acquired or retained TLR expression. TLR ligands would then promote cell growth and/or escape from immune surveillance.

Putative involvement of endogenous TLR ligands in leukemic cell growth

Apart from microbial molecular patterns, a broad array of molecules released in the context of tissue damage, cellular stress, or cell death may also be recognized by TLRs. These danger-associated molecular patterns (DAMPs) represent host-derived TLR ligands. Recently, a broad variety of molecules has been described as endogenous TLR ligands and mainly target TLR2 and TLR4. Among them, fibronectin, fibrinogen, heparan sulfate, and heat-shock proteins comprise the most prominent examples.^{3,61} Interestingly, DAMPs can also be generated by cell death during chemotherapy; one of the molecules that accumulates in this setting is HMGB1, which is described as a TLR4 or TLR9 agonist.^{62,63} However, care must be taken regarding the ability of endogenous molecules to bind TLRs; difficulty in chemically separating contaminating TLR2-active lipopeptides and LPS from candidate molecules results in a very heterogeneous panel of identified autologous TLR ligands. Only very few of these ligand will be validated over time.⁶⁴ Despite this drawback, accumulating evidence suggests that endogenous TLR ligands are involved in solid tumor progression,^{65,66} although evidence for leukemia-promoting effects has not yet been found. Nevertheless, HMGB1 is released by osteoclasts⁶⁷ and could stimulate adjacent MM cells; in addition, heparan sulfate proteoglycans expressed on MM cells such as CD138 could bind to TLR4 and act as autocrine survival factors. Despite the findings that soluble CD138 and heparanase levels as well as TLR4 expression all correlate with poor prognoses and degradation of the MM cellular matrix could facilitate the interac-

tion of endogenous TLR ligands with tumor cells, further investigations are required to validate this association.

TLR activation of both immune and neoplastic cells: how to shift the balance?

Synthetic TLR ligands improve DC function and break immune tolerance in vitro and in mouse models of cancer. These findings prompted investigators to start clinical trials using TLR ligands as adjuvants. Although there is evidence for immune cell activation, the clinical benefits have been limited. This could be due to tumor-derived immunosuppressive substances that are released into the tumor environment. Importantly, this release of immunosuppressive mediators could be enhanced via direct activation of the tumor cells through TLRs.

Moreover, the number of regulatory T (Treg) cells and DCs that secrete high levels of immunosuppressive cytokines are often increased in patients with lymphoma and MM.⁶⁸⁻⁷⁰ In MM, the monocyte-derived DCs generated by the patients are functionally defective; this was found to be due to cytokines released by MM cells.⁷¹ TLR ligands may amplify these effects and inhibit DC maturation. Although recent reports show that Treg-cell function can be inhibited by directly targeting TLR8,⁷² studies using other TLR ligands have observed enhanced Treg-cell induction and improved Treg-cell function.⁷³ In particular, CpG ODNs and LPS promote Treg-cell induction through IL-10 production by DCs.^{74,75}

Conversely, the efficacy of anthracycline-based therapy may be partly mediated by HMGB1 released from dying tumor cells. This process would permit optimal cross-presentation by DCs and thus

may provide an explanation for the faster relapse of patients with breast cancer carrying loss-of-function TLR4 mutations.

Taken together, these findings suggest that targeting TLRs in B-cell neoplasia can result in both positive and negative outcomes. Therefore, more refined strategies designed to selectively neutralize the tumor-promoting effects may represent a decisive step in the improvement of immunotherapy. In support of this strategic approach, neutralization of IL-10 secreted by DCs in response to TLR ligands has been shown to improve the efficacy of CpG ODNs in mouse models of cancers.^{75,76}

Conclusions

Elucidating mechanisms that lead to robust and long-lasting humoral immunity is critical for developing new vaccination strategies. The success of one of the most effective vaccines available, the yellow fever vaccine, is thought to be due to the combined triggering of several TLRs on DCs.⁷⁷ In addition, myeloid DCs or pDCs promote plasma cell differentiation upon stimulation with whole viruses or synthetic ligands for TLR7 and TLR9,³⁴ but it remains unclear whether vaccine efficacy could partially arise from direct B-cell activation. Many studies summarized in this review support direct B-cell activation because TLR triggering is mandatory for full activation of naive human B cells and strong amplification of T-dependent responses and because polyclonal stimulation of memory B cells by TLR ligands appears to be involved in maintaining the human memory B-cell pool. Therefore, selected TLR ligands are promising candidates for novel adjuvants that could improve the efficacy and duration of vaccine-induced immunity.

Although the humoral immune system is activated to protect organisms against infections, it can also give rise to different types of leukemic cells. The normal differentiation process involves multiple steps in which oncogenic events can occur. Fortunately, these events are rare and generally not stable over time because fatal mutations in the clone, elimination by the immune system, and DNA repair mechanisms efficiently prevent the development of malignancies. However, the capacity of TLR ligands to promote B-cell cycling and the secretion of cytokines with immunosuppressive capacity could favor the persistence of malignant clones. In this context, conserved TLR expression or acquisition of new TLR expression patterns could be critical for promoting leukemic ontogenesis. We therefore suggest a model (Figure 3) in which repeated polyclonal activation of leukemic B cells by microbial molecules during natural infection or inflammation is the initial step in the oncogenic process that lowers the threshold for outgrowth of malignant cell clones.

References

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev*. 2007;220:225-236.
- Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2005;204:27-42.
- Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2004;199:227-250.
- Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*. 2008;27:161-167.
- Homung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002;168:4531-4537.
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003;101:4500-4504.
- Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*. 2003;102:956-963.
- Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:823-835.
- Palmer P, Charley B, Rombaut B, Daeron M, Lebon P. Antibody-dependent induction of type I

Current knowledge of MM and B-CLL pathophysiology favors this hypothesis. In addition, concomitant B-cell deficiency predisposes patients with MM and B-CLL to infection. Recent epidemiologic studies have shown that several episodes of pneumonia prior to MM or B-CLL diagnosis increase the risk of developing MM.^{78,79} Although additional epidemiologic studies are necessary to validate these observations, it is striking that these malignancies are often newly diagnosed in the context of infections and that recurrent infections remain a major cause of morbidity in patients.

Due to the adverse effects of TLR ligands on neoplastic B cells, their therapeutic use needs to be addressed with care. This is also complicated because a broad heterogeneity of TLR responsiveness exists among B-cell neoplasias. Among B-CLL subtypes, opposite responses to TLR ligation have been described depending on V_H mutation status. Furthermore, only protumoral effects have been observed in vitro for ligands for TLR7 and TLR9 in MM cells. Therefore, TLR-based therapy should only be performed in carefully selected patients. Future clinical trials will have to account for cellular heterogeneity and evaluate possible predictors of in vivo response. Soon, the first results will be available from several early-stage clinical trials that have already examined B-CLLs using TLR agonists as a single agent⁸⁰; however, future protocols should include combined therapeutic approaches to prevent undesirable effects due to direct activation of tumor TLRs.

As TLRs are broadly expressed and display functional activity in normal and neoplastic B cells (Figure 2), we conclude that both antimicrobial vaccine design and immunotherapy in B-cell leukemia will benefit from studies that decipher TLR function in the human B-cell lineage.

Acknowledgments

We thank Dr Martine Amiot and Dr Thierry Defrance for their critical review of the manuscript.

This study was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (équipe labélisée 2008).

Authorship

Contribution: G.J. provided the concept and designed and wrote the review; D.C. and I.B.-D. contributed to the writing and some of the original work described in this review; and C.P.D. and R.B. contributed to the writing of the review.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Gaëtan Jégou, Inserm U892, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France; e-mail: gaetanjegou@yahoo.fr.

- interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II γ interferon receptor (CD32). *Virology*. 2000;278:86-94.
11. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*. 2007;220:251-269.
 12. Mansson A, Adner M, Hockerfelt U, Cardelli LO. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology*. 2006;118:539-548.
 13. Ganley-Leal LM, Liu X, Wetzel LM. Toll-like receptor 2-mediated human B cell differentiation. *Clin Immunol*. 2006;120:272-284.
 14. Zarembo KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 2002;168:554-561.
 15. Bekeredjian-Ding I, Wagner M, Homung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol*. 2005;174:4043-4050.
 16. Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, DeFrance T. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol*. 2007;178:7779-7786.
 17. Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS ONE*. 2007;2:e863.
 18. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13:816-825.
 19. Vanden Bush TJ, Bishop GA. TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation. *Eur J Immunol*. 2008;38:400-409.
 20. Divanovic S, Trompette A, Petitot LK, et al. Regulation of TLR4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105. *J Leukoc Biol*. 2007;82:265-271.
 21. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, et al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1490-1499.
 22. Spaner DE, Shi Y, White D, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2006;20:286-295.
 23. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007;21:110-120.
 24. Shi Y, White D, He L, Miller RL, Spaner DE. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. *Cancer Res*. 2007;67:1823-1831.
 25. Spaner DE, Miller RL, Mena J, Grossman L, Sorrenti V, Shi Y. Regression of lymphomatous skin deposits in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with the Toll-like receptor-7/8 agonist, Imiquimod. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:935-939.
 26. Jago G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006;20:1130-1137.
 27. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2006;20:1138-1144.
 28. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:2020-2028.
 29. Bekeredjian-Ding I, Inamura S, Glese T, et al. *Staphylococcus aureus* protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. *J Immunol*. 2007;178:2803-2812.
 30. Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J Exp Med*. 1997;186:931-940.
 31. Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Rodriguez B, Mohner RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naive B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol*. 2007;37:2205-2213.
 32. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:810-816.
 33. Jago G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 2003;19:225-234.
 34. Jago G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:124-139.
 35. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005;438:364-368.
 36. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*. 2006;314:1936-1938.
 37. Meyer-Bahlburg A, Khim S, Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J Exp Med*. 2007;204:3095-3101.
 38. Nemazee D, Gavin A, Hoebe K, Beutler B. Immunology: Toll-like receptors and antibody responses [letter]. *Nature*. 2006;441:E4.
 39. He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol*. 2004;173:4479-4491.
 40. Han JH, Akira S, Calame K, Beutler B, Selsing E, Imanishi-Kari T. Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity*. 2007;27:64-75.
 41. Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsog G. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*. 2007;178:3593-3601.
 42. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002;298:2199-2202.
 43. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105:1614-1621.
 44. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, et al. γ -globulin controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol*. 2007;8:419-429.
 45. Guay HM, Andreyeva TA, Garcea RL, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. MyD88 is required for the formation of long-term humoral immunity to virus infection. *J Immunol*. 2007;178:5124-5131.
 46. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000;28:558-568.
 47. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*. 2001;69:81-88.
 48. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000;95:999-1006.
 49. Goodman MG, Wormsley SB, Spinosa JC, Piro LD. Loxoribine induces chronic lymphocytic leukemia B cells to traverse the cell cycle. *Blood*. 1994;84:3457-3464.
 50. Tomic J, White D, Shi Y, et al. Sensitization of IL-2 signaling through TLR-7 enhances B lymphoma cell immunogenicity. *J Immunol*. 2006;176:3830-3839.
 51. Jahrsdorfer B, Jox R, Muhlenhoff L, et al. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol*. 2002;72:83-92.
 52. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol*. 2005;77:378-387.
 53. Reid GS, She K, Terrett L, Food MR, Trudeau JD, Schultz KR. CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts alloreactive T cells toward a Th1 response. *Blood*. 2005;105:3641-3647.
 54. Corthals SL, Wynne K, She K, et al. Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;132:452-458.
 55. Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, et al. Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;75:26-32.
 56. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:263-274.
 57. Liu J, Hamrouni A, Wolowicz D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110:296-304.
 58. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:665-674.
 59. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 2006;107:2409-2414.
 60. Pellacani A, Tosi P, Zinzani PL, et al. Cytotoxic combination of loxoribine with fludarabine and mafosfamide on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1999;33:147-153.
 61. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*. 2004;76:514-519.
 62. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050-1059.
 63. Tian J, Avalos AM, Mao SY, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. 2007;8:487-496.
 64. Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Helne H, Alexander C. TLR2—promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*. 2008;213:205-224.
 65. Sanderson RD, Yang Y, Suva LJ, Kelly T. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase—partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol*. 2004;23:341-352.
 66. Gotte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*. 2006;66:10233-10237.
 67. Charoonpatrong K, Shah R, Robling AG, et al. HMGB1 expression and release by bone cells. *J Cell Physiol*. 2006;207:480-490.

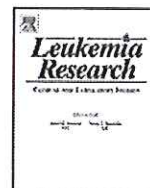
68. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:3639-3646.
69. Han S, Wang B, Cotter MJ, et al. Overcoming immune tolerance against multiple myeloma with lentiviral calnexin-engineered dendritic cells. *Mol Ther*. 2008;16:269-279.
70. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood*. 2006;108:2655-2661.
71. Wang S, Hong S, Yang J, et al. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK/ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. *Blood*. 2006;108:4071-4077.
72. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*. 2005;309:1380-1384.
73. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003;197:403-411.
74. den Haan JM, Kraal G, Bevan MJ. Cutting edge: lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory CD4+ T cells that suppress the CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2007;178:5429-5433.
75. Jamicki AG, Conroy H, Brereton C, et al. Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol*. 2008;180:3797-3806.
76. Dercamp C, Chemin K, Caux C, Trinchieri G, Vicari AP. Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. *Cancer Res*. 2005;65:8479-8486.
77. Querec T, Bennouna S, Alkan S, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006;203:413-424.
78. Landgren O, Rapkin JS, Mellemkjaer L, Gridley G, Goldin LR, Engels EA. Respiratory tract infections in the pathway to multiple myeloma: a population-based study in Scandinavia. *Haematologica*. 2006;91:1697-1700.
79. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109:2198-2201.
80. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21:53-60.



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Invited review

Toll-like receptors: Expression and involvement in Multiple Myeloma

David Chiron^{a,b,*}, Gaetan Jeco^{c,d}, Catherine Pellat-Deuceunynck^{a,b}

^a INSERM, U892, Nantes, France

^b Université de Nantes, UFR Médecine et Techniques Médicales, Nantes, France

^c INSERM, U866, Dijon, France

^d Université de Bourgogne, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2010

Received in revised form 31 May 2010

Accepted 1 June 2010

Available online xxx

Keywords:

Toll-like receptors

Myeloma

Infections

Immune system

Heterogeneity

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) cells express and respond to a broad range of TLRs. Accumulating evidences suggest that TLRs act as double-edged sword in MM biology. Indeed, TLR9 or TLR3 ligands could enhance immunity against MM cells or directly induce cell apoptosis, whereas various TLR agonists could induce MM survival, proliferation, and immune escape. This review is focused on the heterogeneous expression and function of TLRs in MM and on the potential implication of TLR ligands of infectious or endogenous origin in MM emergence, resistance, or progression.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	00
2. TLRs, ligands, and signaling.....	00
3. Heterogeneous expression of TLRs in MM cells.....	00
4. Dual responses of MM cells upon TLR stimulation.....	00
4.1. Anti-tumoral effect of TLRs in MM: TLR9 and TLR3 agonists.....	00
4.1.1. TLR9 agonists and the immune system.....	00
4.1.2. TLR3 agonists and tumoral apoptosis.....	00
4.2. Pro-tumoral effect of TLRs in MM.....	00
4.2.1. TLRs are potent IL6 inducers in MM.....	00
4.2.2. TLRs induce immune evasion through B7H1.....	00
4.2.3. TLRs trigger NF-κB activation in MM.....	00
5. Concluding remarks.....	00
Conflict of interest.....	00
Acknowledgements.....	00
References.....	00

1. Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a fatal hematological plasma cell (PC) malignancy defined as a heterogeneous disease in terms of

phenotype, genotype, growth factors, and drug responses. MM always emerges from Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) which is characterized by the presence of monoclonal IgG or IgA in the serum, medullary plasmacytosis and frequently diagnosed in old-aged population [1,2]. Besides the common clinical features described in MM [3], patients are highly susceptible to recurrent and persistent bacterial, fungal and viral infections. Indeed, the clonal expansion of malignant plasma cells is associated with a decreased production of normal Ig. This defect of humoral immunity makes patients vulnerable to infections which are the major cause of death next to general organ failure. Furthermore, recent epidemiological studies have shown that there are an

* Corresponding author at: Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, Centre de Recherches en Cancérologie Nantes Angers, 8, Quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01, France. Tel.: +33 02 28 08 02 97; fax: +33 02 28 08 03 29.

E-mail address: david.chiron@etu.univ-nantes.fr (D. Chiron).

increased number of pneumonia episodes in the 5 years preceding the development of MM [4,5]. Pathogens associated with MM include both Gram(+) bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, staphylococcal infections) and Gram(–) bacilli (*Pseudomonas*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*) as well as invasive fungal infections. These invading pathogens share highly conserved microbial structure termed as PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) that are sensed by the organism through Pattern-Recognition Receptors (PRRs), in which Toll-Like Receptors (TLRs) are the best characterized.

Given the important role of TLRs in the activation of the immune system, TLR agonists are currently developed to enhance anti-infectious and anti-tumoral responses [6], however many recent studies have shown that solid and hematological cancer cells also express these receptors. Besides, several reports indicate that cancer cells can divert TLR signaling to their own advantage to proliferate, survive, or evade the immune system [7,8]. Among them, B-cell neoplasms, such as lymphocytic leukemia, lymphomas, or MM express and respond to a wide range of TLRs [9]. Given the context of chronic infections or the potential therapeutic use of synthetic TLR ligands in hematological malignancy, several studies have focused on TLR expression and responses in MM. In this review, we will discuss about the heterogeneous expression of TLRs in MM primary cells and cell lines. Furthermore, we will review the consequences of TLRs activation recently highlighted in MM.

2. TLRs, ligands, and signaling

TLRs are type-1 transmembrane proteins bearing a cytoplasmic Toll/IL-1R homology domain (TIR). Currently, 10 TLRs have been identified in humans and each TLR has specificity for different PAMPs: TLR1/2 and TLR2/6 heterodimers recognize components of Gram(+) bacteria, such as lipoproteins or lipoteichoic acid, and fungal zymosan; TLR3 is triggered by double-stranded RNA (dsRNA) produced by many viruses during replication; TLR4 is activated by lipopolysaccharide (LPS) from Gram(–) bacteria; TLR5 is triggered by bacterial flagellin; TLR7 and TLR8 are triggered by single-stranded RNA (ssRNA) from viruses; and TLR9 is activated by unmethylated CpG DNA present in both bacterial and viral genomes. However, the ligand for TLR10 remains unidentified. Given the high susceptibility of MM patients to recurrent infections, MM plasma cells could be chronically triggered by such inflammatory components.

In addition to PAMPs, an increasing number of endogenous molecules, named Dangers Associated Molecular Patterns (DAMPs), are found to be TLR agonists. Bone-marrow microenvironment that is crucial to promote MM migration, growth, survival, and drug resistance, forms a niche composed by marrow stromal cells, osteoclasts, osteoblasts, endothelial cells and extracellular matrix [1]. Among these microenvironment components, fibronectin, soluble hyaluronan, heat shock proteins, or endogenous RNA, mainly released in the context of tissue damage, extracellular matrix breakdown, cellular stress, or cell death are described as DAMPs [10]. Furthermore, HMGB1, which is described as a TLR4 agonist and as a co-ligand for TLR3, 7 and 9, is found to be released by bone cells such as osteoblasts and osteoclasts [11,12]. Finally, various studies suggest that soluble heparan sulfate proteoglycans could bind to TLR4 [13]. MM highly express CD138 that belongs to the heparan sulfate family. Soluble CD138, whose level correlates with poor prognosis [14], could thus bind to TLR4 and might act as an autocrine factor.

Various signalling pathways might occur after TLR activation. When activated, TLR adaptors, MYD88 or TRIF, couple to downstream transduction proteins such as IRAK1, IRAK4, TRAF3 and TRAF6. This could lead to phosphorylation of MAPK Erk, Jnk and p38,

activation of PKB/Akt pathway and to activation of transcription factors such as Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) or Interferon Regulatory Factors (IRFs). Finally TLR mediated signaling could lead to the secretion of inflammatory cytokines and IFN α [15]. The key TLR signaling proteins appear to be expressed in the majority of HMCLs studied. Indeed, MYD88, TRIF, and TRAF6 were found to be expressed in all HMCLs evaluated (personal data, $n=8$) [16,17]. TRAF3 expression showed more heterogeneity, and a recent publication demonstrated that this protein is frequently mutated or deleted in HMCLs and primary MM cells (17% and 12.3%, respectively) [18]. Although its role as tumor suppressor is now well defined, more studies are required to define its precise functions in MM TLR signaling. Thus, MM cells have retained the expression of TLRs associated signaling proteins, and appear to be well equipped to respond to PAMPs and DAMPs potentially present in the tumor microenvironment.

3. Heterogeneous expression of TLRs in MM cells

MM primary cells and Human Myeloma Cell Lines (HMCLs) express both a broad range of TLRs [19,20]. Although TLR expression in human B-cells is now well defined [21], expression in human PC remains unclear. Indeed, normal bone marrow plasma cells (BM PCs) were reported to mainly lack TLR expression although tonsillar or peripheral PC expressed all TLRs [19,22]. Reevaluation of TLR expression on BM PCs by other approaches than RT-PCR (such as flow cytometry) might help to define whether TLR expression of MM cells is or not related to malignancy. Finally, evaluation of TLR on plasma cells detected during infection contexts such as reactive plasmacytosis or on plasma cells from MGUS could also highlight the origin of MM TLR expression.

HMCLs frequently express *TLR1*, 7, and 9 (96%, 68%, and 64%, respectively). *TLR3* and 4 are expressed in nearly half of the HMCLs, whereas *TLR2* and 8 are only detected in 28% and 24% of the cell lines, respectively (personal data, $n=25$).

RT-PCR analyses have been done on primary myeloma cells but only on a small number of patients [20]. To assess TLR expression on a large cohort of MM patients, we analyzed TLR expression on an available database gathering gene expression profiles of 414 patients at diagnosis [50]. *TLR1* is expressed in almost all samples whereas *TLR2* expression appears to be weak to absent. *TLR8* is expressed in nearly 50% of the samples although its expression was relatively low when compared with that of monocytes (*TLR8* median level was 20 times higher than that of myeloma cells).

TLR3, 4 and 7 are expressed in around 30% of patient samples and *TLR9* by 79%. Interestingly, TLR expression is highly heterogeneous when addressing the molecular classification of patients defined by Zhan et al. (mainly based on chromosomal abnormalities) [23]. Hyperdiploid patients (who have the more favorable outcome) more frequently express *TLR3* and *TLR7* but underexpress *TLR4* and *TLR9* (Table 1). In contrast, MS patient (who have the most adverse outcome) underexpress *TLR7* but overexpress *TLR9*. MAF patients (who have also a poor outcome) underexpress *TLR7* and *TLR9* but overexpressed *TLR4* (Fig. 1). Interestingly, MAF and *TLR4* expressions are correlated suggesting a direct link between them (Spearman test $p<0.05$). Moreover, this *TLR4*/MAF association is kept in HMCLs since all HMCLs with *C-MAF* (or *MAFB*) deregulation express *TLR4* ($n=7$) whereas 33% of the HMCLs without MAF deregulation only do express it ($n=18$) ($p=0.005217$). MAF is a transcription factor but no link between MAF and *TLR4* gene expression has been reported and reciprocally there is no data supporting a MAF expression following *TLR4* triggering. Anyway, the relationship between MAF and *TLR4* expression should be addressed to understand the involvement of this receptor, if any, in the pathogenesis of MAF group of patients.

Table 1
Heterogeneous expression of TLR3, 4, 7 and 9 on primary myeloma cells.

	TLR3			TLR4			TLR7			TLR9		
	pos % (n)	p value	Median (range)	pos % (n)	p value	Median (range)	pos % (n)	p value	Median (range)	pos % (n)	p value	Median (range)
PR (47)	15 (7)	NS	223 (137–1654)	17 (8)	NS	203 (77–742)	47 (22)	NS	923 (212–4590)	79 (37)	NS	706 (241–2454)
LB (58)	12 (7)	0.014	273 (137–556)	12 (7)	0.002	98 (53–339)	14 (8)	0.007	433 (102–1493)	74 (43)	NS	724 (302–1902)
MS (68)	32 (22)	NS	259 (76–751)	42 (29)	0.024	161 (61–837)	15 (10)	NS	194 (121–1320)	87 (59)	NS	1228 (360–5422)
HY (116)	38 (44)	<0.001	311 (84–1566)	16 (19)	<0.001	103 (53–888)	46 (54)	<0.001	613 (68–6167)	77 (90)	NS	587 (228–2071)
CD (88)	65 (24)	NS	233 (107–904)	31 (27)	NS	172 (44–419)	39 (35)	NS	375 (99–7584)	86 (76)	NS	797 (319–5050)
MF (37)	30 (11)	NS	465 (168–834)	97 (36)	<0.001	1447 (195–9266)	32 (12)	NS	232 (92–2436)	65 (24)	0.031	665 (299–1632)
ALL (414)	26 (108)		296 (76–1654)	30 (126)		201 (44–9266)	34 (141)		450 (68–7584)	79 (329)		744 (228–5422)

Expression of TLR3, 4, 7 and 9 on MM primary cells with respect to molecular classification as defined by Zhan et al. [23]: PR: proliferation, LB: low bone disease, MS: MMSET, HY: hyperdiploid, CD: cyclinD, MF: MAF. Only samples with positive call were considered [50]. Median and range represent TLR mRNA expression in relative units. p values are determined using CH12 test for positive samples expression and using Wilcoxon test for expression level. Significant over-expressions and under-expressions are represented in bold and italic respectively. NS = non-significant. Data can be accessed on the website <http://amazonia.transcriptome.eu/>.

4. Dual responses of MM cells upon TLR stimulation

4.1. Anti-tumoral effect of TLRs in MM: TLR9 and TLR3 agonists

Bacterial extracts, such as BCG (TLR2 and TLR4 ligand), streptococcus preparation (TLR4 ligand), imiquimod (TLR7 ligand), or CpG-ODNs (TLR9 ligand) have been used for many years as adjuvants for cancer therapy [6,24,25]. Although TLR ligand-mediated antitumor activities might be owing to numerous mechanisms, one of the best characterized is the capacity to stimulate the adaptive immune effectors such as DCs or B-cells [26,27].

As in other B-cell neoplasms, numerous defects of the immune system have been described in MM. Patients with MM display numerous abnormalities of immune system key actors, such as T-cells, T-regulatory cells, NK cells, B-cells, or DCs [28]. On these bases, immunostimulation strategy against MM might be considered.

4.1.1. TLR9 agonists and the immune system

A recent report on MM demonstrated that the resting bone marrow plasmacytoid DCs from patients (MM-pDCs) exhibit reduced ability to induce T-cell proliferation, but trigger growth, survival and drug resistance of MM cells, mainly via NF- κ B activation [29]. Interestingly, activation of MM-pDCs with CpG-ODNs was found to restore their ability to secrete IFN- α , trigger T-cell proliferation, and inhibit their capacity to trigger MM cell growth.

In addition, CpG-ODNs were found to up-regulate the expression of molecules involved in leukocyte recruitment, such as CD54, and to up-regulate the expression of co-stimulatory (CD80, CD86) and antigen-presenting molecules (MHC class II) on the TLR9 positive HMCL RPMI8226 [30]. Furthermore, this HMCL enhanced allogenic T-cells proliferation following treatment with CpG-ODNs. These data suggest that stimulation of MM cells by CpG-ODNs can render them more visible for innate and acquired immunities. Thus, TLR9 ligands could be efficient to enhance the immune response in myeloma tumor environment. However, most of the synthetic CpG-ODNs used *in vitro* and *in vivo* display chemical modifications to replace the native phosphodiester backbone by a phosphorothioate (PS) backbone. These modifications increase both CpG-ODNs affinity for TLR9 and their *in vivo* half-life from a few minutes to about 2 days [31]. However they also have TLR9-independent side effects [32,33]. Indeed, synthetic PS-modified CpG-ODNs inhibit the killing of various TRAIL-R2 (DR5) sensitive tumor cells (MM, breast carcinoma and colon carcinoma) through a TLR9-independent, but PS-dependent binding to TRAIL-R2 ligands. Moreover, this inhibition reduces the TRAIL-mediated cytotoxicity of NK cells, and could therefore interfere with the clinical efficiency of TLR9 agonist based adjuvant. Encapsulation of CpG-ODNs, which avoids unspecific binding with unexpected consequences, could be used, especially in clinical trials.

4.1.2. TLR3 agonists and tumoral apoptosis

In addition to immunostimulatory capabilities, several TLRs display direct proapoptotic properties [34]. Among them, TLR3, which signals only through a MYD88-independent/TRIF-dependent pathway, is the best characterized. TLR3 expression has been highlighted in numerous cancer cell types and TLR3 agonists (poly(IC)) directly induces apoptosis in several solid cancer cells [35,36]. As TLR3 triggering also activates the immune system [37], this dual anti-tumoral characteristic turns it into a particularly interesting therapeutic target.

TLR3 is expressed in nearly 50% of the HMCLs and 25% of primary myeloma cells. We found that poly(IC) induces growth inhibition or apoptosis in 3 of 6 TLR3 positive HMCLs studied. In accordance with the results highlighted in HMCLs [19,38], a decrease of primary myeloma cell viability was observed in 2 out of 4 patient samples

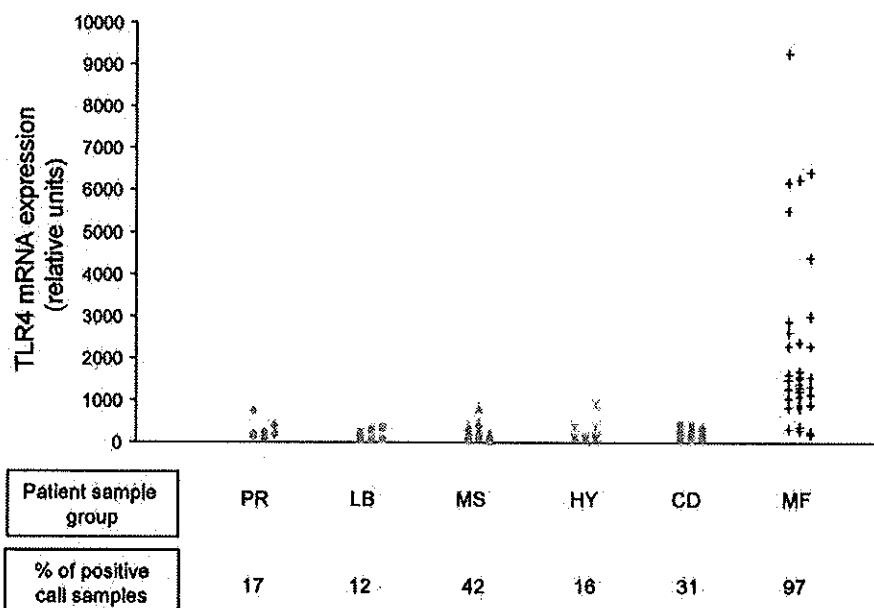


Fig. 1. Expression of TLR4 on MM primary cells. Expression of TLR4 on MM primary cells was addressed with respect to molecular classification as defined by Zhan et al. [23]: PR: proliferation, LB: low bone disease, MS: MMSET, HY: hyperdiploid, CD: cyclinD, MF: MAF. Data can be accessed on the website <http://amazonia.transcriptome.eu/>. Only samples with positive call were considered [50].

after *in vitro* poly(IC) stimulation (personal data). TLR3-dependent apoptosis process in MM was found to be linked to the production of an autocrine IFN α loop, controlled by early p38 MAPK activation. Involvement of p38 MAPK activation in IFN α secretion induced by TLRs seemed to be a conserved pathway in at least MM and pDCs [39]. Moreover, poly(IC)-induced apoptosis in MM is dependent on caspases 3, 8, and 9. Implication of caspases in poly(IC)/IFN α -dependent apoptosis is in accordance with the results described in melanoma or breast cancer cells [34,36].

Thus, poly(IC) has a direct anti-tumoral activity in 50% of TLR3 positive HMCLs studied with a switching function of IFN α . IFN α has been used since twenty years in myeloma patient treatment and meta-analysis done on nearly 4000 patients have highlighted a significant but small survival benefit for patients treated with IFN α [40]. The heterogeneous TLR3 response associated with small benefit of IFN α could in part explain the mixed result of the unique poly(IC)-based clinical trial in MM [41].

4.2. Pro-tumoral effect of TLRs in MM

4.2.1. TLRs are potent IL6 inducers in MM

Recent studies have shown that leukemic cells could divert the TLR machinery to their own benefit. Two reports have highlighted the pro-tumoral effects of TLR2, 4, 5, 6, 7, and 9 in myeloma cells [19,20]. In both studies, TLR ligands induced autocrine IL6 loop in myeloma cells, and thus, could substitute paracrine IL6. Indeed, IL6 is the major proliferation and survival factor of myeloma cells [42,43], and the rate of circulating IL6 was found to increase during MM progression and seemed to correlate with MM evolution [44]. IL6 is essentially produced in the microenvironment (stromal cells, osteoclasts and osteoblasts). Thus, TLR triggering could permit additional IL6 autocrine loop and could contribute to MM physiopathology by enhancing proliferation, survival, drug resistance, and immune evasion of MM cells. On the other hand, autocrine IL6 is not the only mechanism of myeloma growth induced by TLR ligand, because TLR2 and 4 agonists induced an IL6-independent increase in the proliferation of RPMI-8226 [19].

It can be noted that TLR4 positive MM cells that belong to the MAF subgroup increase their growth in response to LPS. TLR4 ago-

nists, either PAMPs resulting from chronic infections or DAMPs resulting from matrix degradation, could thus have an implication in the emergence or growth of this myeloma subgroup.

4.2.2. TLRs induce immune evasion through B7H1

NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) can be inhibited by some surface molecules expressed on tumor cells. Among them, B7H1, a ligand for PD-1, is mainly induced by IFN γ in normal cells and can lead to T-cell inactivation [45]. B7H1 is overexpressed in myeloma cells, unlike plasma cells from MGUS or healthy donor, making it a potential candidate to explain T-cell defect in MM. Interestingly, IFN γ as well as TLR agonists (PGN, LPS, and CpG-ODNs) significantly enhance B7H1 expression in myeloma cells through the same MYD88/TRAF6-dependent pathway [17]. MYD88 activation further leads to MAPKs ERK 1/2 phosphorylation, resulting in B7H1 over-expression. This new implication of MYD88 is in accordance with a recent work, suggesting that the association between MYD88 and IFN γ R1 is required for IFN γ signaling [46]. Importantly, IFN γ and LPS have the same capability to inhibit CTL generation directed against RPMI-8226 and MM patient samples [17]. Thus, TLR signaling could induce MM self-protection mechanisms leading to immune evasion.

4.2.3. TLRs trigger NF- κ B activation in MM

Myeloma cells have constitutive NF- κ B activity and are highly sensitive to NF- κ B inhibitors that induce growth arrest and apoptosis [47]. This NF- κ B constitutive activation in MM is owing to both the activating mutations of NIK, NF- κ B1, NF- κ B2, TRAF2, TRAF3, or CYLD in 15–20% of the myeloma cells [18], and autocrine or paracrine NF- κ B-inducing cytokines, such as TNF α , Baff or RANKL [47,48]. TLRs are potent NF- κ B inducers, because through the MyD88 or TRIF-dependent pathway, PAMPs activate the NF- κ B canonical pathway [15]. Indeed, CpG-ODNs are observed to promote TNF α secretion, high NF- κ B activation, and cellular proliferation of the TLR9 positive HMCL RPMI-8226 [30].

Furthermore, in parallel to IFN α production, we observed that poly(IC) induced NF- κ B activation in all TLR3-responsive HMCLs. Although a strong and early activation was observed after poly(IC)

stimulation, NF- κ B could not overcome apoptosis induced by IFN α . However, one of the five TLR3 positive HMCLs studied responded to TLR3 exclusively by NF- κ B stimulation without any IFN α production resulting in an NF- κ B-dependent increase in proliferation [38]. Thus, although TLR3 and 9 displayed anti-tumoral activity by enhancing the host immunity or inducing apoptosis in few myeloma cells, they might also induce strong NF- κ B activation. TLR3 and 9 might be activated *in vivo* by dsRNA from viruses, mRNA released from necrotic cells, and hypomethylated DNA, suggesting that infectious or endogenous agonists could participate in the NF- κ B-dependent proliferation of myeloma cells in the bone marrow.

5. Concluding remarks

MM cells express a broad and heterogeneous range of TLRs, which is associated with *in vitro* heterogeneous responses. TLRs are often characterized as “double-edged sword” in cancer. Indeed, although several reports have highlighted the capacity of TLR to enhance host immunity against tumor, cancer cells could also divert this pathway to their own advantage [7,49]. As discussed in this review, this concept could be extended to MM.

NF- κ B activation, IFN α , and proinflammatory cytokine secretions are classical events observed in normal cells after TLR triggering. We have reported that MM cells have largely conserved these pathways. However, NF- κ B and IL6 are among the most important growth and survival factors in MM cells. Thus, growth and survival signals through TLRs seem to be largely predominant in MM cells. We can hypothesize that TLRs could be involved in a vicious circle between MM cells and infections. Indeed, the increased sensibility of MM patients to infections, mainly owing to normal Ig decrease, could in turn be involved in MM progression through TLRs triggering.

On the other hand, TLR9 agonists have the capability to enhance the immune system by activating MM-pDCs or upregulating several immunostimulatory molecules in one MM cell line *in vitro*. However, the latter effect must be taken with caution as MM cells, similarly to terminally differentiated plasma cells, have lost their professional antigen-presenting B-cell properties. Therefore their immune stimulation capacities are limited, despite TLR stimulations.

We can wonder whether a TLR-based therapy could be valuable in MM. We believe that uncoupling the pro-tumoral effect of TLR ligands from their adjuvants effects on the immune system is required to make possible a TLR-based therapy in MM. This goal could be achieved by a simultaneous neutralization of MM growth factors or survival pathways.

In spite of few epidemiological studies [4,5], the involvement of TLR in the natural history of MM remains largely unknown. In this context, the group of patients carrying MAF deregulation and strong TLR4 expression on their MM cells represents a unique opportunity to investigate the expression and response of TLR4 over the course of MM from MGUS up to HMCLs (Fig. 1). To this aim, *in vivo* animal models, especially the murine 5T myeloma model, could be valuable to investigate whether TLR agonists are involved in the initiation, progression or relapse of MM cells. Furthermore, it will be of interest to evaluate the stimulatory potential of endogenous ligands, such as HMGB1 or heparan sulfate (soluble CD138).

In conclusion, experimental evidences suggest that TLRs have multiple roles in MM and could represent new targets in MM therapy.

Conflict of interest

All authors have no conflict of interest to report.

Acknowledgements

This study was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (2008).

Contributions. D.C. provided the conception and the design of the review; G.J. and C.P.D. revised it critically for important intellectual content.

References

- [1] Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324–39.
- [2] Kyle RA, Kumar S. The significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2009;94:1641–4.
- [3] Dispenzieri A, Kyle RA. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2005;18:553–68.
- [4] Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood* 2008;111:3388–94.
- [5] Landgren O, Rapkin JS, Mellemkjaer L, et al. Respiratory tract infections in the pathway to multiple myeloma: a population-based study in Scandinavia. *Haematologica* 2006;91:1697–700.
- [6] Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 2008;27:161–7.
- [7] Huang B, Zhao J, Unkeless JC, et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 2008;27:218–24.
- [8] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:57–63.
- [9] Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, et al. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 2008;112:2205–13.
- [10] Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in Immunology* 2002;23:509–12.
- [11] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* 2007;13:1050–9.
- [12] Yanai H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 2009;462:99–103.
- [13] Johnson GB, et al. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950) 2002;168:5233–9.
- [14] Lovell R, Dunn JA, Gulnaz B, et al. Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *British Journal of Haematology* 2005;130:542–8.
- [15] Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine* 2007;13:460–9.
- [16] Chen H, Li M, Campbell RA, et al. Interference with nuclear factor kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase signaling by TRAF6 small interfering RNA inhibits myeloma cell proliferation and enhances apoptosis. *Oncogene* 2006;25:6520–7.
- [17] Liu J, Hamrouni A, Wolowicz D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007;110:296–304.
- [18] Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12:131–44.
- [19] Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006;20:1138–44.
- [20] Jengo G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 2006;20:130–137.
- [21] Bekeredjian-Ding I, Jengo G. Toll-like receptors—sentinels in the B-cell response. *Immunobiology* 2009;128:311–23.
- [22] Dorner M, Brandt S, Tinguely M, et al. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. *Immunology* 2009;128:573–9.
- [23] Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2020–8.
- [24] Okamoto M, Furuchi S, Nishioka Y, et al. Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Research* 2004;64:5461–70.
- [25] Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infection and Immunity* 2000;68:6883–90.
- [26] Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological Reviews* 2004;199:227–50.
- [27] Bekeredjian-Ding I, Doster A, Schiller M, et al. TLR9-activating DNA up-regulates ZAP70 via sustained PKB induction in IgM+ B cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950) 2008;181:8267–77.

- [28] Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2007;138:563–79.
- [29] Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 2009;16:309–23.
- [30] Assaf A, Esteves H, Curnow SJ, Browning MJ. A threshold level of TLR9 mRNA predicts cellular responsiveness to CpG-ODN in haematological and non-haematological tumour cell lines. *Cellular Immunology* 2009;259:90–9.
- [31] Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117:1184–94.
- [32] Chiron D, Pellat-Deceunynck C, Maillason M, et al. Phosphorothioate-modified TLR9 ligands protect cancer cells against TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2009;183:4371–7.
- [33] Guvakova MA, Yakubov LA, Vlodavsky I, et al. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270:2620–7.
- [34] Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *European Journal of Immunology* 2007;37:3311–8.
- [35] Paone A, Starace D, Galli R, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis* 2008;29:1334–42.
- [36] Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, et al. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clinical Cancer Research* 2007;13:4565–74.
- [37] Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:10116–21.
- [38] Chiron D, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, et al. TLR3 ligand induces NF- κ B activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN- α production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2009;182:4471–8.
- [39] Osawa Y, Iho S, Takauji R, et al. Collaborative action of NF- κ B and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN- α and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2006;177:4841–52.
- [40] The Myeloma Trialists' Collaborative Group. Interferon as therapy for multiple myeloma: an individual patient data overview of 24 randomized trials and 4012 patients. *British Journal of Haematology* 2001;113:1020–34.
- [41] Durie BG, Levy HB, Voakes J, et al. Poly(I,C)-LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma. *Journal of Biological Response Modifiers* 1985;4:518–24.
- [42] Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988;332:83–5.
- [43] Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989;73:517–26.
- [44] Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *The Journal of Clinical Investigation* 1989;84:2008–11.
- [45] Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 2002;8:793–800.
- [46] Sun D, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon- γ -induced cytokine and chemokine mRNA. *Nature Immunology* 2006;7(4):375–81.
- [47] Romagnoli M, Desplanques G, Maïga S, et al. Canonical nuclear factor κ B pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clinical Cancer Research* 2007;13:6010–8.
- [48] Tai Y, Li X, Breitkreutz I, et al. Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Research* 2006;66:6675–82.
- [49] Killeen SD, et al. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *British Journal of Cancer* 2006;95:247–52.
- [50] Le Carrouer T, Assou S, Tondeur S, Lhermitte L, Lamb N, Reme T, Pantescio V, Hamamah S, Klein B, De Vos J. Amazonia! an online resource to Google and visualize public human whole genome expression data. *The Open Bioinformatics Journal* 2010;4:5–10.

- IMPLICATION DES TOLL-LIKE RECEPTORS DANS LA BIOLOGIE DU MYÉLOME MULTIPLE
- ÉTUDE DE LA CLONOGENICITÉ SPONTANÉE DE CELLULES DES MYÉLOME MULTIPLE

Le Myélome Multiple (MM) est une tumeur plasmocytaire maligne. Les défauts immunitaires associés à cette pathologie rendent les patients particulièrement vulnérables aux infections. Ces pathogènes sont détectés par les cellules du système immunitaire via les Toll-Like Receptors (TLRs). Cependant, de nombreuses tumeurs solides ou, hématologiques telles que le MM, expriment aussi une large gamme de TLRs et répondent de façon hétérogène à leur activation. Dans ce projet nous avons étudié l'implication potentielle de ces récepteurs dans la biologie du MM. Nous avons montré que, malgré un rôle antitumoral particulier du TLR3, les TLRs ont principalement un rôle protumoral dans le MM.

Dans un second projet, nous avons étudié la capacité d'autorenouvellement des cellules de MM en milieu semi-solide sans sérum ni cytokine exogène. Nous avons observé que cette capacité est associée à la présence de mutations oncogéniques de Ras ainsi qu'à la surexpression de JAG2, un ligand de la voie Notch. Nous démontrons que l'extinction de ce ligand réduit considérablement les propriétés clonogéniques et tumorigéniques des cellules myélomateuses. Enfin, nous montrons le rôle essentiel de boucles autocrines, impliquant les récepteurs IGF-1R et C-KIT, dans la clonogénicité.

Malgré des avancées thérapeutiques majeures, les rechutes restent constantes dans le MM. L'étude des processus impliqués dans son oncogénèse reste donc une nécessité. Ces deux projets ont permis de révéler plusieurs mécanismes fondamentaux pouvant être impliqués dans l'émergence, la résistance aux traitements ou encore la progression du MM.

Mots-clefs : Myélome Multiple, Toll-Like Receptors, Clonogénicité, JAG2, IGF-1, C-KIT

- TOLL-LIKE RECEPTORS INVOLVEMENT IN MULTIPLE MYELOMA
- CLONOGENIC ABILITY OF MYELOMA CELLS

Multiple Myeloma (MM) is a plasma cell malignancy. The immune defects associated with this disease makes patients vulnerable to infections. These pathogens are detected by immune cells via Toll-Like Receptors (TLRs). However, many solid tumors and hematological malignancies, such as MM, also express a wide range of TLRs and respond heterogeneously to their activation. In this project we have studied the potential involvement of these receptors in MM biology. We have shown that, despite a specific antitumoral property of TLR3, TLRs are mainly protumoral in MM.

In a second project, we have studied the self-renewal ability of MM cells in semi-solid medium without serum or exogenous cytokine. We observed that this capacity is associated with the presence of oncogenic Ras mutations and with overexpression of JAG2, a ligand of the Notch pathway. We show that the extinction of this ligand significantly reduces the clonogenic and tumorigenic properties of myeloma cells. Finally, we highlight in this mechanism the essential role of autocrine loops involving IGF-1R and C-KIT.

Despite major therapeutic advances, relapses are constants in MM. The study of the processes involved in its oncogenesis is still required. These two projects have revealed several fundamental mechanisms that might be involved in MM emergence, resistance, or progression.

Keywords: Multiple Myeloma, Toll-Like Receptors, Clonogenicity, JAG2, IGF-1R, C-KIT