



HAL
open science

Analyse moléculaire du myélome: vers de nouvelles perspectives thérapeutiques

John de Vos

► **To cite this version:**

John de Vos. Analyse moléculaire du myélome: vers de nouvelles perspectives thérapeutiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier I, 2001. Français. NNT: . tel-00006190

HAL Id: tel-00006190

<https://theses.hal.science/tel-00006190>

Submitted on 3 Jun 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2001

N° L L L L L L L L L L L L L L L L

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE MEDECINE

Analyse moléculaire du myélome: vers de nouvelles perspectives thérapeutiques

Thèse présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Ecole doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Formation doctorale : Biologie – Santé

Discipline : Hématologie

PAR

John DE VOS

Soutenue publiquement le 19 décembre 2001

JURY :

M. Jean-Marie BLANCHARD, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Président
Mme Anne FERNANDEZ, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Examineur
M. Thierry FACON, Professeur, Université Lille II	Rapporteur
M. Jean-François MOREAU, Professeur, Université Bordeaux II	Rapporteur
M. Bernard KLEIN, Professeur, Université Montpellier I	Directeur

Je remercie les professeurs Thierry FACON, Bernard KLEIN et Jean-François MOREAU, et les docteurs Jean-Marie BLANCHARD et Anne FERNANDEZ d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le professeur Bernard KLEIN d'avoir accepté de diriger ce travail, et je le remercie de sa confiance.

Je remercie Michel JOURDAN et Karin TARTE pour leur précieuse participation à la réalisation de ce travail, je remercie tous les membres présents et passés de l'Unité INSERM U475 et de l'UTC qui m'ont toujours fourni leur aide quand je l'ai sollicitée, et je remercie le service d'Hématologie et d'Oncologie Médicale, en particulier le docteur Eric LEGOUFFE et le professeur Jean-François ROSSI, pour leur contribution à ces travaux.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	analyse en composante principale
Ag	antigène
BSAP	B-cell-specific activator protein (Pax5)
CDK	cyclin dependent kinase
CNTF	ciliary neurotrophic Ffactor
CT-1	cardiotrophin-1
DC	cellule dendritique
EBF	early B-cell factor
FDC	cellule dendritique folliculaire
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
FISH	fluorescent in situ hybridization
GC	centre germinal
HEV	veinules endothéliales hautes
HLA	complexe majeur d'histocompatibilité humain
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
Ig	immunoglobuline
IGF-1	insulin growth factor
IL-	interleukine
IRF	interferon response factor
JAK	janus kinase

LIF	leukemia inhibitory factor
L.O.H.	loss of heterozygosity
LT	lymphotoxine
MAPK	mitogen activated protein kinase
MGUS	monoclonal gammopathy of unknown signification
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
MM	myélome multiple
MMP	metalloproteinase
OPG	ostéoprotégérine
OSM	oncostatine M
RAG 1 et 2	recombination-activating gene
Rb	retinoblastoma protein
RP	plasmocytose réactionnelle
SDF-1	stromal cell-derived factor-1(CXCL12)
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducer and activator of transcription
SVF	sérum de veau foetal
TCR	T cell receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRANCE	tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	western blot

RESUME

Analyse moléculaire du myélome : vers de nouvelles perspectives thérapeutiques

Le myélome multiple (MM) est une néoplasie hématopoïétique chimiosensible. Si une chimiothérapie intensive associée à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques permet de doubler la médiane de survie, la rechute reste cependant inéluctable et ce cancer est incurable à l'heure actuelle.

Plusieurs exemples ont montré récemment qu'une connaissance précise de la physiopathologie d'un cancer pouvait conduire à l'élaboration de traitements spécifiques. Ces nouveaux traitements anti-cancéreux ciblant un sous-groupe de tumeurs caractérisées par une altération moléculaire commune sont une voie de développement thérapeutique prometteuse.

Mon travail de thèse a consisté à étudier la biologie du MM dans une perspective de ciblage pharmacologique de la cellule plasmocytaire maligne. L'utilisation d'anticorps anti-gp130 agonistes a permis de montrer que l'activation de la signalisation par la chaîne gp130 du récepteur de l'interleukine-6 (IL-6) est indispensable à la survie et la prolifération des cellules de MM. En corollaire, l'interruption de cette voie de signalisation par la tyrphostin AG490, inhibiteur de la kinase JAK2, bloque la croissance et induit une apoptose dans les plasmocytes tumoraux. Des membranes comportant les ADNc de 268 gènes nous ont permis de rechercher l'expression des gènes d'autres cytokines et récepteurs de cytokines pouvant jouer un rôle dans la physiopathologie du MM. Nous avons mis en évidence dans des lignées de MM une boucle autocrine, cruciale pour la survie du plasmocyte tumoral, qui implique la cytokine HB-EGF et son récepteur ErbB1. Le développement d'un modèle de génération in vitro de plasmocytes normaux purifiés a permis ensuite la comparaison du transcriptome de plasmocytes tumoraux avec leur contrepartie normale par des puces à ADN analysant l'expression de 6800 gènes différents. De nombreux gènes sont différentiellement exprimés entre ces deux populations cellulaires et certains gènes surexprimés dans les cellules myélomateuses codent pour des protéines qui sont des cibles thérapeutiques potentielles, telles que ABL, CBS, RAR α ou RhoC.

La possibilité de comparer pour chaque malade le transcriptome des cellules tumorales par rapport à leur équivalent normal va permettre de progresser rapidement dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'émergence du clone tumoral et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette approche pourrait aboutir sur la mise en place d'un traitement « à la carte » du MM basé sur l'examen du transcriptome du clone tumoral de chaque patient.

T A B L E D E S M A T I E R E S

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>4</u>
<u>RESUME</u>	<u>6</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>7</u>
<u>INTRODUCTION</u>	<u>10</u>
1. LE MYÉLOME MULTIPLE	11
I. LE PLASMOCYTE	11
A) De la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B mature naïf	11
_(1) Les différents stades de développement	11
_(2) Cytokines, chemokines et contact avec le stroma	13
_(3) Facteurs de transcription	14
B) Vers le lymphocyte B mémoire et le plasmocyte	15
_(1) Rencontre avec l'Ag et activation du BCR	15
	7

_(2) Rencontre avec le lymphocyte CD4	19
_(3) Famille TNF/TNF-R et activation du lymphocyte B	21
_(4) Réponse anticorps primaire	23
_(5) Voyage au centre germinatif	23
_(6) Le lymphocyte B mémoire	28
_(7) Le plasmocyte	28
_(8) Chemokines	30
_(9) Facteurs de transcription	33
II. L'INTERLEUKINE-6	36
A) Une cytokine pléiotropique	36
B) Voie de transduction de l'IL-6	38
_(1) Le récepteur de l'IL-6	38
_(2) Les JAKs	39
_(3) Les STATs	39
_(4) La voie Ras/MAPK	42
_(5) Autres kinases	43
_(6) Rétrocontrôle négatif : SSIs, PIAS3	44
III. LE PLASMOCYTE TUMORAL	45
A) Modèles murins	45
B) Le myélome multiple	47
_(1) Origine du MM	47
_(2) Phénotype des cellules myélomateuses	49
_(3) Rôle des cytokines et du microenvironnement médullaire	51
_(4) Cytogénétique	80
_(5) Autres altérations moléculaires	89
_(6) Traitement du myélome	92
_(7) Conclusion	93
2. cDNA ARRAYS	96
IV. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE cDNA ARRAY	96
A) Macroarray	96
B) cDNA microarray	98
C) Oligonucleotide microarray	99
D) Techniques apparentées	105
_(1) SAGE	105
_(2) Protein chip	105
_(3) Cell chip	107
V. LES APPLICATIONS DES cDNA ARRAYS	108

A) Séquençage et analyse du polymorphisme de l'ADN génomique	108
B) Exploration du transcriptome	109
C) Transcriptome des cellules cancéreuses	111
D) Transcriptome et traitement anticancéreux	114
E) Mesure du nombre de copie d'ADN	118
F) Détermination des gènes et de leur fonction	119
VI. TECHNIQUES D'ANALYSE DES DONNEES	121
A) Hierarchical clustering	121
B) SOM	122
C) Analyse en composante principale	124
D) Autres techniques	126
E) Test statistiques conventionnels	126
F) Autres analyses : vers les réseaux génétiques et protéiques	127
G) Les filtres : s'affranchir du bruit de fond	128
H) Mise en commun des données: bases de données publiques	128
VII. CONCLUSION	129
RESULTATS ET DISCUSSION	131
<hr/>	
1. L'IL-6 ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA GP130 DANS LE MM : ARTICLES 2, 3 ET 4	132
I. ANTICORPS ANTI-GP130 AGONISTES COMME OUTIL POUR ETUDIER LE SIGNAL DELIVRE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'IL-6 AUX CELLULES PLASMOCYTAIRES MALIGNES	132
II. LA VOIE DE TRANSDUCTION ACTIVEE PAR LA GP130	133
III. LE BLOCAGE PAR LA TYRPHOSTIN AG490 DE LA VOIE DE TRANSDUCTION DE LA GP130	134
IV. DISCUSSION	135
2. LE CYCLE CELLULAIRE DANS LE MM	174
3. LES MOLÉCULES DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LE MM : ARTICLE 5	177
4. MOLÉCULES DE COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DANS LE MM : ARTICLES 6 ET 7	191
5. ANALYSE DU MYÉLOME PAR PUCES À ADN : COMPARAISON AVEC DES PLASMOCYTES NORMAUX : ARTICLES 8 ET 9	238
CONCLUSION	316
<hr/>	
REFERENCES	322

INTRODUCTION

1. Le myélome multiple

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par l'émergence et l'accumulation dans la moelle osseuse d'un clone de cellules plasmocytaires malignes. Seront donc successivement détaillés la biologie du plasmocyte normal, puis la biologie du plasmocyte tumoral ainsi que les événements connus qui sont à l'origine de cette transformation néoplasique.

I. Le plasmocyte

Le plasmocyte est la cellule terminale de la différenciation lymphocytaire B. Il est, avec les cellules B mémoires, l'aboutissement du processus de sélection et de maturation des cellules B spécifiques d'un antigène (Ag). Les lymphocytes B naïfs sont générés dans la moelle osseuse, migrent dans le sang périphérique, et peuvent, au contact de l'Ag, se différencier dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte. Le plasmocyte migre ensuite vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocyte mature synthétisant en grande quantité une protéine extrêmement spécialisée : l'immunoglobuline (Ig).

A) De la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B mature naïf

(1) Les différents stades de développement

Le lymphocyte B se différencie dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique commune myéloïde et lymphoïde $CD34^+$ qui donne naissance à un progéniteur lymphoïde commun B, T et NK. Le premier stade identifié du lymphocyte B est le lymphocyte pro-B au cours duquel commence le réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (d'abord D_H-J_H puis $V_H-D_HJ_H$) (LeBien, 2000). Le phénotype de cette cellule est $CD34^+/CD19^+$. Le deuxième stade est celui de lymphocyte pré-B défini par l'apparition à la membrane d'un pré-BCR qui comprend les deux chaînes lourdes μ réarrangées sur les gènes

$V_H D_H J_H$ et deux pseudo chaînes légères (ψ CL) formées de l'association d'un domaine $\lambda 5$ /IGLL1 et d'un domaine $V_{\text{pr}\beta}$ (Melchers et al., 1993). Cette Ig membranaire s'associe à deux hétérodimères $Ig\alpha/Ig\beta$ impliqués dans la transduction du signal. Par ailleurs le lymphocyte pré-B perd l'expression du CD34 et de la TDT. Il existe au stade de la transition pro-B/pré-B un point de contrôle essentiel, au cours duquel plus de 80% des B sont éliminés par apoptose. Le pré-BCR donne en effet un signal de survie au lymphocyte pré-B, protégeant ainsi de l'apoptose uniquement les lymphocytes B qui ont réarrangé leurs chaînes lourdes. Ceci a été formellement démontré dans un modèle murin où l'inactivation du gène $\lambda 5$ entraîne un blocage de la différenciation lymphoïde B entre les stades pro-B et pré-B (Kitamura et al., 1992). Chez l'homme, un cas d'agammaglobulinémie congénitale a été identifié comme la conséquence d'une absence de pré-BCR à cause de mutations sur les deux allèles $\lambda 5$ /IGLL1 (Minegishi et al., 1998). Les chaînes légères vont être réarrangées à ce stade (V_L-J_L). D'une manière générale, le réarrangement de la chaîne kappa précède celui de la chaîne lambda : le lymphocyte pré-B réarrange d'abord le gène de la chaîne légère kappa, et en l'absence d'un réarrangement fonctionnel, procède au réarrangement du locus de la chaîne lambda (LeBien, 2000).

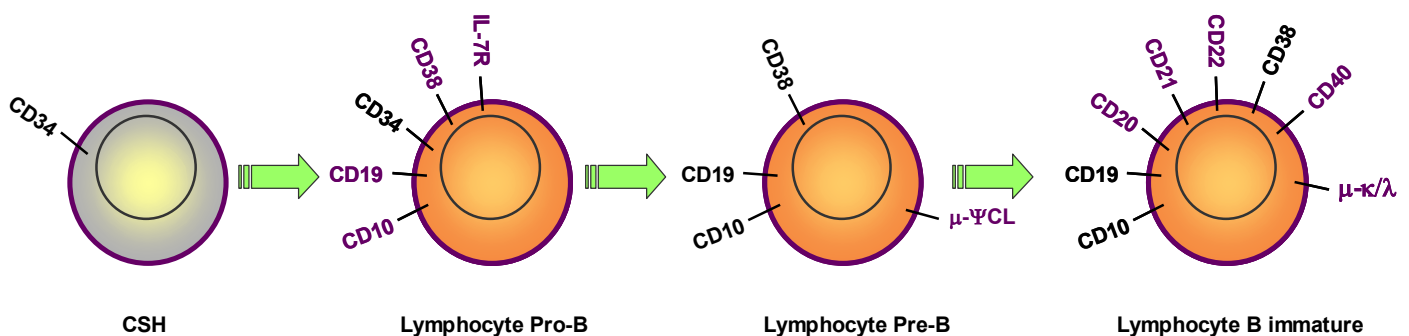


Figure 1: de la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B immature.

Ces évènements aboutissent au lymphocyte B immature qui exprime un BCR sous forme d'une IgM membranaire complète (chaîne lourde et légère) associée de manière non covalente aux chaînes $Ig\alpha/Ig\beta$ (voir Figure 3). Finalement, le lymphocyte B mature naïf est caractérisé par l'apparition d'une IgD avec coexpression membranaire des deux isotypes IgD et IgM par splicing alternatif du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines. Le lymphocyte B naïf quitte la

moelle osseuse pour gagner par voie sanguine les organes lymphoïdes secondaires où se déroule la deuxième grande étape de la différenciation B.

(2) Cytokines, chemokines et contact avec le stroma

Des cytokines et une interaction avec les cellules stromales médullaires sont essentielles pour le développement des précurseurs des lymphocytes B mais sont encore peu caractérisées (LeBien, 2000). Chez la souris, l'interleukine-7 (IL-7) joue un rôle essentiel. Les animaux dont le gène de l'IL-7 a été invalidé, ou bien le gène de l'IL-7R, ou de la sous unité γ_c des récepteurs de l'IL-2, 4, 7, 9 et 15, ou de la tyrosine kinase JAK3 qui est indispensable à la transduction du signal de l'IL-7, présentent tous un blocage quasi complet du développement B en même temps qu'une absence de lymphocytes T. En revanche, chez l'homme, l'IL-7 joue un rôle non essentiel dans la différenciation B puisque des patients qui présentent une mutation des gènes de la chaîne γ_c ont un développement B normal, voire même une augmentation du nombre des lymphocytes B dans le sang périphérique, alors que les lymphocytes T sont absents (Noguchi et al., 1993). Les molécules qui transduisent les signaux essentiels au développement B chez l'homme pourraient être FLT3-L, Hevin, ainsi que des molécules non encore identifiées, en particulier des cytokines qui se lient aux héparanes sulfates (LeBien, 2000). Par ailleurs les récepteurs de la famille Notch et leurs ligands pourraient également intervenir dans le développement B mais leur place reste à préciser (Milner et Bigas, 1999; Bertrand et al., 2000). Finalement il faut citer le rôle important de la chemokine SDF-1/CXCL12 (stromal cell-derived factor-1) et de son récepteur CXCR4. Les souris SDF-1/CXCL12^{-/-} ou CXCR4^{-/-} ont une lymphopoïèse B et une myélopoïèse très compromise (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998). CXCR4 est exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques et sur les lymphocytes B tout au long de leur différenciation, en particulier aux stades pro-B et pré-B (Aiuti et al., 1999). Le ligand de CXCR4, SDF-1/CXCL12 est produit par le stroma médullaire et est impliqué dans la localisation des lymphocytes pro-B, pré-B et B dans la moelle osseuse (Ma et al., 1999). Les lymphocytes B passent dans le sang périphérique où ils circulent avec une demi-vie de trois jours. Le contact avec l'Ag va entraîner leur relocalisation dans les organes lymphoïdes secondaires (cf. p 30). Il n'est pas encore précisé si le rôle de CXCR4 est seulement celui de diriger les précurseurs du lymphocyte B dans le site le plus propice à leur prolifération et à leur survie

(« homing »), ou si ce récepteur délivre également un signal de survie et/ou de prolifération essentiel. En effet, SDF-1/CXCL12, encore appelé pre-B-cell growth-stimulating factor, a été cloné initialement par l'équipe de Tadimitsu Kishimoto en raison de sa capacité à stimuler une lignée pre-B (Nagasawa et al., 1994). SDF-1/CXCL12 est capable, en synergie avec l'IL-7, de stimuler la prolifération in vitro de progéniteurs pré-B B220+ isolés de la moelle osseuse.

(3) Facteurs de transcription

Le facteur de transcription PU.1 de la famille Ets est nécessaire pour la différenciation lymphoïde dès les premières étapes, et son invalidation chez la souris bloque la différenciation lymphoïde et myéloïde (Scott et al., 1994; O'Riordan et Grosschedl, 2000). De même, Ikaros est un facteur de transcription essentiel au stade le plus précoce de la différenciation lymphoïde puisque son invalidation chez la souris se traduit par une absence des lymphocytes B, T et NK (Georgopoulos et al., 1994). D'autres facteurs de transcription sont requis spécifiquement pour la lymphopoïèse B : EBF (early B-cell factor), E2A et Pax5/BSAP (B-cell-specific activator protein). Ces facteurs de transcription ont des séquences cibles dans les promoteurs de nombreux gènes lymphocytaires B dont ils régulent ainsi l'expression.

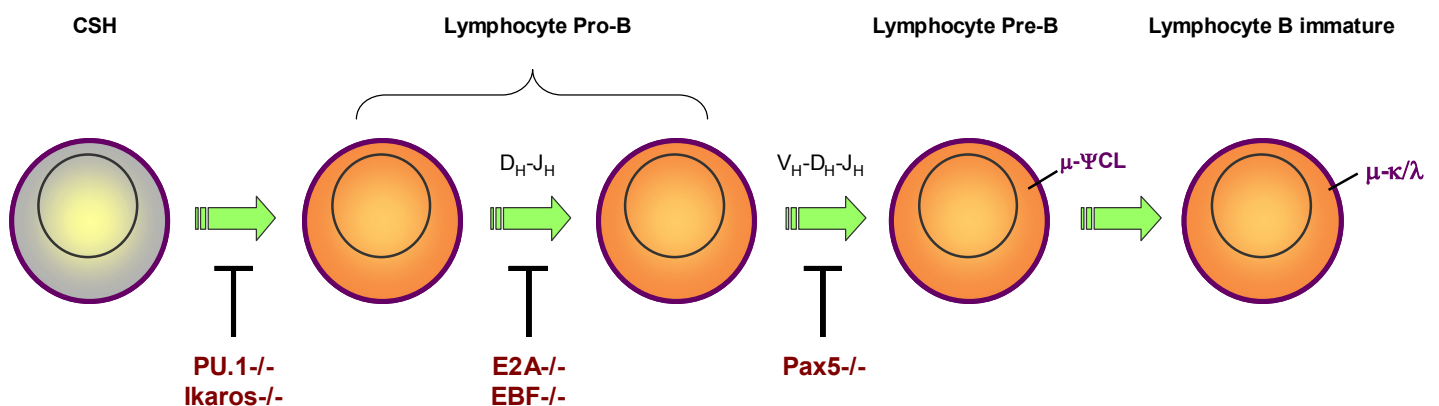


Figure 2 : facteurs transcriptionnels jouant un rôle essentiel au cours de la lymphopoïèse B.

Les expériences de knock-out ont montré que l'absence des protéines E12 et E47 codées par le gène E2A ou de la protéine EBF bloque la différenciation B à un stade très précoce, avant le réarrangement des gènes de chaîne lourde d'Ig, tandis que l'absence de Pax 5 bloque la transition pro-B/pré-B. E2A ainsi que PU.1 induisent l'expression de EBF qui reste exprimé à tous les stades de la

différenciation B sauf dans le plasmocyte (Hagman et al., 1993; Sigvardsson et al., 1997). EBF, avec le concours de E2A induit des gènes spécifiquement B comme $\lambda 5$ /IGLL1 mais aussi les gènes RAG 1 et 2 (recombination-activating gene) nécessaires au réarrangement des gènes des immunoglobulines, et également le gène Pax5. Pax5 à son tour va participer à l'induction de gènes B tel CD19, mais les expériences de knock-out ont révélé un rôle important de Pax5 comme répresseur transcriptionnel. En effet, les lymphocytes pro-B des souris Pax5^{-/-} (le développement lymphoïde B est bloqué dans les souris Pax5^{-/-}, juste avant le stade pré-B) ont la propriété surprenante de se différencier in vitro, ou in vivo après transplantation chez la souris SCID, en une multitude de types cellulaires différents : macrophages, ostéoclastes, cellules dendritiques (DC), neutrophiles, lymphocytes NK ou T (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999). Ces résultats suggèrent qu'un des rôles majeurs de BSAP est d'engager la différenciation B en réprimant des gènes non B. On peut donc dresser le tableau suivant : dans une cellule multipotente, l'expression de E2A puis de EBF initie la différenciation lymphoïde B et va induire l'expression de Pax5 qui va bloquer toute autre possibilité de différenciation.

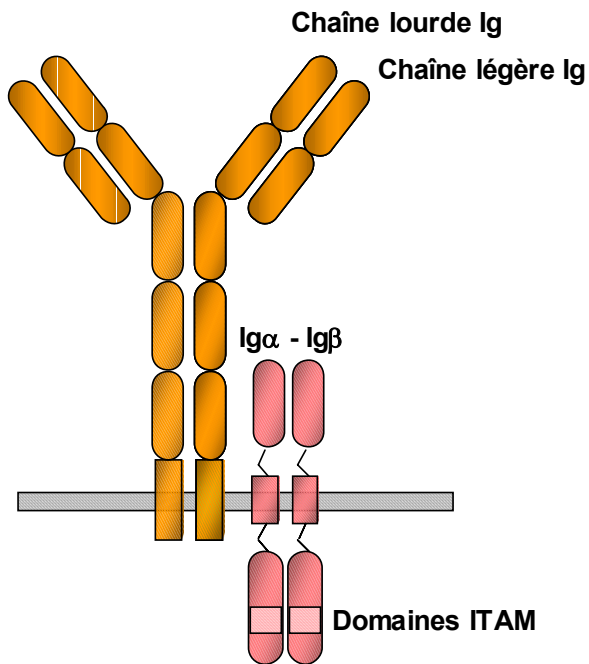
B) Vers le lymphocyte B mémoire et le plasmocyte

Au stade de lymphocyte mature naïf, un grand nombre de lymphocytes B exprimant des Ig membranaires de faible affinité ont été générés. Cependant, la production d'anticorps neutralisant de forte affinité requiert une maturation de la réponse immunitaire qui va prendre place dans les organes lymphoïdes secondaires. Pour continuer sa différenciation, le lymphocyte B naïf doit rencontrer un Ag dont il est spécifique et interagir avec un lymphocyte T spécifique de ce même Ag. Le lymphocyte B activé migre alors dans le follicule lymphoïde pour aboutir à la synthèse d'un anticorps de forte affinité puis la différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte.

(1) Rencontre avec l'Ag et activation du BCR

Le contact du lymphocyte B naïf avec l'antigène via le BCR commence à activer le lymphocyte ce qui entraîne l'internalisation de l'Ag. L'Ag est alors dégradé et traité pour être présenté par des molécules du CMH de classe II. Cette activation ne sera cependant complète qu'après contact avec le lymphocyte T.

L'activation du lymphocyte B est déclenchée par l'agrégation des IgM de surface au contact d'un antigène multivalent.



Cette agrégation déclenche une cascade de transduction complexe qui a lieu au niveau de régions de la membrane cellulaire appelés GEM (glycolipid-enriched microdomains ou lipid rafts). Les GEM sont des zones de la membrane cytoplasmique qui sont enrichies en cholestérol, en sphingolipides, en protéines GPI (glycosinositolphosphate) et en molécules de signalisation telles que les protéines tyrosine kinases de la famille src. Le premier événement de signalisation, induit par la relocalisation du BCR sur les GEM, est la phosphorylation sur tyrosine des domaines intracytoplasmiques ITAM (Immunoreceptor tyrosine activation motif) des molécules $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b) du BCR par Lyn, une protéine tyrosine kinase de la famille src (Matsuuchi et Gold, 2001). Sur ces tyrosines phosphorylées vient alors se fixer par

Figure 3: le BCR est composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères d'immunoglobuline, ainsi que d'un hétérodimère $Ig\alpha$ - $Ig\beta$.

son domaine SH2 la protéine tyrosine kinase Syk, qui à son tour va phosphoryler la protéine adaptatrice BLNK (B-cell linker protein)/BASH (B-cell adaptor containing an SH2 domain)/SLP-65 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa). BLNK phosphorylée recrute alors Btk (Bruton's tyrosine kinase) qui est une protéine tyrosine kinase de la famille Tec, ainsi que la phospholipase C gamma 2 ($PLC\gamma 2$), Vav-2, Grb2 et HKP-1 (Leo et Schraven, 2001). Btk et Syk vont de concert activer la $PLC\gamma 2$ par phosphorylation. La $PLC\gamma 2$ hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG). L'IP3 provoque la libération du calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne la translocation dans le noyau et donc l'activation du facteur de transcription NF-AT (nuclear factor of activated T cells). L'activité transcriptionnelle de NF-AT est de plus augmentée par l'action de Vav-2 (Doody et al., 2000). Le DAG active par ailleurs la voie de la PKC. La $PLC\gamma 2$ et Btk qui ont donc été rapprochées

par la protéine adaptatrice BLNK, vont activer ensemble les facteurs de transcription de la famille NF- κ B (Tan et al., 2001; Petro et Khan, 2001). Les membres de cette famille de transcription incluent p50/ NF- κ B1, p52/ NF- κ B2, RelA, c-Rel et RelB, qui ont tous la capacité de former des homo- ou hétérodimères. Dans les cellules

quiescentes, les dimères NF- κ B sont séquestrés dans le compartiment cytoplasmique par une liaison avec des membres de la famille I κ B, tel que I κ B α . Après activation du lymphocyte B par agrégation du BCR, I κ B α est phosphorylé par le complexe kinasique IKK (I κ B kinase), ce qui provoque son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome [Petro, 2000 #2365]. NF- κ B se dirige alors vers le noyau où il exerce ses fonctions transcriptionnelles. Il est maintenant bien établi que les membres de la famille NF- κ B jouent un rôle important dans l'activation lymphocytaire B (Bendall et al., 1999; Franzoso et al., 1998). Ils sont important à la

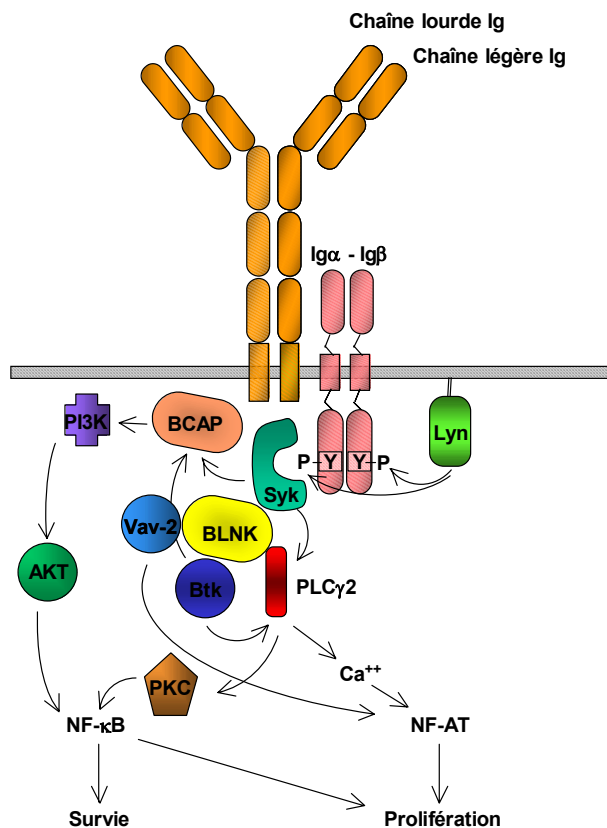


Figure 4 : les voies de signalisation intracytoplasmiques mises en jeu par l'activation du BCR (morceaux choisis).

fois pour la prolifération et la prévention de l'apoptose par l'induction de la protéine antiapoptotique Bcl-X_L (Lee et al., 1999; Tan et al., 2001; Marshall et al., 2000). Une autre

voie de signalisation induite par l'activation du BCR est la voie de la PI3K. Les protéines tyrosine kinases Syk et Btk vont phosphoryler une protéine adaptatrice récemment clonée, BCAP, et celle-ci va fixer sur ses tyrosines phosphorylées la sous unité p85 de la PI3K qui va ainsi s'activer (Okada et al., 2000). A son tour, la PI3K va débiter une cascade de signalisation dont un des aspects important est l'activation de PKB/AKT. PKB/AKT va jouer un rôle à la fois sur la prolifération et la survie du lymphocyte B en bloquant par phosphorylation les protéines pro-apoptotiques Bad et caspase 9, en activant NF- κ B, et en potentialisant les effets du calcium intracellulaire sur l'activation de NF-AT (Marshall et al., 2000). L'activation du BCR active également la voie ubiquitaire des MAPK. La place de cette voie de signalisation a été

explorée par des expériences introduisant une forme constitutivement active de ras dans les lymphocytes de souris au fond génétique RAG^{-/-} (Shaw et al., 1999). Ces souris, dépourvues de BCR car dépourvues d'activité recombinase et donc d'immunoglobulines, présentent un développement lymphoïde B jusqu'au stade de lymphocyte B mature, ce qui montre qu'une activation forcée de la voie des MAPK peut donner un signal équivalent à celui délivré par le BCR. Enfin il faut citer l'activation des petites GTPases dont Rho, qui est activée par l'intermédiaire de Vav-2 et entraîne un remaniement du cytosquelette (Leo et Schraven, 2001).

La fonction *in vivo* de nombreux protagonistes de cette cascade de signalisation a été démontrée par des expériences de knock-out chez la souris. L'invalidation des gènes de Syk, de Btk, de BNLK, de la sous unité p85 de la PI3K, de PL γ C2 ou de PKC β /II donne des altérations sévères du développement lymphocytaire B (Kurosaki, 2000). Citons chez l'homme l'agammaglobulinémie liée à l'X, qui est secondaire à des mutations du gène Btk (Xq22) et qui se traduit par une hypogammaglobulinémie profonde touchant toutes les classes d'immunoglobulines (LeBien, 2000). La maturation de la différenciation lymphocytaire B est bloquée entre le stade pro-B et pré-B, reflétant la nécessité de Btk à la fois pour la signalisation du pré-BCR et du BCR. Ces patients ont dans le sang périphérique moins de 1% des lymphocytes B d'un sujet normal et présentent des infections bactériennes répétées. Avant l'utilisation en thérapeutique d'immunoglobulines intraveineuses, la maladie était constamment mortelle (Lévy, 1995).

L'activation du BCR va être modulée par des co-récepteurs. Les molécules transmembranaires CD22, CD72 et RF γ IIb possèdent au niveau de leur domaine intracytoplasmique des motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine inhibition motif). Après phosphorylation, ces ITIMs recrutent des phosphatases intracytoplasmiques qui vont freiner le signal délivré par le BCR en déphosphorylant les nombreuses protéines phosphorylées sur tyrosine au cours de l'activation lymphocytaire B. CD22 et CD72 recrutent SHP-1 tandis que RF γ IIb recrute SHIP. Les ligands de ces co-récepteurs du BCR sont les résidus d'acide sialique présents notamment sur CD45RO ou les IgM pour CD22, les IgG pour le RF γ IIb, et CD100 pour CD72. CD100 est une sémaphorine présente sur les lymphocytes T. Un contact avec un lymphocyte T va entraîner la fixation de CD100 sur CD72, ce qui provoque la déphosphorylation des domaines ITIM de CD72, donc la dissociation de SHP-1 et la levée de l'inhibition du

BCR (Kumanogoh et al., 2000). Une autre molécule inhibitrice du BCR, de localisation cytoplasmique, est Cbl. C'est une protéine adaptatrice dont la fonction inhibitrice pourrait passer par une inhibition de l'activité kinase de Syk, la séquestration de raf, un des éléments de la cascade des MAPK, ou encore en une compétition avec la PL γ C2 pour la liaison avec BNLK (Leo et Schraven, 2001).

Il existe également des co-récepteurs du BCR qui ont une fonction activatrice. Citons le complexe CD19/CD81/CD21 : CD21 est un récepteur au complément tandis que CD19, qui peut fixer les IgM et les héparanes sulfates, est impliqué dans la transduction du signal, en particulier en augmentant l'activité d'Akt et en activant Vav.

La conséquence fonctionnelle la plus évidente de l'existence de ces co-récepteurs est une stimulation majorée du BCR si l'Ag est rencontré en conjonction avec une activation de la voie du complément (Dempsey et al., 1996), tandis qu'au contraire l'activation du BCR par un Ag couplé à un anticorps sera inhibée par le récepteur à la partie Fc de l'anticorps. L'intégration par le lymphocyte B naïf de cette information supplémentaire concernant l'Ag permet au système immunitaire une économie de taille puisque les complexes Ag-Ac s'accumulent à un stade de la réponse immune où il n'est plus utile d'activer des lymphocytes supplémentaires pour produire plus d'anticorps (DeFranco, 1996).

(2) Rencontre avec le lymphocyte CD4

Le contact du lymphocyte B naïf, préactivé par une stimulation du BCR, avec un lymphocyte CD4 spécifique du même antigène est nécessaire pour une réponse immunitaire humorale efficace. Bien que les cytokines et les chemokines aient une place importante dans la maturation de la réponse anticorps, un contact physique entre le lymphocyte B et T est indispensable. Cette obligation permet un meilleur contrôle de la réponse immunitaire humorale puisque l'élimination des lymphocytes autoréactifs T semble plus complète que celle des lymphocytes autoréactifs B (Bishop et Hostager, 2001).

Le lymphocyte T naïf va être activé par les cellules dendritiques interdigitantes (IDC). Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules spécialisées dans la capture de l'Ag et son apprêtement, et l'activation des lymphocytes. La capture de l'Ag dans les tissus est effectuée par filtrage dans des sites potentiels d'infection dans les tissus et près des sinus des tissus lymphoïdes secondaires où les cellules

dendritiques internalisent les micro-organismes. Alertées par la réponse immunitaire naturelle (non spécifique) en réaction à une infection – *via* les interférons, le $TNF\alpha$, le complément ou les lipopolysaccharides bactériens – les DC migrent dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires et deviennent des IDC. Les IDC vont apprêter l'Ag et le présenter aux cellules T CD4 dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II. La reconnaissance de l'Ag présenté par l'IDC par le TCR du lymphocyte CD4 entraîne l'activation du lymphocyte qui va alors exprimer la molécule CD40L et les cytokines capables d'activer pleinement le lymphocyte B naïf. Des travaux récents montrent que l'IDC est elle-même activée par le contact avec le lymphocyte CD4, en particulier *via* le couple CD40/CD40L, et va favoriser la prolifération et la différenciation du lymphocyte B par la sécrétion d'IL-12 (Dubois et al., 1998; Dubois et al., 1997). Un flux constant de cellules T quittent le compartiment sanguin des ganglions et des plaques de Peyer et transitent par la zone T en passant à travers les veinules endothéliales hautes (HEV), ce qui permet à un très grand nombre de lymphocytes T de surveiller les antigènes capturés sur les sites infectieux de l'organisme et présentés par les IDC. L'activation altère le trafic de ces rares lymphocytes CD4 et B spécifiques de l'Ag et les immobilise dans la zone T.

L'activation du lymphocyte B par contact avec le lymphocyte CD4 est médiée par plusieurs couples ligand/récepteur. Le premier par ordre chronologique à être mis en jeu est la reconnaissance par le MHC de classe II de l'antigène présenté par le TCR du lymphocyte CD4. L'interaction du MHC de classe II avec le TCR va participer à la prolifération et à la différenciation du lymphocyte B (Scholl et Geha, 1994). La signalisation du MHC de classe II semble faire intervenir les corécepteurs du BCR CD19 et CD22 et la relocalisation du MHC de classe II sur les GEM qui sont le lieu de la signalisation du BCR (Bobbitt et Justement, 2000; Huby et al., 1999). Il y a également des molécules d'adhésion comme CD54 (ICAM-1) et CD11a-CD18 (LFA-1) qui induisent une adhésion homotypique ou hétérotypique (Bishop et Hostager, 2001). Ainsi que nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la molécule inhibitrice CD72 est neutralisée par l'interaction avec la sémaphorine CD100 exprimée par le lymphocyte CD4 (Kumanogoh et al., 2000).

Mais la partie la plus importante du signal que délivre le lymphocyte CD4 au lymphocyte B est apportée par des molécules de la famille TNF, en premier chef par les interactions CD40L-CD40.

(3) Famille TNF/TNF-R et activation du lymphocyte B

Le TNF (tumor necrosis factor) et la lymphotoxine (LT) ont été clonés il y a trente ans. Ces deux molécules sont les chefs de file d'un groupe de protéines qui comporte aujourd'hui une vingtaine de ligands et autant de récepteurs, et qui constitue la superfamille du TNF et du TNFR. Cette vaste famille a fait l'objet d'une revue récente de la littérature (Locksley et al., 2001). Mais l'inventaire des membres de cette superfamille n'est pas terminée : en septembre 2001 vient d'être cloné un récepteur, BAFF-R, qui joue un rôle essentiel dans le développement lymphocytaire B (cf. infra).

La molécule CD40/TNFRSF5 est la molécule co-stimulatrice majeure des lymphocytes B et est présente constitutivement sur les lymphocytes B. Son ligand, la molécule CD40L/CD154/TNFSF5, est induit de façon rapide et transitoire à la surface des lymphocytes CD4 activés par les cellules dendritiques. Le signal CD40/CD40L joue un rôle essentiel à toutes les étapes de la différenciation lymphocytaire B secondaire: prolifération, mutations somatiques, blocage de l'apoptose dans les centrocytes de forte affinité, commutation isotypique et différenciation en lymphocytes B mémoires (Banchereau et al., 1994). Cette fonction centrale a été montrée in vivo par l'observation que les enfants portant des mutations du CD40L développent un syndrome d'hyper IgM avec accumulation d'IgM et absence des autres classes d'Ig, absence de centre germinatif et incapacité à monter une réponse humorale efficace (DiSanto et al., 1993). L'analyse des voies de signalisation que déclenche le CD40 reste en revanche mal comprise (Bishop et Hostager, 2001). Il est acquis cependant que plusieurs molécules adaptatrices, membres de la famille des TRAF (TNF-R-associated factors), se lient à la partie carboxy-terminale, intracytoplasmique, de CD40 : TRAF1, 2, 3, 5 et 6. En aval des TRAF vont être activés des facteurs de transcription de la famille NF- κ B, les voies SAPK (stress-activated protein kinase) JNK et p38, et la voie PI3K/AKT (Bishop et Hostager, 2001; Andjelic et al., 2000). Plusieurs molécules anti-apoptotiques sont induites par NF- κ B et expliquent les effets induit par le CD40 sur la survie des lymphocytes B activés, notamment A1, A20 et cFLIP (Zong et al., 1999; Sarma et al., 1995; Kreuz et al., 2001). Par ailleurs la stimulation de CD40 active plusieurs kinases (JAK3, Lyn, Syk, PI3K), la PLC γ 2 et les STAT3 et 5 (Kehry, 1996; Hanissian et Geha, 1997).

D'autres molécules de la famille TNF-R interviennent. Le couple OX40/OX40L (CD134/CD134L ou TNFSF4/TNFRSF4) est important et l'inactivation de OX40L chez la souris inhibe la réponse humorale (Murata et al., 2000). Son récepteur, OX40, est exprimé par les lymphocytes T et joue un rôle de co-stimulateur dans l'activation lymphocytaire T, mais des arguments expérimentaux indiquent que le ligand OX40L, exprimé sur les lymphocytes B activés, délivrerait directement un signal de prolifération et de différenciation vers le lymphocyte B (Stuber et al., 1995). Très récemment vient d'être mis en lumière un rôle important pour un nouveau couple récepteur/ligand de la famille TNF : BAFF/Blys/TALL-1/THANK/zTNF4/TNFSF13B et son ligand BAFF-R qui vient d'être cloné (Thompson et al., 2001; Yan et al., 2001). BAFF stimule les lymphocytes B périphériques immatures et des souris transgéniques surexprimant BAFF présentent une augmentation du nombre des lymphocytes B matures et T effecteurs, et des désordres auto-immuns ressemblant à ceux du lupus érythémateux disséminé (LED) (Mackay et al., 1999; Batten et al., 2000). Effectivement, les souris BAFF^{-/-} ou BAFF-R^{-/-} ont un phénotype comportant une réduction sévère du nombre des lymphocytes matures périphériques et une diminution de dix fois du taux sérique des Ig (Schiemann et al., 2001; Thompson et al., 2001). Ces observations pourraient déboucher sur des applications thérapeutiques dans certaines pathologies auto-immunes telles que le LED où il existe un excès de BAFF dans le sérum des patients (Zhang et al., 2001a). Une autre molécule de la famille du TNF-R, CD27/TNFRSF7, stimule la différenciation B à un stade tardif (cf. p 27). Par ailleurs certains membres de la superfamille TNF/TNFR sont indispensables au développement de l'architecture du centre germinatif et donc à la réponse humorale de haute affinité. Les souris knock-out pour les gènes TNF- α /TNFSF2, TNF-R/TNFRSF1A, LT- α /TNFSF1, LT- β /TNFSF3 et LT- β R/TNFRSF3 sont dépourvues de centres germinatifs, ont une architecture de la rate altérée et ne peuvent établir une réponse humorale secondaire (Gonzalez et al., 1998; Fütterer et al., 1998). En particulier, la LT- α exprimée par le lymphocyte B est essentielle pour le développement des FDC qui sont des cellules indispensables à la structure du centre germinatif (Gonzalez et al., 1998).

A l'inverse, CD30/TNFRSF8 et son ligand CD153/TNFSF8 ont un rôle inhibiteur dans la différenciation lymphocytaire B. L'expression de CD30 est induite

sur le lymphocyte B par une stimulation CD40/CD40L mais réprimé par l'expression du BCR. L'activation des molécules CD30 par leur ligand CD153, exprimé par les lymphocytes T activés, bloque l'activation lymphocytaire B (Cerutti et al., 1998). Ce mécanisme peut expliquer que l'activation non spécifique d'un lymphocyte B par des molécules CD40L d'un lymphocyte T est bloquée en l'absence d'un signal BCR. La molécule CD95/Fas/TNFRSF6 joue également un rôle essentiel dans le contrôle négatif de la réponse humorale. Le signal CD40 induit l'expression de CD95 par les lymphocytes B qui deviennent ainsi très susceptibles à l'apoptose induite par le ligand de ce récepteur pro-apoptotique, CD95L, exprimé par les lymphocytes T activés. Des anomalies dans l'expression ou la fonction de CD95 ou de son ligand provoquent in vivo de sévères dérégulations de la réponse immunitaire humorale telles qu'une hypergammaglobulinémie, des lymphadénopathies et une auto-immunité (Krammer, 2000). Il est clair cependant qu'un lymphocyte B activé spécifiquement et à bon escient échappe à ce signal mortel (Foote et al., 1998). Le blocage de cette apoptose ferait intervenir l'induction de la protéine anti-apoptotique c-FLIP par le signal délivré par le BCR et le CD40 (Hennino et al., 2000).

(4) Réponse anticorps primaire

Parmi les lymphocytes B ainsi activés, certains vont se différencier directement sur place dans les cordons médullaires ganglionnaires en plasmocytes à courte durée de vie (14 jours) et sécréteurs d'une IgM caractéristique de la réponse anticorps primaire. Cette Ig M est de faible affinité car les gènes des immunoglobulines de ces plasmocytes n'a pas subi de mutations somatiques, et elle ne contribue pas à la production à long terme des anticorps. Cependant le rôle de cette vague d'anticorps est importante car elle fournit une première barrière rapide contre l'infection (Tarlinton et Smith, 2000).

(5) Voyage au centre germinatif

D'autres lymphocytes B activés de manière T-dépendante vont migrer dans la zone B des tissus lymphoïdes et initier la formation des centres germinatifs (GC), ou follicules secondaires, où ils vont proliférer intensément : c'est le stade de centroblaste (Liu et al., 1997). Ces cellules forment la zone sombre du GC et

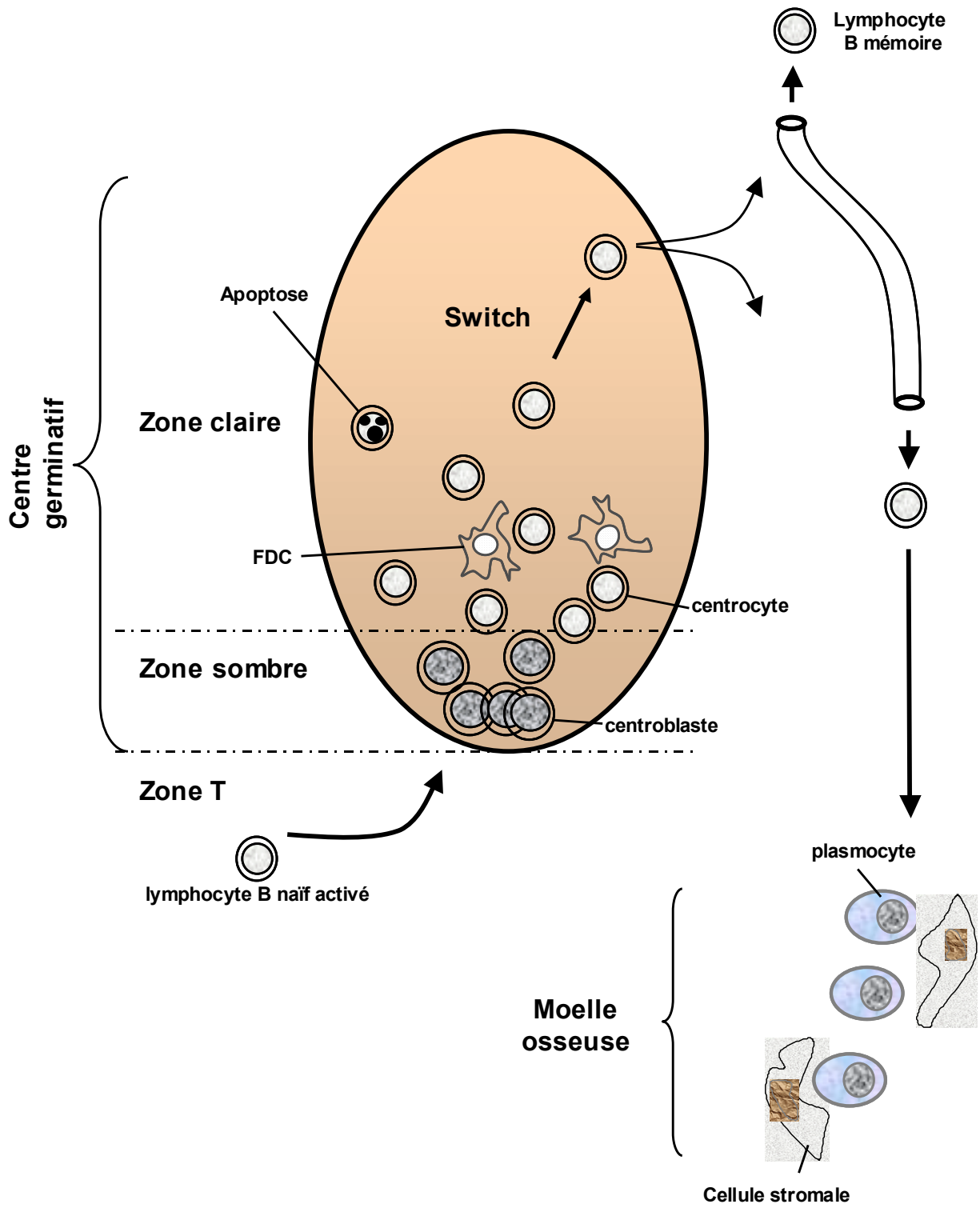


Figure 5 : centre germinatif. Voir description dans le texte.

n'expriment plus d'Ig de surface. La prolifération est induite par l'activation CD40 et des cytokines dont l'IL-4 (Wagner et al., 1998; Wagner et al., 2000). Cette stimulation induit l'expression de hauts niveaux de cycline D3, de CDK6 et de c-myc, responsables de l'activation du cycle cellulaire (Wagner et al., 1998; Liu et al., 1997). C'est durant cette phase que se produisent les mutations somatiques des gènes V_H et V_L , qui vont modifier l'affinité de l'Ig pour l'Ag. Les centroblastes migrent ensuite vers la zone claire du follicule et se différencient en centrocytes qui expriment à nouveau des Ig membranaires. Les centrocytes sont alors hautement susceptibles à l'apoptose. Cette sensibilité à l'apoptose est corrélée à la forte expression de molécules pro-apoptotiques telles que p53, Bax, Fas et c-myc (Liu et al., 1997; Krammer, 2000). Cette apoptose joue un rôle essentiel dans la sélection d'un répertoire d'Ig de haute affinité (Tarlington et Smith, 2000). En effet, seuls les centrocytes à forte affinité pour l'Ag vont être sélectionnés tandis que ceux à faible affinité vont mourir par apoptose. L'antigène est présenté sous forme d'immuns complexes à la surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC). Les FDC sont

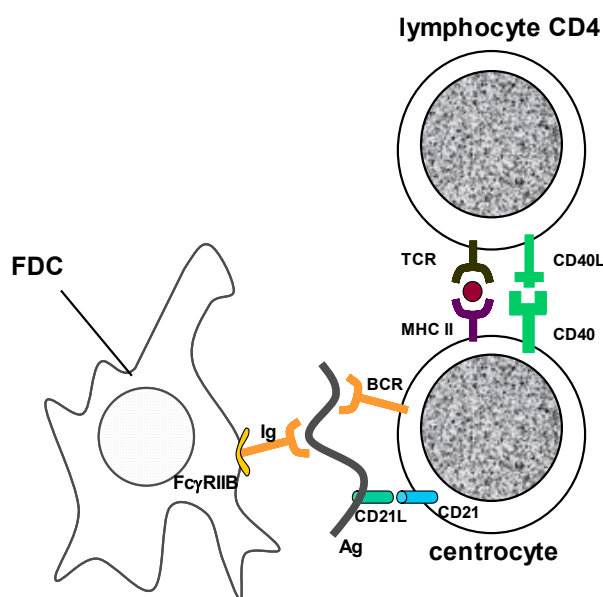


Figure 6 : relations entre le centrocyte et la FDC et le lymphocyte T CD4

des cellules qui ont une morphologie dendritique et constituent l'architecture des GC. Leur origine lymphoïde ou mésenchymateuse reste débattue (Kapasi et al., 1998). Deux sortes de signaux positifs sont nécessaires à la survie de la cellule B à ce stade : (i) la reconnaissance de l'Ag par une Ig de surface de haute affinité, et d'autre part (ii) la présentation de cet Ag par le MHC de classe II au lymphocyte CD4 spécifique de

l'Ag, dont l'activation sera synonyme de l'expression de molécules CD40L (Liu et al., 1997). Ces signaux sont renforcés par la présence de complément (CD21L) sur l'antigène qui va activer le CD21 à la surface du lymphocyte B (Qin et al., 2000; Tew et al., 2001). D'autres cytokines participent également à ce stade à la prolifération et

à la survie des lymphocytes B : IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 et HGF (Klein et al., 1995; Pals et al., 1998).

Le signal d'activation fournit par le lymphocyte T *via* le couple CD40/CD40L va induire à cette étape la commutation isotypique ou CS (class switching) des Ig qui aboutit à la production d'IgA, d'IgG et d'IgE. Parmi les cytokines que nous venons d'évoquer, l'IL-2 est importante pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes B activés, mais n'intervient pas dans le CS, l'IL-4 et l'IL-13 induisent la prolifération des lymphocytes B et favorisent le CS vers les classes IgG4 et IgE, tandis que l'IL-10, également un cofacteur pour la prolifération, est surtout une cytokine importante pour la différenciation vers une cellule sécrétrice d'une Ig et favorise un CS vers les classes IgG1, IgG3 et IgA1 (Punnonen et al., 1993; Morimoto et al., 2000; Choe et Choi, 1998). Le CS est un réarrangement du double brin d'ADN entre la région de switch de l'IgM (S_{μ}) et une région de switch en aval sur le gène des Ig, suivit de l'excision de la séquence entre ces deux sites sous forme de ADN circulaire (Snapper et al., 1997). Le CS fait intervenir les protéines Ku70 et Ku80, qui sont initialement associées au CD40 puis sont transloquées dans le noyau après activation du CD40, et la DNA-PK pour la réparation des cassures double brin que génèrent le CS (Morio et al., 1999). Au cours de ce remaniement génétique, des erreurs peuvent se produire et contribuer à la cancérisation du plasmocyte.

Après sélection des clones de haute affinité pour l'Ag, les lymphocytes B des GC peuvent se différencier soit en lymphocytes B mémoires, soit en plasmocytes. Le couple CD40/CD40L intervient en bloquant la différenciation terminale vers le plasmocyte. L'équipe de Banchereau a montré qu'en présence d'IL-2 et d'IL-10, les centrocytes $CD20^{++}CD38^{+}$ vont se différencier en lymphocyte B mémoire $CD20^{++}CD38^{-}$ s'ils conservent un signal CD40L, tandis qu'ils se différencieront en plasmocyte $CD20^{-}CD38^{++}$ si le signal CD40L s'éteint (Liu et al., 1997; Arpin et al., 1995; Callard et al., 1995). Le signal CD40 bloque la transcription de gènes normalement activés lors de la différenciation plasmocytaire comme ceux des immunoglobulines et du facteur de transcription BLIMP-1 (cf. infra p 34) (Randall et al., 1998).

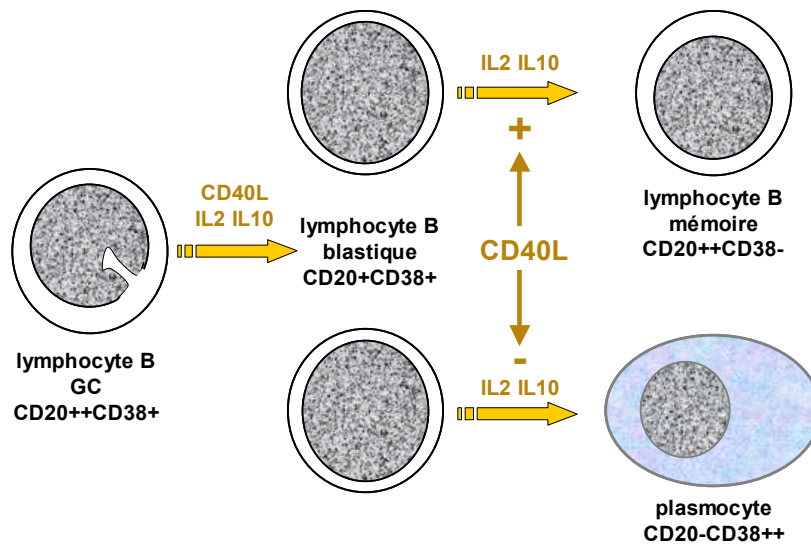


Figure 7 : Différenciation du centrocyte en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte selon les signaux d'activation. (Liu et al., 1997)

Cependant, l'équipe de Choi vient de proposer un modèle de différenciation in vitro sensiblement différent, où les centrocytes sont maintenu en culture en présence de la lignée de FDC HK, d'IL-2 et de CD40L, et vont se différencier en lymphocyte B mémoires si ils sont en présence d'IL-4 mais en plasmocytes si ils sont en présence d'IL-10 (Zhang et al., 2001b). La molécule FDC-SM-8D6, exprimée par les FDC, est indispensable à la génération de plasmocytes dans le modèle in vitro de Zhang et al. en favorisant leur prolifération, mais est superflu pour la genèse des lymphocytes B mémoires (Zhang et al., 2001b). Il faut noter que la réponse immune humorale dans les souris IL-4^{-/-} est conservée mais avec des modifications dans la répartition des différents isotypes, notamment l'absence d'IgE et un faible niveau d'IgG1 (Kopf et al., 1993).

Le couple CD27/CD70 stimule également la différenciation plasmocytaire dans le GC. CD27 est un membre de la famille du TNF-R dont le ligand est CD70. CD27 est exprimé sur une sous-population des lymphocytes B, les plasmocytes et la majorité des lymphocytes T. Cette molécule a été proposée comme un marqueur des lymphocytes B mémoires (Agematsu et al., 2000). En effet, seuls les lymphocytes B IgD⁺CD27⁺ sont porteur de mutations somatiques dans les parties variables des gènes des immunoglobulines et non les cellules IgD⁺CD27⁻. De plus, les lymphocytes B du GC CD27⁺ sont capables de se différencier rapidement en plasmocytes mais pas les cellules CD27⁻ (Agematsu et al., 2000). D'autre part, in vitro, la stimulation de CD27 par CD70 augmente le nombre de plasmocytes obtenus

(Agematsu et al., 1998). Cependant les souris dont le gène CD27 est invalidé présentent une immunité humorale conservée, tandis que l'immunité cellulaire est perturbée (Hendriks et al., 2000).

Enfin, il a été observé que la mise en jeu de OX40L sur le lymphocyte B augmentait la quantité d'Ig synthétisé au cours de la différenciation B, et il a été proposé l'intervention séquentielle des trois couples suivants de récepteurs de la famille TNF au cours de la différenciation B vers le plasmocyte : CD40/CD40L pour la prolifération cellulaire avant la différenciation plasmocytaire, CD27/CD70 pour la prolifération des lymphocytes B en train de se différencier en plasmocyte, et OX40L/OX40 pour l'augmentation de la quantité d'Ig synthétisée par plasmocyte (Morimoto et al., 2000).

Deux cytokines interviennent dans la différenciation du lymphocyte B vers le plasmocyte. L'IL-10 oriente le lymphocyte du GC vers le plasmocyte et bloque l'expansion des lymphocytes B mémoires en les induisant à se différencier en plasmocytes (Choe et Choi, 1998). L'IL-6 augmente le cycle cellulaire des lymphocytes B du centre germinatif et augmente la quantité d'Ig synthétisée dans les expériences de différenciation in vitro des lymphocytes B du GC (Kopf et al., 1998). Nous traiterons de l'IL-6 dans le paragraphe (7) ci-dessous sur le plasmocyte (p 28).

(6) Le lymphocyte B mémoire

Les lymphocytes B mémoires quittent le GC pour la circulation sanguine et se dirigent vers les tissus périphériques et les zones d'inflammation. Avec l'aide des lymphocytes T mémoires, ils seront responsables lors d'une stimulation antigénique ultérieure d'une réponse immunitaire humorale plus rapide et plus efficace. Les lymphocytes mémoires se différencient en effet préférentiellement en plasmocytes lors d'une activation par l'Ag et le lymphocyte CD4, synthétisant immédiatement des anticorps de haute affinité (Liu et al., 1997). Maruyama et al. ont récemment apporté la démonstration dans un modèle de souris transgénique que la mémoire immunitaire humorale peut persister indépendamment de l'Ag (Maruyama et al., 2000).

(7) Le plasmocyte

Alors que la biologie du lymphocyte B a été largement étudiée, la biologie du plasmocyte est encore peu connue.

Les cellules plasmocytaires générées dans les tissus lymphoïdes secondaires migrent et sont retenus dans la moelle osseuse par le récepteur de chemokine CXCR4 et des molécules d'adhésion (cf. infra p 30). Cette interaction avec le microenvironnement médullaire apporte des signaux directs de survie aux cellules plasmablastiques. Les plasmocytes d'amygdale ou de la moelle osseuse meurent rapidement par apoptose après purification, mais cette mort cellulaire est bloquée par contact avec des fibroblastes ou des cellules stromales médullaires (Merville et al., 1996; Kawano et al., 1995). La différenciation intra-médullaire des cellules plasmablastiques en plasmocytes est peu connue, mais comporte une phase de prolifération et une phase de différenciation. Un stade plasmablastique hautement proliférant a été clairement montré dans des systèmes de différenciation B *in vitro* et dans des cas de plasmocytose réactionnelle (Jelinek et Lipsky, 1983; Gavarotti et al., 1985). Cette situation clinique rare est caractérisée par un passage de quelques jours dans le sang périphérique d'un important contingent de plasmocytes au phénotype immature CD19⁺ CD38⁺ CD138⁺ CD40⁺ CD45⁺ CD11a⁺ CD49e⁻ CD56⁻ (Jego et al., 1999). Ces cellules plasmocytaires sont très proliférantes ce qui suggère que ces cellules sont des progéniteurs de plasmocytes, les plasmablastes. Les plasmablastes les plus immatures CD138⁻ peuvent se différencier en quelques jours *in vitro* en plasmocytes au phénotype mature CD138⁺, avec perte concomitante du HLA classe II, augmentation de l'intensité du CD38 et sécrétion intense d'Ig. Cette différenciation est bloquée par des anticorps anti-IL-6 ou anti-IL-6R. Dans ce modèle, l'IL-6 est apportée par les monocytes présent dans la culture (Jego et al., 1999). Une analyse détaillée de la différenciation *in vitro* de lymphocytes B d'amygdale en plasmocytes a permis d'identifier l'IL-6 comme un facteur de croissance (prolifération et survie) des plasmablastes en cours de différenciation et non comme un facteur de différenciation (Jego et al., 2001). D'autres arguments soulignent que l'IL-6 est une cytokine essentielle dans la biologie plasmocytaire normale. L'inactivation du gène IL-6 par recombinaison homologue induit chez la souris une baisse marquée de la réponse IgG, sans modification du nombre de plasmocytes médullaires ni du taux global d'IgG, et un déficit majeur dans la synthèse d'anticorps IgA dans les muqueuses (Kopf et al., 1994; Ramsay et al., 1994). A l'inverse, la surexpression d'IL-6 dans les lymphocytes B en insérant le gène de l'IL-6 en aval de l'*enhancer* E_μ provoque des plasmocytoses oligoclonales massives et lessouriceaux meurent à sept semaines (Suematsu et al., 1989).

La protection de l'organisme contre les réinfections et l'efficacité de la plupart des vaccins repose sur une mémoire humorale à long terme, capable de synthétiser en quelques jours de haut titres d'anticorps neutralisant de forte affinité (Ochsenbein et al., 2000). Il semble établi que la mémoire immunitaire puisse persister en dehors de la présence de l'Ag (Maruyama et al., 2000; Ochsenbein et al., 2000). Mais le support cellulaire de cette immunité à long terme reste encore débattu: lymphocyte B mémoire, capable de se différencier rapidement en plasmocyte à durée de vie courte en cas de stimulation antigénique, ou plasmocyte à longue durée de vie, persistant dans la moelle osseuse pendant plusieurs années ? Cette dernière hypothèse a été renforcée par deux publications récentes, identifiant dans la moelle osseuse des cellules non proliférantes synthétisant des anticorps spécifiques pendant une longue période, supérieure à un an chez la souris (Manz et al., 1997; Slifka et Ahmed, 1998; Slifka et al., 1998). Cependant l'équipe de Rolf Zinkernagel dans une étude récente a montré que la mémoire humorale protectrice repose sur l'existence de lymphocyte B mémoires capables de survivre longtemps (plus de un an chez la souris), en dehors de la présence de l'Ag, non proliférants, relativement radiorésistants et capables de se différencier en quelques jours en plasmocytes de courte durée de vie. Ce processus de différenciation en plasmocyte nécessite la présence de l'Ag, de lymphocytes CD4 et peut se dérouler dans la moelle osseuse puisqu'il se déroule avec la même efficacité dans des souris déficientes en organes lymphoïdes secondaires (Ochsenbein et al., 2000).

(8) *Chemokines*

La fréquence d'un lymphocyte B ou T spécifique d'un Ag comme la toxine tétanique est de l'ordre de 10^{-6} , et pourtant ces deux cellules doivent se rencontrer pour établir une réponse immune efficace. Favoriser la rencontre entre les cellules présentatrices de l'antigène et les très rares lymphocytes B et T qui en sont spécifiques est la principale fonction des organes lymphoïdes secondaires (Cyster, 1999). Ce déplacement des cellules du système immunitaire est gouverné en grande partie par les chemokines.

Les chemokines sont de petites protéines basiques chemoattractantes dont on distingue quatre types différents selon le nombre et l'espacement qui sépare les résidus cystéine localisés à l'extrémité amino terminale: C, CC, CXC ou CX₃C. Ce sont toutes des molécules secrétées, sauf la seule chemokine CX₃C, la fractalkine,

qui est transmembranaire. Les récepteurs des chemokines ont sept domaines transmembranaires et fonctionnent en étroite association avec des protéines hétérotrimériques qui lient le GTP (« protéines G ») (Zlotnik et Yoshie, 2000). Les chemokines ont tout d'abord été identifiées comme des facteurs synthétisés au niveau de sites inflammatoires et responsables du recrutement des neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques et lymphocytes T activés. Un rôle dans les métastases et l'angiogénèse a également été établi (Rossi et Zlotnik, 2000; Muller et al., 2001). Enfin, il est apparu que certaines chemokines étaient synthétisées constitutivement dans les organes lymphoïdes et dirigeaient la migration des lymphocytes au cours de leur différenciation et de leur activation. Ci-dessous sera détaillé le rôle des chemokines dans la régulation de la migration des lymphocytes B au cours de la réponse humorale.

Nous avons vu précédemment que SDF-1/CXCL12 est synthétisé par les cellules stromales de la moelle osseuse et maintient les lymphocytes B jusqu'au stade de lymphocyte B immature au niveau médullaire (cf. p 13). L'activation du BCR va diminuer la réponse chimiotactique du lymphocyte B naïf à SDF-1 suite à une internalisation de CXCR4 PL γ C2-dépendante (Bleul et al., 1998; Guinamard et al., 1999). La chemokine SLC/6CKine/CCL21 va alors diriger les lymphocytes B naïfs vers la zone paracorticale des ganglions. Les lymphocytes quittent la circulation sanguine en traversant l'endothélium des HEV des ganglions et des plaques de Peyer en plusieurs étapes. Une première étape dite de « rolling » fait intervenir des sélectines, puis une activation par un récepteur de chemokine modifie les propriétés des intégrines du lymphocyte ce qui induit une adhésion ferme du lymphocyte à l'endothélium, suivit de sa migration proprement dite (Butcher et Picker, 1996). SLC/CCL21 est synthétisée de manière constitutive par l'endothélium des HEV et va activer les intégrines des lymphocytes B naïfs qui expriment son récepteur CCR7 (Luther et al., 2000). L'adressage des lymphocytes B va ensuite être renforcé par l'expression simultanée de SLC/CCL21 et de ELC/MIP-3 β /CCL19, qui est un autre ligand de CCR7, respectivement exprimés par les cellules stromales et les cellules dendritiques de la zone T des organes lymphoïdes secondaires (Luther et al., 2000; Ngo et al., 1998).

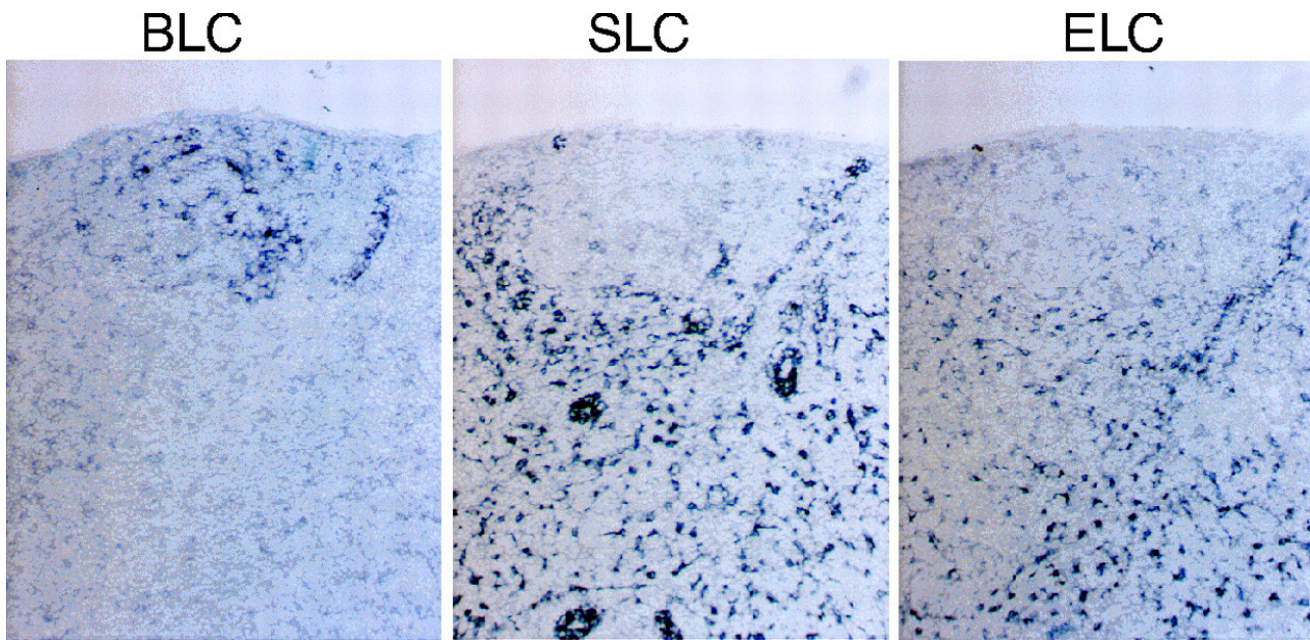


Figure 8 : Expression des chemokines BLC/CXCL13, SLC/CCL21 et ELC/CCL19 dans un ganglion de souris par hybridation avec des sondes ARN spécifiques. On note que l'expression de BLC/CXCL13 est restreinte au follicule lymphoïde, tandis que l'expression de SLC/CCL21 et ELC/CCL19 est restreinte à la zone T du ganglion, avec un marquage intense de SLC/CCL21 sur les HEV (structures annulaires noires de l'image du centre). (Cyster, Science 286 :2098, 1999)

C'est la chemokine BLC/BCA-1/CXCL13 qui est responsable du pilotage du lymphocyte B vers les follicules lymphoïdes. Les FDC synthétisent en effet cette chemokine tandis que le lymphocyte B exprime CXCR5, le récepteur de BLC/CXCL13 (Forster et al., 1996). L'équipe de Cyster a montré récemment dans un modèle de souris BLC/CXCL13^{-/-} le rôle de cette chemokine et son récepteur dans le homing des lymphocytes B dans les follicules lymphoïdes (Ansel et al., 2000). En outre, ils ont montré la fonction de BLC/CXCL13 dans le développement des ganglions et des plaques de Peyer, car cette chemokine induit l'expression de l'hétérodimère LT $\alpha 1\beta 2$ à la surface du lymphocyte B. La LT $\alpha 1\beta 2$ est une cytokine transmembranaire de la superfamille du TNF/TNFR qui stimule le développement des FDC et la synthèse de BLC/CXCL13 par les FDC, ce qui engendre une boucle amplificatrice qui contribue au développement des FDC et des zones B des organes lymphoïdes secondaires du follicule lymphoïde.

Lorsque le lymphocyte B se transforme en plasmocyte, il augmente sa sensibilité à SDF-1/CXCL12, tout en diminuant l'expression de CXCR5 et CCR7, ce qui contribue à la localisation des plasmocytes, qui expriment CXCR4, dans la moelle

osseuse. Si l'on reconstitue le système immunitaire de souris irradiées avec des lymphocytes CXCR4^{-/-}, les plasmocytes ont une localisation aberrante dans la rate et le sang et ne s'accumulent plus au niveau médullaire (Hargreaves et al., 2001).

(9) *Facteurs de transcription*

Plusieurs facteurs de transcription vont jouer un rôle critique au cours de la maturation du lymphocyte B. Pax5/BSAP et Bcl-6 sont impliqués dans la formation des centres germinatifs et la différenciation vers le lymphocyte B mémoire, tandis que PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1)/Blimp-1, XBP-1 (X-box binding protein 1) et IRF-4 (interferon regulatory factor 4) jouent un rôle crucial dans la différenciation plasmocytaire.

Pax5, appartenant à la famille des gènes paired box, est exprimé tout au long de la différenciation lymphoïde B et disparaît au stade de plasmocyte. Une de ses fonctions essentielles est d'engager les précurseurs hématopoïétiques vers la voie du lymphocyte B en bloquant l'expression de gènes non B (cf. p14). Mais par ailleurs il induit directement l'expression de gènes lymphocytaires B comme CD19, Ig α , N-Myc, LEF-1 (Kozmik et al., 1992; Nutt et al., 1998). Pax5 réprime aussi des gènes de la différenciation plasmocytaire comme XBP-1. De fait, l'inactivation conditionnelle de Pax5 dans les lymphocytes B matures réprime l'expression de gènes lymphocytaires B et induit l'expression de certains marqueurs plasmocytaires, sans toutefois suffire pour obtenir des plasmocytes matures producteurs d'Ig (Horcher et al., 2001). A l'inverse la surexpression de Pax5 dans des lignées lymphocytaires B bloque la différenciation plasmocytaire (Usui et al., 1997).

Bcl-6 est un répresseur transcriptionnel appartenant à la famille des facteurs de transcription Krüppel-type zinc finger. Il est exprimé principalement sur les lymphocytes B du centre germinatif et il a la particularité de subir des mutations somatiques au cours de la maturation lymphocytaire B (Pasqualucci et al., 1998). L'inactivation du gène BCL-6 chez la souris induit l'absence de développement de centres germinatifs et l'apparition d'un syndrome inflammatoire léthal caractérisé par un excès de lymphocytes CD4 TH2 (Fukuda et al., 1997). Ces travaux ont suggéré que BCL-6 favorise la différenciation vers le lymphocyte du GC et bloque celle vers le plasmocyte. La plupart des lymphocytes B du GC expriment BCL-6, sauf une minorité qui exprime IRF-4/MUM1. Parmi ces cellules BCL-6^{neg}/IRF-4^{pos}, une partie a une morphologie plasmablastique et pourrait correspondre au compartiment de

lymphocytes B au stade de différenciation terminale vers le plasmocyte, juste avant la sortie du GC (Falini et al., 2000). Shaffer et al. ont récemment exploré les gènes réprimés par BCL-6 dans différentes lignées lymphocytaires B par une approche de type puce à ADN. Sont réprimés des gènes d'activation lymphocytaire B comme la cycline D2, des gènes de la réponse inflammatoire comme les chemokines MIP-1 α /CCL3 et IP-10/CXCL10, ainsi que le facteur de transcription plasmocytaire PRDI-BF1/Blimp-1 (Shaffer et al., 2000). A l'inverse, l'induction d'une forme dominant négatif de BCL-6 entraîne dans la lignée lymphoblastoïde Raji la perte de marqueurs B comme CD19 et CD20, et l'apparition du marqueur plasmocytaire CD38, sans toutefois induire CD138.

PRDI-BF1 est également un répresseur transcriptionnel membre de la famille des facteurs de transcription Krüppel-type zinc finger. Il a été initialement cloné comme une protéine induite au cours de la différenciation en plasmocyte et capable d'induire un phénotype plasmocytaire dans des cellules de la lignée de lymphome BCL1-3B3 : expression de la chaîne j, de CD138 et synthèse d'immunoglobuline IgM (Turner et al., 1994). PRDI-BF1 réprime directement l'expression de gènes qui sont connus pour s'éteindre au cours de la différenciation plasmocytaire normale, comme c-myc ou HLA classe II (Lin et al., 1997; Piskurich et al., 2000). Cette répression nécessite l'activité de corépresseurs de la famille de protéines Groucho (Ren et al., 1999).

Un autre facteur de transcription vient d'être identifié comme essentiel au développement plasmocytaire. XBP-1 (X-box-binding protein-1) appartient à la famille des facteurs de transcription à leucine zipper CREB/ATF et est exprimé dans la plupart des tissus adultes, mais préférentiellement dans les tissus fœtaux au niveau des glandes exocrines, des chondroblastes, des ostéoblastes et du foie. Ce dernier point est essentiel et explique la létalité embryonnaire du KO de XBP-1 chez la souris en raison d'une hypoplasie sévère du foie (Reimold et al., 2000). Un rôle dans la biologie du plasmocyte a été suggérée par l'observation d'une répression du gène XBP-1 par Pax5 et une forte expression de XBP-1 dans des lignées plasmocytaires, qui n'expriment plus Pax5 (Reimold et al., 1996). De plus l'expression de XBP-1 est induite par l'IL-6 et participerait à la prolifération des cellules myélomateuses (Wen et al., 1999). L'utilisation d'un modèle de souris Rag-2^{-/-} reconstituées par des cellules hématopoïétiques XBP-1^{-/-} a permis d'éviter l'écueil de la létalité embryonnaire du knock-out XBP-1 et d'étudier le rôle de XBP-1

dans la différenciation lymphocytaire B (Reimold et al., 2001). Dans ce modèle, alors que les centres germinatifs se sont développés tout à fait normalement, il existe un effondrement de la production normale d'immunoglobuline liée à l'absence de plasmocytes. Les auteurs démontrent par ailleurs que la surexpression de XBP-1 dans des cellules de la lignée de lymphome BCL1-3B3 induit l'apparition du marqueur plasmocytaire CD138.

IRF4/MUM-1 est un membre de la famille des IRF (interferon regulatory factor) dont l'expression est restreinte au compartiment lymphocytaire. Son activité transcriptionnelle nécessite l'action coordonnée de PU.1 (Eisenbeis et al., 1995). L'analyse de l'expression de IRF4 dans les lymphocytes B du GC montre comme nous l'avons évoqué précédemment une expression mutuellement exclusive de IRF4 et de Bcl-6, l'expression d'IRF4 étant restreinte à une petite sous population lymphocytaire B au phénotype souvent proche de celui du plasmocyte (Falini et al., 2000). Les souris déficientes pour le gène IRF4 ont un blocage dans le stade terminal de la maturation lymphocytaire B et T (Mittrucker et al., 1997). Ces souris présentent des adénopathies en raison de l'accumulation de lymphocytes B et T immatures, mais une absence quasi complète d'immunoglobulines circulantes. Aucun plasmocyte n'est détecté dans ces animaux.

D'autres facteurs de transcription jouent un rôle dans la maturation lymphocytaire B. Les membres de la famille Ets, PU.1 et Spi-B jouent un rôle important dans la signalisation du BCR (Garrett-Sinha et al., 1999). Le facteur transcriptionnel à doigt de zinc Aiolos, fortement exprimé dans les lymphocytes B matures, semble inhiber le signal BCR puisque des souris Aiolos^{-/-} ont une augmentation de la prolifération induite par l'activation du BCR, une augmentation du taux sérique des IgG et IgE, des auto anticorps et développent fréquemment des lymphomes (Wang et al., 1998). Oct-2, membre de la famille POU et OBF-1, co-activateur des facteurs de transcription de la famille POU se lie à la séquence « octamer » ATGCAAAT en amont des promoteurs des immunoglobulines. Ces deux protéines sont exprimées essentiellement dans les lymphocytes B et les souris double knock-out Oct-2^{-/-}/OBF-1^{-/-} ne développent pas de GC et ont une forte diminution des IgG circulantes (Schubart et al., 2001). Enfin il faut citer les facteurs de transcription de la famille NF-κB qui sont activés par la dégradation de IκB au cours de la stimulation du BCR et du CD40. Les souris dépourvues de l'un des membres de cette famille n'ont pas d'anomalie discernable de la maturation des

lymphocytes B, ce qui suggèrent une redondance fonctionnelle au sein de cette famille (Gugasyan et al., 2000). En effet, l'absence de certaines combinaisons de protéines NF- κ B1 vont conduire à des défauts de développement lymphocytaire B. Par exemple, les souris NF- κ B1^{-/-} /NF- κ B2^{-/-} présentent des lymphocytes B bloqués au stade de lymphocyte B immature. A l'inverse, les lymphocytes B des souris I κ B^{-/-} ont une réponse proliférative augmentée et une augmentation de des immunoglobulines circulantes (Chen et al., 2000).

Les mécanismes de développement du lymphocyte B et du plasmocyte normal sont donc de mieux en mieux connus. Ce développement est orchestré par des cytokines, chemokines, signaux de transduction et facteurs de transcription commence en partie à être identifiés. La connaissance de ces mécanismes permet de mieux comprendre la physiopathologie des néoplasies lymphoïdes, comme nous allons le voir pour le myélome.

II. L'interleukine-6

A) Une cytokine pléiotropique

Nous avons évoqué le rôle de l'IL-6 dans le développement plasmocytaire normal (cf. p 29), et nous détaillerons son rôle dans la physiopathologie du MM (cf. p 51). Compte tenu du rôle de cette cytokine dans la biologie du plasmocyte normal et tumoral, il est important d'accorder dans cette introduction un chapitre à la signalisation induite par l'IL-6.

L'IL-6 est une cytokine typiquement pléiotropique agissant sur les cellules hématopoïétiques en augmentant la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, et des lymphocytes T. Elle agit également sur des cellules non hématopoïétique en induisant la synthèse des protéines de phase aiguë de l'inflammation par les cellules hépatiques, en favorisant la survie de certains type de neurones, en stimulant la production d'ACTH, de prolactine et d'hormone de croissance, ainsi qu'en régulant le métabolisme osseux (Tilg et al., 1994; Heinrich et al., 1998). Cependant c'est par ses capacités à faire différencier les cellules plasmocytaire que l'IL-6 a été initialement clonée en 1986 (Hirano et al., 1986).

L'IL-6 appartient à une famille de cytokines comprenant le ciliary neurotrophic factor (CNTF), le leukemia inhibitory factor (LIF), l'oncostatine M (OSM),

l'interleukine-11 (IL-11) et la cardiotrophine-1 (CT-1) (Lam et al., 1991; Gough et al., 1988; Gascan et al., 1989; Malik et al., 1989; Paul et al., 1990; Pennica et al., 1995). Les récepteurs de cette famille de cytokines utilisent une sous unité transductrice du signal commune, la chaîne gp130, et partagent certaines propriétés biologiques. L'IL-6 et l'IL-11 utilisent un homodimère gp130, tandis que les autres cytokines font appel à un hétérodimère composé de la gp130 et d'une autre chaîne transductrice : LIF récepteur (LIFR) pour le LIF, la CT-1 et le CNTF, et l'OSM récepteur (OSMR) ou bien LIFR pour l'OSM (Kishimoto et al., 1995). L'IL-6, l'IL-11 et le CNTF se lient d'abord à un récepteur spécifique sans capacité transductrice (IL-6R, IL-11R et CNTFR respectivement) avant d'induire l'homo- ou l'hétérodimérisation des chaînes transductrices, tandis que le LIF et l'OSM se lient directement aux chaînes transductrices LIFR et OSMR respectivement et induisent leur dimérisation avec la gp130. Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 sont des récepteurs de type I, c'est à dire un seul domaine transmembranaire et la partie N-terminale extracytoplasmique, à l'exception du CNTFR qui est dépourvu de domaine intracytoplasmique et qui est relié à la membrane cytoplasmique par une molécule phosphatidylinositol. Récemment, le mannose 6-phosphate/insuline-like growth factor II a été identifié comme un nouveau récepteur de faible affinité pour le LIF (Kd = 6,9 nM) (Blanchard et al., 1998). Cependant ce récepteur ne transduit pas de signal en réponse au LIF mais est responsable de son internalisation et de sa dégradation (Blanchard et al., 1999). D'autre part vient d'être clonée un nouveau membre de cette famille de cytokines : NNT-1/BSF-3 (Senaldi et al., 1999). Cette molécule est homologue à la CT-1 et au CNTF et induit la phosphorylation de la gp130 et du LIFR, suggérant qu'elle utilise l'hétérodimère gp130/LIFR pour la signalisation. In vitro cette cytokine favorise la survie de neurones en culture et induit la synthèse de protéines de la phase aiguë de l'inflammation. In vivo, après administration à la souris, on observe une diminution de la masse corporelle, une hyperplasie lymphoïde B et un doublement de la concentration sérique d'IgG.

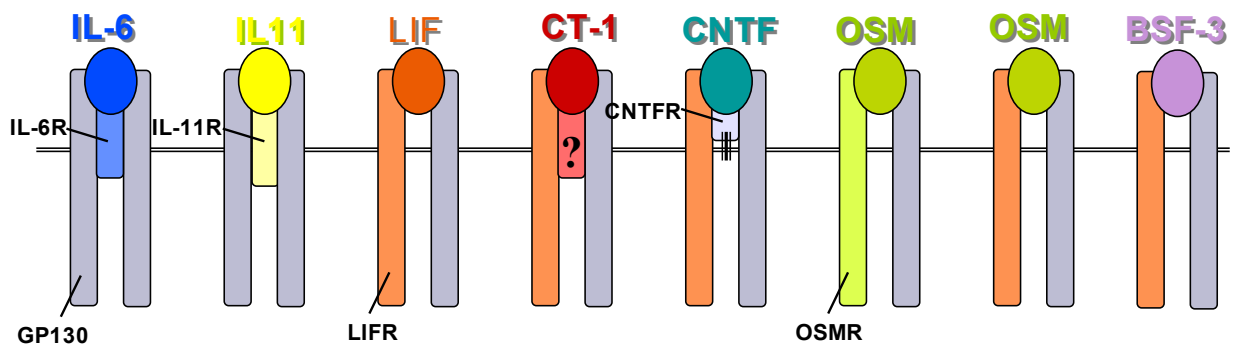


Figure 9 : Famille de l'IL-6 : IL-11, Oncostatine M (OSM), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) et Cardiotrophine-1 (CT-1) et leurs récepteurs.

La connaissance des signaux intracellulaires en aval de l'IL-6 permet de mieux comprendre la physiopathologie du MM au niveau moléculaire et identifie des cibles thérapeutiques potentielles. La fixation de l'IL-6 à son récepteur est à l'origine d'une cascade d'événements moléculaires comprenant la phosphorylation de nombreuses protéines intracytoplasmiques, des associations protéines/protéines, l'activation de facteurs transcriptionnels et finalement à la transcription de gènes cibles. Ces mécanismes commencent à être connus.

B) Voie de transduction de l'IL-6

(1) Le récepteur de l'IL-6

Le complexe du récepteur de l'IL-6 est constitué de deux sous unités (Taga et Kishimoto, 1997). La première est la chaîne α (IL-6R/gp80) qui se lie avec l'IL-6 avec une faible affinité (10^{-9} M) et ne transmet pas de signal intracytoplasmique (Yamasaki et al., 1988). La partie intracytoplasmique de l'IL-6R est courte et n'est pas nécessaire à la transduction du signal. Il existe une forme soluble de l'IL-6R, générée par épissage alternatif ou par clivage du récepteur membranaire, qui se comporte en agoniste et est capable de transmettre le signal apporté par l'IL-6 (Brochier et al., 1998). La deuxième chaîne, incapable de lier directement l'IL-6, est la chaîne transductrice β (gp130) qui est partagée avec les autres récepteurs de cytokines de la famille de l'IL-6. L'IL-6 se fixe d'abord à l'IL-6R puis le complexe IL-6/IL-6R se lie à la gp130 pour former un récepteur de forte affinité (10^{-11} M) capable de s'homodimériser et de transduire un signal vers le cytoplasme (Taga et al., 1989; Murakami et al., 1993). Une caractéristique de l'activation des récepteurs de

cytokines est la phosphorylation sur tyrosine du récepteur et de nombreuses protéines intracytoplasmiques. Cependant ni l'IL-6 ni la gp130 ne présentent de domaine tyrosine kinase. Cette étape de phosphorylation est donc accomplie par des tyrosines kinases de la famille des Janus Kinases (JAKs) et de la famille de *scr* (Gadina et al., 2001).

(2) Les JAKs

Des JAKs (JAK1, JAK2 ou Tyk2) sont associées à la gp130 en dehors de toute activation, au niveau d'une séquence conservée parmi la superfamille des récepteurs de cytokine appelée Box 1 (Stahl et al., 1994; Leonard et O'Shea, 1998). La dimérisation de la gp130 provoque le rapprochement des JAKs ce qui entraîne la phosphorylation réciproque et l'activation de ces kinases. Les JAKs vont alors phosphoryler les 5 résidus tyrosine C-terminaux de la partie intracytoplasmique de la gp130. Ces tyrosines phosphorylées servent de point d'ancrage à de nombreuses protéines cytoplasmiques *via* des domaines SH2 comme les STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) 1 et 3, Shc, Grb2 ou SHP2. Les JAKs elles-mêmes peuvent également servir de point d'ancrage et il a été montré que la phosphorylation et l'activation de STAT5 par l'IL-6 passe par une interaction directe entre le domaine JH2 des JAKs et de STAT5 (Fujitani et al., 1997).

(3) Les STATs

Les STATs sont des facteurs de transcription qui, lorsqu'ils sont activés par phosphorylation sur tyrosine, forment des homo- ou hétérodimères par des interactions mettant en jeu leur domaine SH2 et la tyrosine phosphorylée (Ward et al., 2000; Leonard et O'Shea, 1998). Ces dimères migrent dans le noyau et se fixent à des séquences d'ADN spécifiques et activent la transcription de gènes cibles. Dans le cas de la gp130, STAT1 et 3 vont se fixer aux tyrosines 3 à 6 de la partie intracytoplasmique de la gp130 puis être phosphorylées par les JAKs (Stahl et al., 1995). Elles forment alors des homodimères STAT3/STAT3 et des hétérodimères STAT3/STAT1. Comme il l'a été précisé précédemment, STAT5 est également phosphorylé au cours de l'activation de la gp130 par l'IL-6.

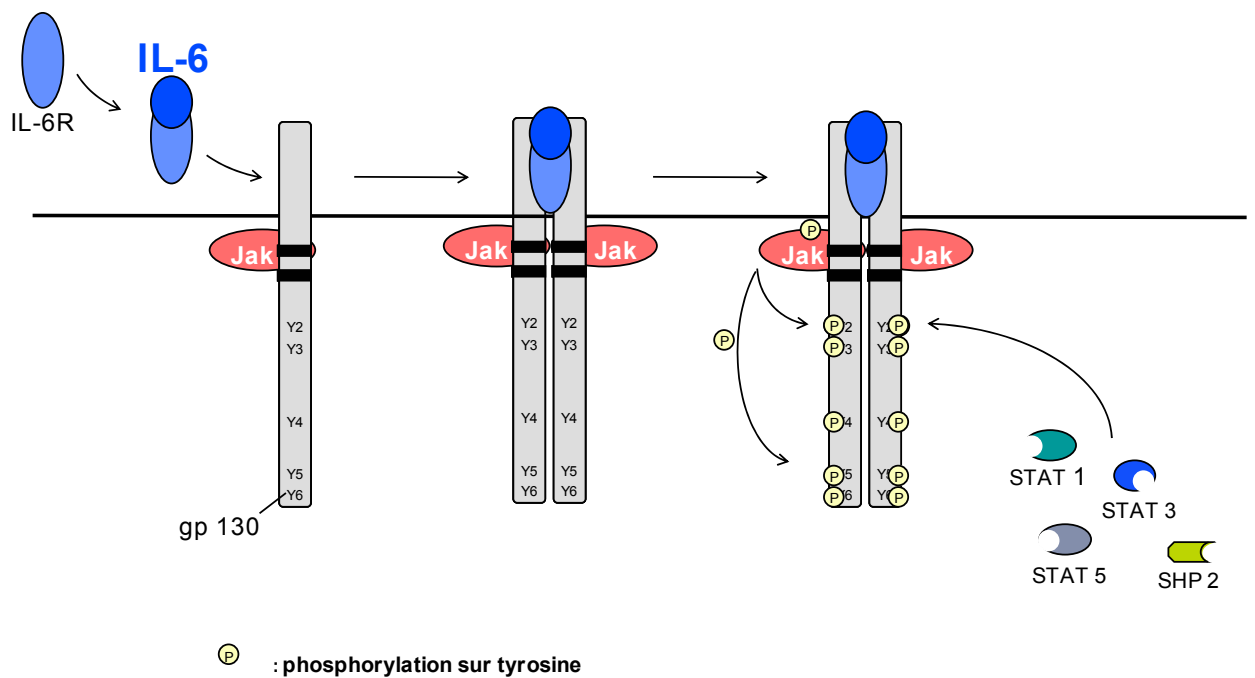


Figure 10 : L'IL-6 induit l'homodimérisation de la gp130, l'activation des JAKs et le recrutement sur tyrosines phosphorylées de molécules cytoplasmiques comportant un domaine SH2.

Parmi les gènes régulés par les STATs certains sont bien connus tels les gènes activés par les interférons ainsi que les gènes de la réponse inflammatoire – STAT3 s'est avéré être la protéine initialement nommée Acute Phase Response Factor (APRF). Il existe des séquences consensus reconnues par les STATs dans le promoteur de nombreux autres gènes et dans certains cas un rôle d'activation directe par les STATs a été établi : induction de Bcl-X_L, de p21 ou de la caspase ICE par STAT1 (Fujio et al., 1997; Chin et al., 1997; Chin et al., 1996), de l'immunoglobuline IgM, de SOCS-1, de Bcl-X_L ou de *c-myc* pour STAT3 (Faris et al., 1997; Naka et al., 1997; Catlett-Falcone et al., 1999; Kiuchi et al., 1999), et de la protéine CIS par STAT5 (Matsumoto et al., 1997).

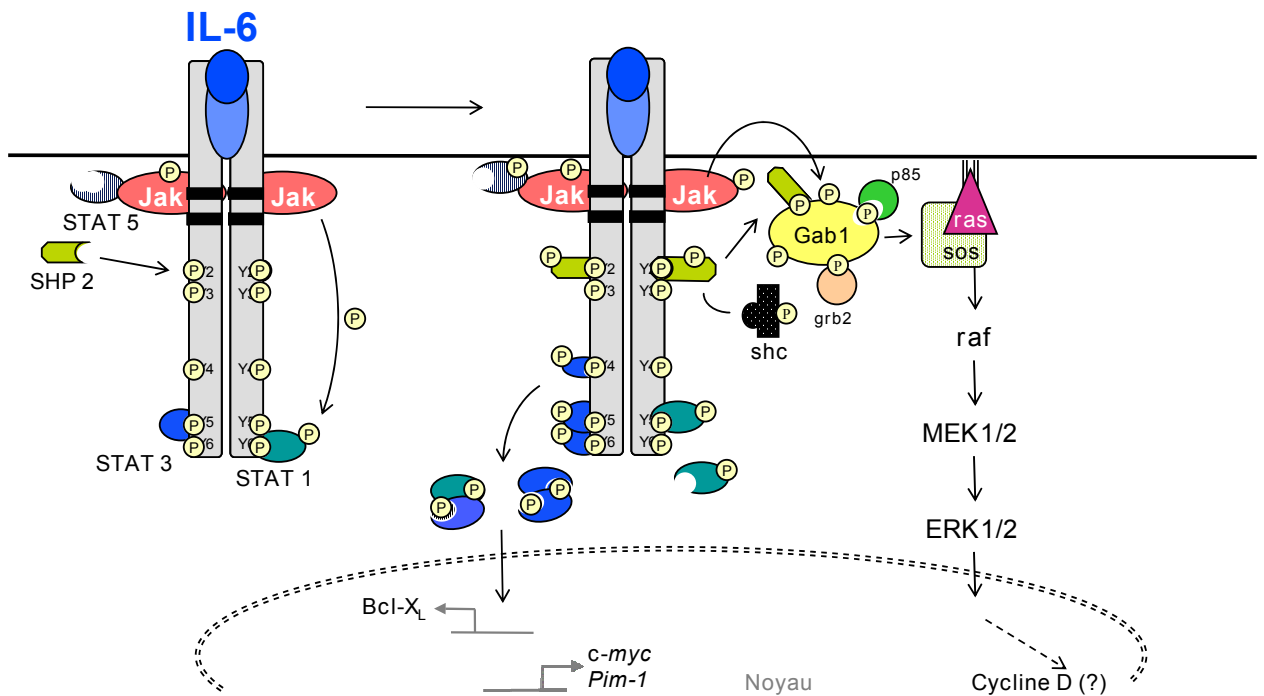


Figure 11 : Activation des voies de transduction des STATs et des MAPKs par l'IL-6.

Il a été montré que les tyrosines de la gp130 liant STAT3 sont essentielles pour la survie et la prolifération de la lignée murine cytokine dépendante BAF-BO3 (Hirano et al., 2000). L'activation de STAT3, sans celle de la voie des MAPK, suffit pour assurer la survie des cellules BAF avec un blocage du cycle cellulaire dans la phase S/G2 (Fukada et al., 1996). A l'inverse, si l'on surexprime un dominant négatif de STAT3 (STAT3F) dans ce modèle BAF-BO3, tout en maintenant la survie de la lignée en surexprimant Bcl-2, on observe que les cellules se bloquent en G1 (Fukada et al., 1998). Dans ce modèle, l'activation de STAT3 est responsable de l'induction des cyclines D2, D3 et A, de CDC25 ainsi que de la répression de p21 et p27. STAT3 induit, par activation transcriptionnelle directe, l'expression de c-myc qui contribue également à l'activation du cycle cellulaire (Kiuchi et al., 1999).

Un résidu sérine de STAT1 et 3 est également phosphorylé après activation par les cytokines dont l'IL-6, et augmente l'activité transcriptionnelle des STATs. Ce résidu sérine pourrait être phosphorylé par ERK2 puisque STAT1 et 3 contiennent un motif consensus de phosphorylation par les MAPK, ou bien par la PI-3K comme cela a été montré dans le cas du récepteur à l'IFN (David et al., 1995; Pfeffer et al., 1997).

(4) La voie Ras/MAPK

Cette voie de signalisation intracellulaire est mise en jeu par de nombreux facteurs de croissance et cette activation est retrouvée après homodimérisation de la gp130.

Plusieurs mécanismes d'activation sont décrits dans la littérature. L'homodimérisation de la gp130 peut permettre le recrutement sur la deuxième tyrosine de partie intracytoplasmique de la gp130 de la phosphatase SHP2 puis sa phosphorylation et son association avec Shc, ou bien l'association directe de Shc avec la gp130 (Fukada et al., 1996; Giordano et al., 1997). Dans ces deux cas Shc est phosphorylée sur tyrosine puis recrute une autre "docking protein", Grb2 pour arriver à la formation du complexe Shc/Grb2/Sos (Bonfini et al., 1996). Ce complexe est capable de transformer Ras-GDP en Ras-GTP. Ras-GTP est à l'origine de l'activation de la cascade des MAPK : phosphorylation de Raf-1 qui active MEK-1 qui active ERK1 et 2 lesquels activent des facteurs de transcription parmi lesquels c-Fos, c-Jun, NF-IL-6, etc. Une autre voie qui a été décrite plus récemment par l'équipe de Toshio Hirano fait intervenir la phosphorylation de la protéine Gab1, sans que celle-ci ne se lie à la gp130. Gab1 est un homologue des « docking » protéines IRS-1 et 2. Gab1 phosphorylé va fixer SHP2 et la sous unité p85 de la PI3K via leur domaine SH2, puis activer la voie des MAPK par un mécanisme wortmannine sensible (Takahashi-Tezuka et al., 1998). Ce complexe multiprotéique qui aboutit à l'activation des MAPK comporte également Vav (Lee et al., 1997). La voie Ras/MAPK médie un signal de prolifération. Son interruption dans la lignée BAF-BO3 par mutation de la tyrosine n°2 de la partie intracytoplasmique de la gp130 en alanine bloque toute prolifération (Fukada et al., 1996).

Dans le MM cette voie est impliquée à la fois dans la survie et dans la prolifération des cellules plasmocytaires malignes. Des oligonucléotides anti-sens ERK2 bloquent la croissance d'une lignée de MM dépendante d'IL-6 (Ogata et al., 1997). L'introduction dans une lignée de MM d'un gène *ras* muté codant pour une forme constitutivement active de Ras diminue l'apoptose induite par l'absence d'IL-6 (Billadeau et al., 1995).

La contribution exacte de chacune de ces deux voies, JAK/STAT et Ras/MAPK, dans la survie ou la prolifération des cellules myélomateuse est difficile à

établir puisqu'il existe une coopération entre ces deux voies, STAT1 et 3 devant être phosphorylées par ERK2 pour une activité transcriptionnelle optimale.

(5) Autres kinases

A côté de ces deux voies bien décrites de signalisation de la gp130 et documentées dans le MM, d'autres kinases sont activées par l'IL-6 et pourraient également contribuer à la transduction du signal de l'IL-6. Les kinases Btk, Tec, ainsi que la tyrosine kinase Fes sont constitutivement associées à la gp130 et sont activées après adjonction d'IL-6 et de IL-6R soluble dans la lignée BAF-BO3 transfectée par la gp130 (Matsuda et al., 1995a; Matsuda et al., 1995b). Trois kinases de la famille src, Hck, Lyn et Fyn sont activées par l'IL-6 dans des lignées de MM, que ces kinases soient associées à la gp130 (Hck, Lyn) ou pas (Fyn) (Hallek et al., 1997). Les conséquences fonctionnelles de l'activation de ces kinases ne sont pas connues.

Le signal STAT3 induit l'expression de deux sérine/thréonine protéines kinases cytoplasmiques, Pim-1 et pim-2 (Shirogane et al., 1999). Pim-1 avait été identifié auparavant comme étant activé par une insertion provirale dans un modèle de lymphomagénèse B induite par un rétrovirus E μ -myc, suggérant une action synergique de c-myc et pim-1 dans l'induction de tumeurs lymphoïdes B (van Lohuizen et al., 1991). Diverses cytokines telles que GM-CSF, G-CSF, IL-3, IFN- α ou IL-6 sont capables d'induire Pim-1. Shirogane et al. montrent que l'expression constitutive de Pim-1 et de c-myc peut compenser la perte d'activité de STAT3 (Shirogane et al., 1999).

Enfin, il a été montré plus récemment que l'IL-6 est capable d'activer la voie PI3K/AKT. Après addition d'IL-6 au milieu de culture, la sous unité p85 de la PI3K est phosphorylée suivit de l'activation de la sérine thréonine kinase AKT dans la lignée hépatocytaire HepB3. L'activation de cette voie de signalisation bloque les propriétés pro-apoptotiques du TGF- β sur ces cellules (Chen et al., 1999). Dans les cellules plasmocytaires malignes, l'activation de AKT par l'IL-6 est décrite mais n'est pas constante, dépendant de l'échantillon cellulaire étudié, et la magnitude de l'activation reste inférieure à celle induite par l'IGF-1 (Tu et al., 2000 et résultats non publiés de l'équipe).

(6) Rétrocontrôle négatif : SSIs, PIAS3

Il existe une régulation négative de la signalisation de la gp130 puisque la phosphorylation des STAT 1 ou 3 ou celle de ERK1 ou 2 observée après adjonction d'IL-6 diminue rapidement (voir **Article 3**, p 147) Une nouvelle famille de protéines a été clonée, SOCS (suppressor of cytokine signalling)/SSI (STAT-induced STAT inhibitor) qui inhibent la transduction des récepteurs de cytokine (Gadina et al., 2001). SOCS1 inhibe la cascade de signalisation de la gp130 en bloquant l'activité des JAKs (Naka et al., 1997; Starr et al., 1997). L'activation de STAT3 induit la synthèse de SOCS1 qui va réprimer, via les JAKs, la phosphorylation de STAT3, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. On notera que SOCS1 fixe et inhibe également la protéine kinase Tec (Ohya et al., 1997).

Un inhibiteur direct de STAT3 a également été cloné : PIAS3 (Chung et al., 1997).

III. Le plasmocyte tumoral

Les modèles de plasmocytomes murins ont permis de progresser dans la compréhension des processus d'oncogenèse du plasmocyte et nous décrivons les principaux modèles ci-dessous. Dans le myélome multiple, le plasmocyte tumoral se localise en général au niveau médullaire, ce qui provoque la symptomatologie osseuse associée à ce cancer. Nous décrivons les connaissances actuelles sur les interactions critiques du clone tumoral et de son environnement via des molécules d'adhésion, des chemokines et des cytokines. Puis nous détaillerons les altérations génétiques qui caractérisent le MM et résumerons le traitement du MM.

A) Modèles murins

Les tumeurs plasmocytaires de souris peuvent apparaître spontanément, mais ont généralement induites par différents agents comme les huiles minérales, le silicone, des rétrovirus exprimant des oncogènes ou la surexpression d'IL-6 dans des modèles de souris transgéniques.

Il y a 30 ans que Potter et Boyce ont montré que l'injection intra péritonéale d'huile de paraffine pouvait induire le développement de plasmocytomes dans les souris BALB/cAnPt (Potter et Boyce, 1962). Un phénomène analogue par introduction intra péritonéale de plastique avait été montré auparavant (Merwin et Algire, 1959). Le silicone ou des alcanes comme le pristane peuvent remplacer l'huile de paraffine (Potter et al., 1994; Anderson et Potter, 1969). Chacun de ces agents induit une réponse inflammatoire localisée qui conduit à la formation d'un tissu granulomateux dans lequel se développera la tumeur plasmocytaire. Il faut noter qu'un contexte génétique particulier est nécessaire. Les souches de souris BALB/c ou NZB sont permissives à l'apparition de plasmocytomes, alors que la souche DBA/2 a un fond génétique résistant.

Dans le modèle de plasmocytome induit par huile minérale, la tumeur n'apparaît que dans le tissu inflammatoire péritonéal. Il a été montré que le liquide ascitique comportait un facteur de croissance indispensable à la survie du plasmocyte tumoral (Nordan et Potter, 1986). Ce facteur a été purifié et le gène cloné. Il s'agit de l'IL-6 murine, ce qui établit le rôle central de l'IL-6 dans ces plasmocytomes murin induits (Van Snick et al., 1986; Van Snick et al., 1988).

Des plasmocytomes, phénotypiquement identiques à ceux induits par injection intra péritonéale d'huile minérale, peuvent être induits par des rétrovirus comportant des couples d'oncogènes tels que *raf* et *myc* (Troppmair et al., 1989; Kurie et al., 1990) ou *abl* et *myc* (Largaespada et al., 1992) dans des souris BALB/c.

Un troisième modèle de tumorigénèse plasmocytaire murine est la souris transgénique E μ -IL-6 (Suematsu et al., 1989). Lorsque le gène de l'IL-6 est placé sous le contrôle de l'enhancer de la chaîne lourde des immunoglobulines, les souris transgéniques E μ -IL-6 présentent de fortes concentrations d'IL-6 plasmatiques ainsi qu'une augmentation majeure, polyclonale, des immunoglobulines circulantes (120 à 400 fois le niveau normal pour les IgG1). Les tissus sont massivement infiltrés par des plasmocytes. Les souris transgéniques E μ -IL-6 de souche C57BL/6 ne développent cependant pas de plasmocytomes. Lorsque le transgène E μ -IL-6 est introduit dans des souris de fond génétique BALB/c, des plasmocytomes, monoclonaux, sont induits. Ils portent la translocation t(12;15) (c-myc/Ig) et sont transplantables dans la souris *nude* (Suematsu et al., 1992).

Le rôle majeur de l'IL-6 dans la formation de plasmocytomes murins a été confirmé dans des souris BALB/c dont le gène de l'IL-6 a été invalidé par recombinaison homologue. Dans ces animaux BALB/c, IL-6^{-/-}, il n'est plus possible d'induire des plasmocytomes expérimentaux par des rétrovirus contenant les gènes *myc* et *raf* ou par injection intra péritonéale de pristane (Hilbert et al., 1995; Lattanzio et al., 1997).

Par ailleurs, l'analyse des plasmocytomes murins a mis en évidence un événement génétique récurrent, la juxtaposition par translocation réciproque t(12;15) des gènes c-myc et de la chaîne lourde des immunoglobulines. Dans les plasmocytomes induits par le pristane, l'incidence de ce réarrangement chromosomique est voisine de 100% (Potter et Wiener, 1992). D'autres caractéristiques des plasmocytomes murins, en partie partagées par le MM chez l'homme, sont le rôle important des prostaglandines dans le microenvironnement inflammatoire des cellules plasmocytaires malignes (Hinson et al., 1996), un rôle d'un déficit fonctionnel du locus codant pour p16INK4a et p19ARF dans la susceptibilité des souris BALB/c aux plasmocytomes (Zhang et al., 1998), un rôle critique pour le récepteur de l'Insulin-like Growth Factor I Receptor (IGF-1R) dans la croissance tumorale (Li et al., 2000), et l'activation constitutive de STAT3 dans les lignées de plasmocytome murin devenant indépendante d'IL-6 exogène (Rawat et al., 2000).

Cependant, il a été reproché aux modèles de plasmocytomes murins de se présenter essentiellement comme des tumeurs plasmocytaires extra médullaires et donc d'être un modèle assez éloigné du MM qui est principalement de localisation médullaire. Radl et al. proposent le modèle des souris C57BL/RaLwRij âgées, qui développent fréquemment des gammopathies monoclonales bénignes, et parfois, avec une fréquence de 0,5% à l'âge de deux ans, un pic monoclonal d'Ig majeur avec effondrement des autres classes et envahissement de la moelle osseuse par des plasmocytes monoclonaux, caractéristique d'un tableau de MM (Radl et al., 1988). En particulier, les réarrangements de c-myc sont beaucoup moins fréquents, ce qui est plus proche de ce que l'on observe dans le MM que dans le plasmocytome murin (Radl et al., 1990).

B) Le myélome multiple

Le MM représente environ 1% des décès par cancer dans les pays occidentaux (Bataille et Harousseau, 1997). L'âge médian de l'incidence du MM est de 72 ans (Bergsagel et al., 1999). Du fait du vieillissement de la population, l'incidence du MM devrait augmenter au cours des prochaines décennies. L'existence d'une gammopathie monoclonale bénigne (MGUS, malignant gammopathy of undetermined significance) est un facteur de risque de MM. En effet, Bob Kyle a rapporté l'étude d'une cohorte de 241 patients porteurs d'une MGUS avec un suivi de 20 à 35 ans, et montre qu'au moins 16% des patients présentant une MGUS développent un MM, avec une médiane d'apparition du MM de 10 ans (Kyle, 1993). Les principales conséquences physiopathologiques de l'évolution de la maladie sont la production d'une immunoglobuline monoclonale, l'insuffisance médullaire, des lésions osseuses lytiques, une insuffisance rénale et une hypercalcémie.

(1) Origine du MM

Le MM est en général IgG ou IgA, et seulement très rarement IgM, suggérant une origine lymphoïde B post-germinale. L'analyse des gènes variables des gènes des immunoglobulines dans les cellules de MM a effectivement montré un haut niveau de mutations somatiques en VH et VL, sans variation intra clonale. Ce profil confirme l'origine lymphoïde B post-folliculaire du MM, lymphocyte B mémoire ou

plasmocyte, après les événements de mutations somatiques, de sélection et de commutation isotypique (Stevenson et al., 1998). La nature exacte de la cellule souche tumorale, reste sujette à polémique. Le plasmocyte tumoral conserve une certaine capacité à se différencier, et il existe chez un même patient des populations myélomateuses de différent degré de maturité phénotypique (cf. paragraphe suivant). Il est probable que la fraction plus immature des cellules myélomateuses, qui est la fraction proliférante, soit capable d'auto renouvellement et constitue le compartiment responsable de l'auto renouvellement et de l'expansion des cellules plasmocytaires malignes. L'existence d'une étape de plasmablastes hautement proliférants au cours de la différenciation plasmocytaire normale est en faveur de l'hypothèse d'une origine plasmablastique des cellules myélomateuses. Cependant l'existence d'un compartiment lymphocytaire B partageant avec les cellules de myélome un réarrangement VDJ identique est avancé par l'équipe de Pilarski (Jensen et al., 1991; Szczepek et al., 1998). Ces travaux montrent que ces lymphocytes B clonotypiques représentent jusqu'à 95% des lymphocytes B circulants, sont fréquemment CD34⁺, chimiorésistants et se retrouvent dans les cellules mononuclées après mobilisation par facteur de croissance (Szczepek et al., 1997). Il vient d'être rapporté l'existence d'une Ig clonotypique pré switch (IgM) chez 68% des patients, et la persistance de cette IgM clonotypique après traitement par chimiothérapie serait un facteur de mauvais pronostic (Reiman et al., 2001). Ces travaux n'ont pas été reproduits par la grande majorité des équipes. Bien qu'il y ait un consensus pour admettre l'existence de lymphocytes B clonotypiques circulant, ils ne représenteraient selon toute vraisemblance qu'une minorité de l'ensemble des lymphocytes B circulant (Chen et Epstein, 1996). Zandecki et al. ont analysé les cellules mononuclées du sang de patients atteints de MM par FISH en utilisant des sondes spécifiques des anomalies chromosomiques retrouvées sur les plasmocytes tumoraux de la moelle et par analyse de la quantité d'ADN. Ces auteurs trouvent chez 16/21 patients un contingent de plasmocytes circulants présentant les même anomalies cytogénétiques que les plasmocytes médullaires et ne retrouvent pas ces anomalies sur les autres fractions des cellules mononuclées du sang périphérique, sauf dans deux cas où de rares lymphocytes B CD20⁺ étaient porteurs d'anomalies chromosomiques (Zandecki et al., 1997a). Le partage d'un même réarrangement VDJ prouve une origine commune entre les lymphocytes B clonotypiques et les

cellules myélomateuses, cependant le rôle des lymphocytes B clonotypiques dans le renouvellement des cellules tumorales est peu probable (Yaccoby et Epstein, 1999).

Dans tous les cas, la différenciation plasmocytaire est incomplète dans le MM. Les plasmocytes tumoraux produisent une quantité d'Ig bien inférieure à celle produite par les plasmocytes normaux. L'addition d'IL-6 ne modifie pas la synthèse d'Ig. Ceci suggère qu'une des caractéristiques des cellules de MM est d'être bloquée dans la différenciation plasmocytaire avant le stade de plasmocyte mature qui produit un taux élevé d'Ig.

(2) Phénotype des cellules myélomateuses

Les cellules myélomateuses expriment des molécules d'adhésion également présents sur les plasmocytes normaux : CD11a/LFA-1, CD38, CD44, CD45, CD49d/VLA-4, CD49e/VLA-5, et CD138/syndecan-1. En revanche les plasmocytes tumoraux expriment certaines molécules que n'expriment pas les plasmocytes normaux tels que CD56/NCAM et CD58/LFA-3. Les molécules d'adhésion contribuent à la localisation médullaire du MM, par l'interaction avec les cellules stromales médullaires (CD49d se lie à VCAM-1) et à la matrice extracellulaire (syndecan-1 se lie au collagène de type 1, CD49d à la fibronectine).

L'analyse phénotypique des plasmocytes tumoraux montre une hétérogénéité dans l'expression de certains marqueurs et ceci pourrait refléter l'existence de populations myélomateuses à plusieurs stades de différenciation chez un même patient. Kawano et al. a décrit au sein de plasmocytes tumoraux deux populations en fonction de l'expression de CD49e/VLA-5 (Kawano et al., 1993). La population CD49e/VLA-5⁻ présente un phénotype plasmablastique et prolifère de manière importante en réponse à l'IL-6. Au cours de l'évolution et de l'accélération de la maladie, cette population immature CD49e/VLA-5⁻ exprime de moins en moins les molécules d'adhésion CD11a/LFA-1 et CD56 (Pellat-Deceunynck et al., 1995).

Syndecan-1 est fortement exprimé sur les plasmocytes tumoraux et les lignées de MM, et cette expression est rapidement perdue lorsque les cellules de MM entrent en apoptose (Jourdan et al., 1998).

Comme nous l'avons mentionné précédemment (cf. p 32), les plasmocytes normaux expriment le récepteur de chemokines CXCR4 et celui-ci contribue de façon majeure à la localisation médullaire des plasmocytes normaux (Hargreaves et al., 2001). Les cellules myélomateuses expriment également ce récepteur (voir figure

12). L'interaction de CXCR4 avec la chemokine SDF-1/CXCL12, sécrétée par les cellules stromales médullaire pourrait contribuer à la localisation médullaire de cette néoplasie en favorisant l'adhésion des cellules myélomateuses à CS-1/fibronectine et VCAM-1 via VLA-4 (Sanz-Rodriguez et al., 2001).

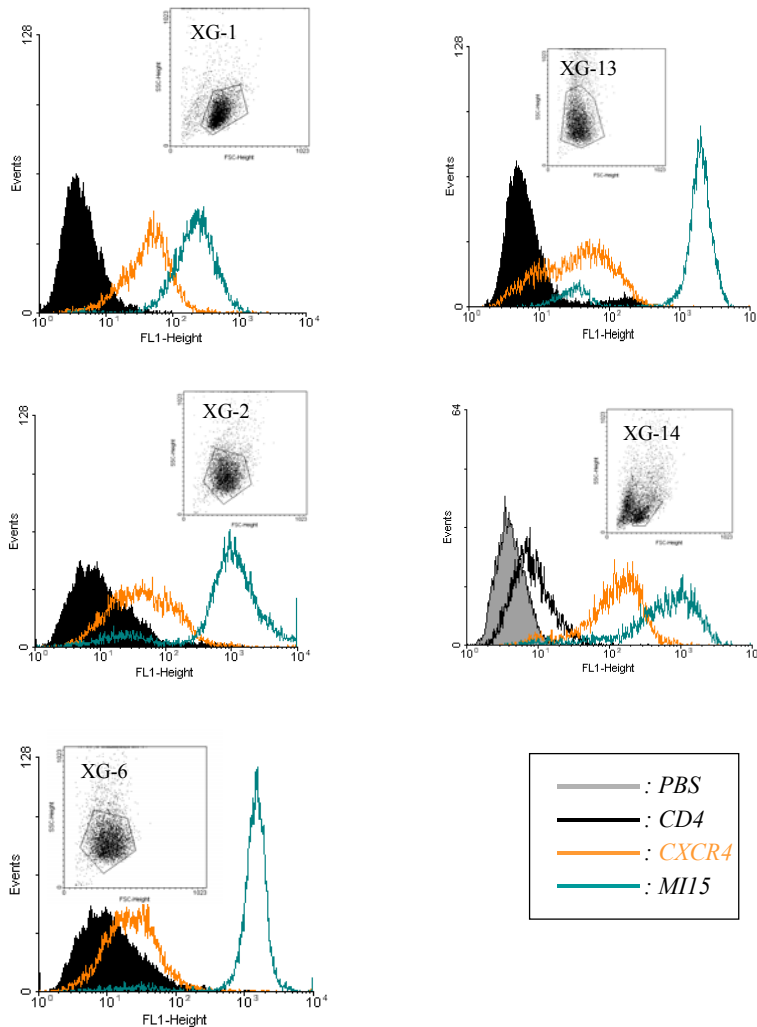


Figure 12 : Analyse en cytométrie de flux de l'expression de CXCR4 sur cinq lignées de myélome : XG-1, XG-2, XG-6, XG-13 et XG-14. En parallèle est montrée l'expression sur chaque lignée de syndecan-1, et, comme contrôle négatif, de CD4 (résultats non publiés).

(3) Rôle des cytokines et du microenvironnement médullaire

(a) Cytokines (Article 1 : Cytokines in multiple myeloma)

Les cytokines intervenant dans la physiopathologie du MM sont similaires à celles intervenant dans la physiologie des cellules plasmocytaires normales, et l'IL-6 joue dans les deux cas un rôle fondamental.

(i) IL-6

Les arguments en faveur d'un rôle essentiel de l'IL-6 dans le MM sont les suivants (Klein et al., 1995): (i) l'IL-6 est le principal facteur de prolifération des plasmocytes tumoraux *in vitro* chez les malades en phase de prolifération médullaire et extra médullaire (Klein et al., 1989) (ii) les plasmocytes tumoraux expriment spontanément l'IL-6R, et l'expression de la gp130 augmente au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (Barille et al., 1999b) (iii) on peut obtenir de manière reproductible des lignées de MM dépendantes d'IL-6 pour leur survie et leur prolifération chez les malades en phase de prolifération extra médullaire (Zhang et al., 1994a) (iv) le blocage *in vivo* de l'activité de l'IL-6 par des anticorps anti-IL-6 chez des patients atteints de MM a des effets anti-tumoraux (Klein et al., 1991; Bataille et al., 1995) (v) l'IL-6 est produite en excès par le microenvironnement médullaire myélomateux et un taux sérique élevé d'IL-6 constitue un facteur de mauvais pronostic (Klein et al., 1989; Portier et al., 1991; Bataille et al., 1989).

Bien qu'initialement il ait été suggéré que l'IL-6 soit produite par les cellules tumorales elles-mêmes (Kawano et al., 1988) – ce qui est vrai pour la lignée de MM autocrine U266 – il est maintenant couramment admis que ce sont les cellules stromales médullaires, les ostéoblastes et les ostéoclastes qui sont la principale source d'IL-6 dans le MM (Klein et al., 1989; Klein et al., 1995; Hallek et al., 1998). La production d'IL-6 est sous la dépendance d'IL-1 β , sécrétée par les cellules myéloïdes et mégacaryocytaires de la moelle osseuse, et dans une moindre mesure par les plasmocytes tumoraux (Cozzolino et al., 1989; Costes et al., 1998), et sous la dépendance de l'interaction directe des plasmocytes *via* leur molécules d'adhésion avec le microenvironnement médullaire (Uchiyama et al., 1993).

L'IL-6 est le chef de file d'une famille cytokines (cf. p 36). La prolifération de lignées de MM dépendantes d'IL-6 peut-être stimulée par le CNTF, le LIF, l'OSM et l'IL-11. Des lignées de MM dépendantes pour leur survie et leur prolifération d'IL-11, de LIF ou d'OSM ont pu être obtenues (Zhang et al., 1994b).

(ii) Autres cytokines

Le récapitulatif du rôle des cytokines dans les cellules myélomateuses a fait l'objet d'une revue de la littérature : « Cytokines in Multiple Myeloma » (**Article 1**).

Cette revue a été rédigée en 1999. Plusieurs points méritent une actualisation.

Les effets *in vitro* des interférons α , β et γ sur les plasmocytes tumoraux restent toujours très conflictuels comme le montre une publication récente indiquant des propriétés pro-apoptotiques des l'interférons α et β , mais pas γ , sur les lignées de MM RPMI8226, U266 et NCI-H929 ainsi que sur des cellules primaires de MM, via un mécanisme impliquant le récepteur TRAIL (Chen et al., 2001).

Notre équipe a montré les propriétés anti-apoptotiques de l'IGF-1 sur les cellules myélomateuses (Ferlin et al., 2000 et **Article 5**, cf. p 176). Les principales voies de signalisation activées par l'IGF-1 sont la voie PI3K qui active en aval AKT et p70S6K, et la voie des MAPK (Ge et Rudikoff, 2000; Tu et al., 2000; Li et al., 2000). La voie PI3K semble essentielle puisque les inhibiteurs de cette voie wortmannin et Ly294002 bloquent les effets anti-apoptotiques de l'IGF-1 (Tu et al., 2000). Dans un modèle murin de plasmocytome, la surexpression d'une forme dominant négatif du récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) diminue fortement la tumorigénèse (Li et al., 2000).

Enfin nous avons identifié la cytokine HB-EGF comme un acteur essentiel dans la survie et la croissance de certaines lignées de MM (De Vos et al., 2001, **Articles 6 et 7**, cf. p 192 et 204).

Cytokines in multiple myeloma

De Vos, J. and Klein, B.

(Article 1)

In Press in *Biology and Management of Multiple Myeloma*, Eds
Humana Press, edited by J. Berenson

(b) Microenvironnement médullaire

La fonction du microenvironnement médullaire est essentielle dans la physiopathologie du MM, pathologie avant tout médullaire. Comme précisé dans le paragraphe “ Phénotype des cellules myélomateuses ”, les molécules d’adhésion exprimées par les cellules myélomateuses sont fonctionnelles et cette interaction étroite est à l’origine de la sécrétion d’IL-6 par les cellules stromales. Des lignées de MM dont la croissance et la survie sont dépendantes de cellules stromales médullaires cultivées à long terme ont pu être obtenues (Bloem et al., 1998). Ceci est bien corrélé avec ce qui est observé chez le sujet normal : des plasmocytes normaux purifiés meurent rapidement par apoptose et cette mort cellulaire est bloquée par un contact direct avec des fibroblastes médullaires (Merville et al., 1996).

La survie et la prolifération des cellules tumorales nécessitent une vascularisation apportée par une néoangiogénèse et la destruction de l’architecture médullaire par les ostéoclastes.

(i) Néoangiogénèse

L’angiogénèse et l’activation des métalloprotéinases sont des étapes essentielles dans la progression tumorale. La moelle osseuse des patients atteints de MM présente une augmentation significative de l’angiogénèse (Vacca et al., 1994). Il existe une augmentation d’un facteur cinq de la densité en microvaisseaux de la moelle osseuse entre des MGUS ou des MM indolents par rapport à des MM actifs et une corrélation entre le labelling index et l’angiogénèse de la moelle osseuse (Vacca et al., 1994; Vacca et al., 1999). Les mêmes auteurs démontrent que cette augmentation est directement corrélée avec une activité accrue de néoangiogénèse. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est une cytokine qui stimule l’angiogénèse, notamment en induisant la prolifération des cellules endothéliales. Dankbar et al. rapportent que les lignées de MM et les cellules primaires de MM synthétisent du VEGF, mais n’expriment pas les récepteurs du VEGF FLT-1 and FLK-1/KDR (Dankbar et al., 2000). Ces deux récepteurs sont en revanche exprimés par les cellules stromales médullaires ainsi que les cellules myéloïdes et monocytaires (Bellamy et al., 1999; Dankbar et al., 2000). Les cellules stromales médullaires répondent au VEGF par une forte augmentation de la synthèse de l’IL-6, et à l’inverse l’IL-6 induit une augmentation de la synthèse du

VEGF par les cellules myélomateuses. Ces données permettent de proposer un modèle de stimulation réciproque, entre les cellules myélomateuses et les cellules stromales médullaires, de la synthèse de VEGF et d'IL-6, responsable d'une angiogénèse accrue et d'une stimulation de la croissance tumorale (Dankbar et al., 2000). L'observation de l'augmentation de l'angiogénèse au cours du myélome a justifié les essais thérapeutiques utilisant la thalidomide, qui est un inhibiteur de l'angiogénèse. Ces essais ont montré des effets anti-tumoraux dans le MM (Singhal et al., 1999). La thalidomide fait maintenant partie de l'arsenal thérapeutique utilisé dans le MM.

(ii) Activation des métalloprotéinases

Les métalloprotéinases constituent une famille d'enzymes protéolytiques dépendantes de zinc et de Ca^{++} qui hydrolysent les macromolécules de la matrice extracellulaire telles que les collagènes, la laminine, la fibronectine ou les protéoglycanes. Les métalloprotéinases sont impliquées dans les phénomènes de remodelage tissulaire tels que l'embryogenèse, la cicatrisation, l'angiogénèse ainsi que l'invasion tumorale et la formation des métastases. L'équipe de Régis Bataille a montré que les cellules myélomateuses expriment les métalloprotéinases MMP-9 et MMP-7/matrilysin, et que MMP-7 est capable d'activer la pro-MMP-2 qui synthétisée par le microenvironnement tumoral (Barille et al., 1997; Barille et al., 1999a). La production médullaire de MMP-2 est corrélée avec le stade de la maladie (Vacca et al., 1999). Cette augmentation de l'activité des métalloprotéinases au cours du MM ouvre des possibilités thérapeutiques par l'utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes.

(iii) Activation des ostéoclastes

Le MM est une néoplasie se développant principalement dans la moelle osseuse et caractérisée par une lyse osseuse qui est souvent un des signes cliniques majeurs. Les cellules de MM synthétisent le HGF (hepatocyte growth factor), une cytokine qui induit directement la prolifération des ostéoclastes (Grano et al., 1996) et induit la synthèse d'IL-11, autre cytokine activant les ostéoclastes (Hjertner et al., 1999). L'HGF pourrait donc participer à l'hyperactivité ostéoclastique observée au cours du MM. Les cellules myélomateuses produisent également la chemokine MIP-1 α , qui active l'activité des ostéoclastes (Han et al., 2001).

Un troisième facteur ostéoclastogénique vient d'être identifié dans les moelles de patients atteints de MM et pourrait se révéler comme un élément déterminant de l'activité lytique au cours de cette pathologie. Des coupes de biopsies ostéomédullaires montrent en immunohistochimie une augmentation de l'expression de TRANCE (tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine) et une diminution de l'OPG (ostéoprotégérine) qui est un récepteur dominant négatif de TRANCE chez les patients atteints de MM par rapport à des MGUS ou des sujets normaux (Pearse et al., 2001). TRANCE/OPGL/RANKL/TNFSF11 est un membre de la superfamille du TNF/TNFR, qui peut se lier à un récepteur fonctionnel RANK/TNFRSF11a ou à un récepteur non fonctionnel OPG/TNFRSF11b. Les ostéoclastes et leurs précurseurs expriment RANK. TRANCE est essentiel au développement et à l'activation des ostéoclastes. Des souris déficientes en RANK ou TRANCE développent une ostéopétrose par défaut d'activité des ostéoclastes, alors qu'à l'opposé des souris déficientes pour OPG présentent une ostéoporose sévère en raison d'une activité non contrôlée de l'axe TRANCE/RANK. Dans un système de co-culture, des lignées de MM induisent l'expression de TRANCE et répriment l'expression de l'ostéoprotégérine par les cellules stromales médullaires. L'ostéoclastogénèse induite par les lignées de MM est inhibée par RANK-Fc qui est un inhibiteur de TRANCE. Dans un modèle de myélome dans des souris SCID humanisées, l'administration de RANK-Fc prévient l'apparition des lésions osseuses et freine la progression tumorale. Ces données identifient la dérégulation de la voie TRANCE/ostéoprotégérine comme une cause centrale à la lyse osseuse dans le myélome et met en évidence une cible thérapeutique pour prévenir les dégâts osseux et freiner l'évolution de la maladie. Un autre groupe vient de rapporter une baisse de l'ostéoprotégérine dans le sérum des patients atteints de MM et cette baisse est corrélée avec le degré de lyse osseuse (Seidel et al., 2001).

(4) Cytogénétique

Les anomalies de l'ADN sont à l'origine de l'apparition d'un cancer. Du fait de la faible prolifération des cellules myélomateuses, pathologie peu proliférante, la cytogénétique conventionnelle, qui n'analyse que des cellules en cours de division, a longtemps sous-estimé la fréquence des anomalies génétiques observables dans le MM. Le développement des techniques de FISH (fluorescent in situ hybridization),

qui peut s'appliquer aussi bien aux cellules en métaphase qu'en interphase, du SKY (multicolor spectral karyotyping) (Sawyer et al., 2001), de l'analyse par CGH (comparative genomic hybridization) (Cigudosa et al., 1998) ou de biologie moléculaire a montré que des anomalies génétiques sont trouvées chez une grande majorité des patients.

(a) Des anomalies fréquentes et complexes

L'étude cytogénétique du MM est difficile en raison du faible taux de prolifération des cellules plasmocytaires. De plus, le prélèvement médullaire étudié est un mélange en proportion très variable de plasmocytes et d'éléments myéloïdes normaux beaucoup plus proliférant. Ces derniers produisent des mitoses normales qui peuvent submerger les quelques mitoses anormales des plasmocytes. Des mitoses anormales correspondant au clone tumoral sont rapportées dans 18 à 75% des patients atteints de MM (Dewald et al., 1985; Lai et al., 1995; Sawyer et al., 1995; Calasanz et al., 1997; Gutierrez et al., 2000; Smadja et al., 2001). Cette fréquence est de 18 à 66% au diagnostic et augmente à la rechute (35 à 75%). La table 1 montre la progression de la fréquence des anomalies cytogénétiques dans le MM en fonction du stade et de l'évolution. L'augmentation des anomalies cytogénétiques dans les myélomes évolués pourrait être le reflet de l'augmentation de la prolifération plasmocytaire au cours de la progression de la maladie, ou bien de l'accumulation progressive d'événements oncogéniques supplémentaires.

En raison des difficultés techniques citées plus haut, l'analyse caryotypique sous-estime la fréquence des altérations génétiques dans le MM. On a pu estimer le pourcentage de patients dont les cellules tumorales présentaient des anomalies chromosomiques, indépendamment de la capacité de prolifération du clone tumoral en utilisant des méthodes de FISH. Il a été montré, en utilisant respectivement 5 et 10 sondes chromosomiques différentes, une aneuploïdie (trisomie ou monosomie) dans 96% et 89% respectivement des MM étudiés (Flactif et al., 1995; Drach et al., 1995b; Zandecki et al., 1996).

	% anomalies	
	Laï et al. (1995)	Smadja et al. (2001)
Stade I	32	38
Stade II	48	54
Stade III	56	75
Globalement au	49	66
Reprise évolutive	75	
Tous Patients	55	

Table 1 : Pourcentage des patients présentant une anomalie caryotypique clonale en fonction du stade de la maladie, d'après (Lai et al., 1995) et (Smadja et al., 2001)

En raison du très faible index mitotique dans les MGUS, l'analyse cytogénétique conventionnelle n'est pas applicable à cette pathologie. Mais des études par FISH utilisant quatre marqueurs chromosomiques différents ont mis en évidence la présence d'au moins une trisomie dans 40 à 50% des cas (Zandecki et al., 1995b; Drach et al., 1995a). Cette incidence croît au cours du suivi des MGUS, en dehors de toute transformation en MM (Zandecki et al., 1997b). Les anomalies du nombre des chromosomes seraient donc déjà fréquentes au stade de MGUS, et seraient la règle au stade de MM. Au cours de l'évolution du MM, la fréquence de ces anomalies continueraient d'augmenter.

Le MM se rapproche sur le plan des anomalies caryotypiques des tumeurs solides non hématopoïétiques : en effet, alors que l'étude des leucémies montre assez souvent une seule anomalie cytogénétique (un seul événement détectable), le caryotype du MM est habituellement complexe avec des modifications souvent nombreuses, à la fois numériques et structurales (Zandecki et al., 1996). **Il n'existe pas d'anomalie constante et spécifique du myélome.**

(b) Anomalies de nombre

Parmi les caryotypes anormaux, une altération du nombre de chromosomes est observée dans 89 - 93% des patients (mais comme seule anomalie dans seulement dans 0 – 3% des patients). Une hypodiploïdie est retrouvée chez 10 à 30% des patients, une hyperdiploïdie chez 60 à 68% , et une pseudodiploïdie chez 9 à 20% des patients (Zandecki et al., 1996; Smadja et al., 2001).

Les anomalies numériques récurrentes sont des trisomies ou des tétrasomies des chromosomes **9**, 3, 19, 15, 11, 5 et 7 (par ordre décroissant de fréquence) et des monosomies pour les chromosomes **13**, 8, 14 et 10, ainsi que la perte des chromosomes sexuels X ou Y. La trisomie ou tétrasomie 9 et la monosomie 13 sont des anomalies majeures du MM.

La monosomie 13 ou la délétions 13q- sont fréquentes et de mauvais pronostic. Le gène Rb, paradigme du gène suppresseur de tumeur, est localisé en 13q14 et il a été initialement proposé qu'il était la cible des délétions en 13q-. Effectivement, des délétions mono-alléliques de Rb sont rapportées jusque dans 60% des MM, tandis que les délétions bi-alléliques de ce gène sont exceptionnelles (Corradini et al., 1994; Dao et al., 1994; Zandecki et al., 1995a; Juge-Morineau et al., 1995). Mais l'étude du gène Rb non délété montre qu'il n'est pas la cible de mutations ou de réarrangements. De plus l'absence d'expression au niveau protéique est rare (Zandecki et al., 1995a; Juge-Morineau et al., 1995; Juge-Morineau et al., 1997). Ces éléments évoquaient la possibilité que le chromosome 13 pouvait héberger un autre gène suppresseur de tumeur, peut-être le gène télomérique par rapport à Rb qui avait été proposé pour être fréquemment délété dans la LLC, nommé DBM (Deleted in B-cell Malignancies) (Brown et al., 1993). Un travail approfondi de l'équipe de Dalla-Favera montre néanmoins qu'il n'y a pas, dans la LLC, de gène dans la région 13q14 qui se comporterait comme un gène suppresseur de tumeur selon la théorie de Knudson (une copie du gène délétée, l'autre mutée) (Migliazza et al., 2001). De plus une étude plus précise de la zone du chromosome 13 délétée dans 234 patients atteints de myélome montre que sur les 98 patients (42%) porteurs d'une anomalie du chromosome 13, 90 (92%) présentent une délétion complète d'un chromosome 13 (Avet-Loiseau et al., 2000). Sur 7 des 8 patients n'ayant qu'une délétion partielle du chromosome 13, la région comportant

Rb fait partie de la zone délétée. Ces résultats montrent que dans 99% des cas de MM comportant une anomalie de nombre du chromosome 13, un des deux gènes Rb est délété. Ces observations cytogénétiques sont une explication possible à la plus faible expression de Rb au niveau ARN messager que nous observons dans les plasmocytes tumoraux par rapport aux plasmocytes normaux dans notre travail sur les puces à ADN (cf. p 240). Des travaux ont montré qu'une délétion du chromosome 13 en cytogénétique conventionnelle est un facteur de mauvais pronostic, mais ce facteur pronostic est biaisé par la nécessité d'avoir un index mitotique élevé pour obtenir un caryotype du clone tumoral (Tricot et al., 1995). Plus récemment, la détection d'une anomalie du chromosome 13 détectée par FISH a également été montrée comme un facteur de mauvais pronostic, bien qu'une telle anomalie génétique soit fréquente (33 à 38% des patients dans les études citées) (Perez-Simon et al., 1998; Facon et al., 2001). Cette anomalie apparaîtrait très tôt dans l'histoire de la maladie puisqu'on retrouve par FISH une délétion du locus 13q14 dans 45% des MGUS, fréquence analogue à celle retrouvée dans les MM (Avet-Loiseau et al., 1999b; Konigsberg et al., 2000). La délétion 13q14 pourrait être liée à la transition de MGUS vers un myélome puisque d'une part cette délétion n'est en général retrouvée que dans une fraction des plasmocytes dans les MGUS alors qu'elle est présente dans la majorité des plasmocytes dans les MM (Avet-Loiseau et al., 1999b), et d'autre part les MM qui ont un antécédent de MGUS dans leur histoire ont plus fréquemment une délétion 13q14 que les MM sans MGUS préalablement reconnu (Avet-Loiseau et al., 1999d).

D'autres anomalies de nombre ont été rapportées comme facteur pronostic. Les trisomies 6, 9 et 17 sont associées à un bon pronostic (Perez-Simon et al., 1998). Récemment, Smadja et collaborateurs montrent qu'au sein d'une série de 208 patients, le groupe des patients comportant une pseudodiploïdie ou une hypoploïdie a une médiane de survie de 12,5 mois contre 33,8 mois pour le groupe de patients dont le caryotype est hyperdiploïde, ce qui est une différence significative (Smadja et al., 2001). Une analyse multivariée montre que l'hypoploïdie/pseudodiploïdie est le facteur pronostic indépendant le plus important pour prédire la survie, suivi du traitement et du stade. Etant donné que la délétion du chromosome 13 est significativement liée à l'hypoploïdie/pseudodiploïdie, elle ne serait plus un facteur pronostique indépendant (Smadja et al., 2001).

(c) Anomalies de structure

Dans la plupart des cas, une ou plusieurs anomalies structurales accompagnent les anomalies numériques. Seuls 10 % des caryotypes montrent une anomalie de structure isolée. Ces altérations sont souvent complexes et multiples, sous forme de translocations équilibrées ou non et de délétions. Certains chromosomes sont particulièrement concernés : 1, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 19 et 22 (Zandecki et al., 1996).

Les aberrations structurales du chromosome 1 sont retrouvées dans 40-50 % des cas mais sans locus particulier. Il pourrait peut-être s'agir d'un événement secondaire comme cela a été reporté dans le lymphome de Burkitt (Fukuhara et al., 1983).

Les anomalies du 19q13.3 sont détectées dans 12 à 20% des caryotypes anormaux des MM, anomalie déjà retrouvée dans les lymphomes (Fukuhara et al., 1983; Taniwaki et al., 1994). Il est intéressant de remarquer que le locus 19q13.3 contient le gène E2A (qui code pour les protéines bHLH E12 et E47), lequel est réarrangé dans une translocation récurrente des LAL.

Mais les anomalies structurales les plus remarquables font intervenir le locus 14q32.

(d) Anomalies de structure mettant en jeu les gènes des Ig

Par cytogénétique conventionnelle, les anomalies du 14q32.3 sont observées chez 20 à 30% des patients qui présentent une anomalie caryotypique clonale (Zandecki et al., 1996). Mais ces translocations sont difficiles à voir sur un caryotype du fait de la localisation télomérique du locus 14q32.3, et de ce fait sont sous estimées par cette technique. En utilisant la technique du FISH, des anomalies du 14q32.3 sont observées dans 57 à 74% des patients atteints de MM et dans la majorité des lignées de MM (Avet-Loiseau et al., 1998; Nishida et al., 1997; Kuipers et al., 1999). Ces anomalies sont retrouvées très tôt dans la maladie puisque que 46% des patients atteints de MGUS ou de MM indolent (smouldering MM) présentent une anomalie 14q32.3 (Avet-Loiseau et al., 1999b).

La survenue très précoce de cette anomalie génétique dans l'histoire de la maladie est en accord avec le mécanisme physiopathologique avancé pour expliquer ces réarrangements du gène des Ig. Bergsagel et collaborateurs ont montré que les

translocations mettant en jeu le locus 14q32.3 dans le MM intervenaient toujours dans la région de switch du gène IgH sur l'allèle non producteur d'Ig (Bergsagel et al., 1996). Cette observation suggère que la translocation 14q32.3 se produit au moment ou après la commutation isotypique du lymphocyte B dans le centre germinatif (Gabrea et al., 1999). Ce mécanisme se différencie des translocations observées dans les lymphomes mettant également en jeu le locus 14q32.3 mais qui se dérouleraient plus précocement au cours de la différenciation lymphoïde B au moment de la recombinaison VDJ (Fiedler et al., 1992). Les conséquences physiopathologiques des translocations 14q32.3 (ou des locus des chaînes légères des Ig, (2p12, κ ou 22q11, λ)) sont communes à toutes les pathologies lymphoïdes B et se traduisent par la surexpression du (ou des) gènes qui est venu à proximité d'un des enhanceurs du gène des IgH ou des IgL. En effet, le promoteur et les enhanceurs des Ig sont fortement activés dans les lymphocytes B, tout particulièrement les plasmocytes. Dans la plupart des cas, le partenaire impliqué dans la translocation 14q32.3 est un oncogène, dont l'expression se trouve ainsi dérégulée.

L'impact pronostique du réarrangement 14q32.3 sur la survie est discuté. Certains auteurs montrent qu'il s'agit d'un facteur de mauvais pronostic (Smadja et al., 2001), ce que d'autres ne retrouvent pas (Ho et al., 2001).

Les partenaires du locus 14q32.3 les plus souvent retrouvés sont les suivants:

(i) Cycline D1 (11q13)

Le locus 11q13 (bcl-1, PRAD1, cycline D1) est retrouvé comme partenaire dans 10-28% des cas (Zandecki et al., 1996; Avet-Loiseau et al., 1998). La translocation t(11;14)(q13;q32) est la translocation impliquant le locus IgH la plus fréquente. Elle s'accompagne toujours de la surexpression de la cycline D1 qui est impliquée dans la régulation de la transition G1-S du cycle cellulaire (Chesi et al., 1996). La translocation t(11;14)(q13;q32) constitue pour certains un facteur de mauvais pronostic (Tricot et al., 1995).

(ii) FGFR3 (4p16.3)

Chesi et al. ont rapporté par une technique de Southern une nouvelle translocation, caryotypiquement silencieuse, t(4;14)(p16.3;q32.3) (Chesi et al., 1997). Le locus 4p16.3 comporte le gène du FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3).

FGFR3 est un récepteur transmembranaire pour les FGFs et comporte dans sa partie intracytoplasmique un domaine kinase. Les lignées et les cellules de malade positives pour t(4;14) surexpriment FGFR3 tant au niveau ARN que protéique. Cette anomalie a depuis été rapportée dans 21% des patients présentant une recombinaison illégitime du locus 14q32.3, soit 10% de l'ensemble des patients présentant un MM (Avet-Loiseau et al., 1998; Fonseca et al., 2001). Dans certains cas le gène FGFR3 qui est transloqué est également porteur d'une mutation, décrite dans certaines formes sévères de nanisme, connue pour activer constitutivement ce récepteur (Chesi et al., 1997; Richelda et al., 1997). Cette forme activée du FGFR3 est un oncogène, capable de transformer des fibroblastes in vitro, de protéger de l'apoptose induite par une absence d'IL-6 dans une lignée murine dépendante pour sa croissance d'IL-6 exogène, et de provoquer des tumeurs lymphoïdes et myéloïdes chez la souris lorsqu'on la surexprime dans des cellules souches hématopoïétiques (Chesi et al., 2001; Li et al., 2001).

On peut faire l'hypothèse que la dérégulation de FGFR3 donne un signal oncogénique aux plasmocytes tumoraux qui sont au contact de cellules stromales qui expriment du FGF (Allouche, 1995). Au cours de l'évolution de la maladie, il pourrait survenir des mutations activatrices du FGFR3, contribuant à une croissance tumorale indépendante de ce ligand.

Par ailleurs il est intéressant de noter que la molécule syndécan-1 est fortement exprimée à la surface des plasmocytes tumoraux et que les héparanes sulfates dont syndécan-1 sert de co-facteur aux FGFR (Jourdan et al., 1998; Filla et al., 1998).

(iii) IRF4 (6p25)

Le gène IRF4/MUM1 peut également être la cible d'une translocation mettant en jeu le gène IgH. Une telle translocation, t(6;14)(p21;q32.3), a été retrouvée dans 2/11 et 3/17 lignées de MM (dont la lignée XG-7) et sur 8/38 (21%) cas de MM (Iida et al., 1997; Yoshida et al., 1999). Ce gène appartient à la famille des facteurs de transcription IRF (interferon response factor) qui comporte au moins six membres partageant un domaine d'homologie N-terminal de liaison à l'ADN. Ces gènes jouent un rôle dans la réponse aux Interférons et à d'autres cytokines dont l'IL-6 (Harroch et al., 1993). Certains IRFs se comporteraient comme des anti-oncogènes (IRF1, ICSBP), d'autres comme des oncogènes (IRF2). IRF4 appartiendrait plutôt à

ce dernier groupe puisqu'il est capable de transformer des fibroblastes *in vitro* (Iida et al., 1997). Il est impliqué dans la différenciation lymphoïde B (cf. 35). Enfin il convient de noter que les souris IRF4^{-/-} ont un taux d'immunoglobuline effondré et sont incapables de développer une réponse anticorps (Mittrucker et al., 1997). La translocation, t(6 ;14)(p21 ;q32.3) s'accompagne de la surexpression de l'ARNm de IRF4 (Iida et al., 1997). Il faut noter cependant qu'IRF4 est exprimé au niveau protéique dans l'ensemble des lignées de MM que nous avons étudiées, y compris en l'absence de la translocation t(6 ;14)(p21 ;q32.3), celle-ci ne faisant qu'augmenter le niveau d'expression basal déjà important (données de l'équipe non publiées). D'autre part il convient de noter que la fréquence importante de cette translocation dans les patients atteints de MM rapportée par Yoshida et al. (Yoshida et al., 1999) n'est pas retrouvée par d'autres équipes : 0/80 réarrangements Ig (Avet-Loiseau et al., 1998), 0/43 (Smadja et al., 2001), 0/8 (Gutierrez et al., 2000).

(iv) Cycline D3 (6p21)

La lignée de MM KMM-1 surexprime la cycline D3 dont le gène est situé en 6p21. Il a été montré que cette surexpression était liée à une translocation t(6;14)(p21 ;q32.3) (Shaughnessy et al., 2001). Cette translocation est présente dans 4 à 5,6% des échantillons de cellules primaires de MM. Dans une série de 53 patients, une analyse par puces à ADN des cellules tumorales primaires a montré que la translocation t(6 ;14)(p21;q32) s'accompagnait toujours d'une surexpression marquée de l'ARN messager de la cycline D3 (Shaughnessy et al., 2001).

(v) c-myc (8q24)

Les translocations t(8 ;14)(q24;q32) et t(14;22)(q32.3;q11) mettent l'expression de c-myc sous le contrôle d'un enhancer des chaînes lourdes ou légères des Ig et sont caractéristiques du lymphome de Burkitt. Ces translocations sont également observées dans le MM, quoique peu fréquemment : 3/80 (3%) des réarrangements Ig, c'est à dire 3/127 (2%) à 23/529 (4%) de l'ensemble des patients atteints de MM (Avet-Loiseau et al., 1998; Avet-Loiseau et al., 2001). Mais le locus c-myc est également réarrangé de manière plus complexe, en dehors d'une translocation réciproque impliquant un gènes des Ig, aboutissant à la juxtaposition de c-myc avec une partie des locus IgH ou IgL, ou avec d'autres séquences génomiques non identifiées (Shou et al., 2000; Avet-Loiseau et al., 2001). La

surexpression de c-myc, protéine impliquée dans la prolifération cellulaire et dans les phénomènes de transformation maligne, contraste avec l'absence d'expression dans les plasmocytes normaux. En effet, c-myc est exprimé dans les lymphocytes B et son expression s'éteint au cours de la différenciation plasmocytaire, bloqué par le facteur de transcription plasmocytaire PRDI-BF1 (cf. p 34). C-myc est la cible de remaniements génomiques détectables par FISH dans 15 à 50% des malades, 15% sur la série de 529 patients rapportée par Avet-Loiseau et collaborateurs.

(vi) c-maf (16q23)

La translocation t(14;16)(q32.3;q23) fait intervenir le facteur de transcription c-maf. Elle a été initialement clonée dans 5/21 lignées de MM (Chesi et al., 1998a), mais son incidence chez les patients atteints de MM semble faible : 1/80 réarrangements IgH (Avet-Loiseau et al., 1998), 0/43 (Smadja et al., 2001).

(vii) Autres partenaires

D'autres gènes peuvent être plus rarement retrouvés dans une translocation 14q32.3 : le gène PAX5 en 9p13 (Avet-Loiseau et al., 1999a), le gène Bcl-2 en 18q21 (Nishida et al., 1997), le gène IRTA1 en 1q21 (Hatzivassiliou et al., 2001). Dans 46% des cas le partenaire n'est pas identifié (Avet-Loiseau et al., 1998). Enfin, citons la translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) qui pourrait également activer l'expression du gène MMSET/WHSC1 présent en der(4), en parallèle à l'activation du FGFR3 qui est retrouvé en der(14) (Chesi et al., 1998b).

(5) *Autres altérations moléculaires*

Nous venons de voir que des anomalies de structures telles des translocations impliquant les gènes des Ig peuvent entraîner la surexpression d'oncogènes comme la cycline D1, D3, le FGFR3, IRF4, c-myc ou c-maf, et que des anomalies de nombres peuvent cibler des gènes suppresseurs de tumeurs tels que Rb dans les délétions de tout ou d'une partie du chromosome 13. Mais d'autres altérations moléculaires ont été rapportées dans le MM, telles que des mutations ou des méthylations de promoteur de gènes suppresseurs de tumeur, ou telles que la phosphorylation d'un oncogène.

(i) Ras

L'oncogène *ras* intègre des signaux essentiels pour la prolifération et la différenciation cellulaire. Trois proto-oncogènes de la famille *ras* ont été identifiés chez l'homme : K-, N- et H-*ras*. Des mutations ponctuelles spécifiques des codons 12, 13 et 61 confèrent à la protéine Ras une activité constitutive. Cet événement oncogénique est retrouvé dans de nombreuses tumeurs. Dans le MM ont observé des mutations dans les gènes K- et N-*ras* dans les codons 12, 13 et 61, à l'exclusion de H-*ras*, avec une fréquence de 20 à 54% des patients au diagnostic, et jusqu'à 81% des cas à la rechute (Portier et al., 1992; Corradini et al., 1993; Bezieau et al., 2001). Ces mutations sont associées à une masse tumorale importante et survie médiane plus courte (Liu et al., 1996). Il a été suggéré que ces mutations représentaient un événement moléculaire tardif dans l'évolution du MM (Portier et al., 1992; Corradini et al., 1993). Une étude récente montre cependant qu'une purification préalable des cellules myélomateuses et l'utilisation d'un test sensible permet de mettre en évidence une mutation du codon 61 de N-*ras* dans presque 100% des patients, mais dans un pourcentage variable (12-100%) des cellules tumorales (Kalakonda et al., 2001). Cette observation suggérerait qu'une mutation activatrice de *ras* serait un événement obligatoire dans la genèse du myélome, ce qui constituerait la seule altération génétique commune à tous les myélomes.

(ii) p53

P53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les pathologies malignes humaines. P53 est un facteur de transcription dont l'expression est induite par des altérations de l'ADN, provoquant un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1, en particulier *via* l'induction de l'expression de p21. Si les dommages de l'ADN sont trop importants pour être réparés, p53 peut induire l'apoptose. P53 est considéré comme le "gardien du génome" (Lane, 1992).

Dans le MM la fréquence des mutations de p53 est l'ordre de 2 à 20% des patients, et est corrélée à une phase terminale de la maladie (Portier et al., 1992; Neri et al., 1993; Preudhomme et al., 1992). Dans les lignées de MM ces altérations de p53 sont retrouvées dans plus de 80% des cas, ce qui est en accord avec la notion que ces lignées sont obtenues à partir des patients arrivés au stade de MM extra médullaire (Mazars et al., 1992). Une altération fréquente du gène p53 par délétion interstitielle du locus 17p13 a été mise en évidence par FISH plus

récemment (Drach et al., 1998). La fréquence de cette anomalie génétique reste sujette à discussion et varie entre 9 et 21% des patients au diagnostic (Avet-Loiseau et al., 1999c; Drach et al., 2000). Cette fréquence augmente avec l'évolution de la maladie et atteint 54% des cas à la rechute. La présence de cette altération génétique au diagnostic est un facteur de mauvais pronostic (Drach et al., 1998).

(iii) p15 et p16

Deux protéines de faible poids moléculaire, p15 et p16, inhibent la phosphorylation de Rb en interférant avec la liaison entre les cyclines D et les CDK4 et 6. Les deux gènes correspondant se comportent comme des gènes suppresseurs de tumeur, en particulier *p16* qui est délété de manière homozygote dans de nombreuses tumeurs. Bien que ce type d'altération génétique soit fréquente dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant, une mutation de *p16* ou de *p15* n'a été rapportée qu'exceptionnellement dans le MM (Dilworth et al., 2000), et les délétion de p16 ou de *p15* sont rares (Quesnel et al., 1995; Gernone et al., 1996; Tasaka et al., 1997; Drexler, 1998). En revanche il existe fréquemment une méthylation anormale des îlots 5' CpG de *p16* et de *p15*, phénomène entraînant un blocage transcriptionnel de ces gènes. La fréquence de la méthylation du promoteur initialement rapportée était de 50 à 75% pour *p16*, et 67% pour *p15*, mais ces études analysaient de petites séries de patients (12 et 16) (Ng et al., 1997; Tasaka et al., 1998). L'étude de plus larges séries montre que la fréquence d'une méthylation du promoteur de *p16* est de 18 à 40% dans le MM (Guillerm et al., 2001; Gonzalez et al., 2000). Bien que l'inactivation de p16 soit plus fréquente dans les leucémies à plasmocytes et les lignées que dans les MM, la fréquence des méthylations des promoteurs de p16 et p15 apparaît similaire dans les MGUS et les MM (Guillerm et al., 2001). Au total *p16* et *p15* sont fréquemment inactivés dans le MM par hyperméthylation de leur promoteur, et il semble que ce soit un événement précoce dans l'histoire de la maladie.

(iv) STAT3

STAT3 est un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation de la gp130 (cf. p 39). Ce facteur de transcription, lorsqu'il est constitutivement activé par une double mutation, se comporte comme un oncogène capable d'induire la transformation de fibroblastes murins (formation de colonies en

Agar, induction de tumeurs dans la souris nude (Bromberg et al., 1999)). Catlett-Falcone et al. ont rapporté que STAT3 était constitutivement phosphorylé dans les cellules plasmocytaires malignes de MM, certainement secondairement à une synthèse importante d'IL-6 dans la moelle osseuse de ces patients (Catlett-Falcone et al., 1999). Ils ont montré, dans la lignée U266 qui présente une boucle d'activation autocrine IL-6, que l'activation de STAT3 était indispensable à la survie de la cellule myélomateuse, via l'induction directe de la protéine Bcl-X_L. L'activation constitutive de STAT3 a été retrouvée dans les plasmocytomes de souris (Rawat et al., 2000). C'est le premier exemple d'une altération post-traductionnelle essentielle à la genèse du MM.

(6) Traitement du myélome

Le traitement de référence du MM tout âge confondu reste l'association d'un alkylant (Melphalan) et de corticoïdes (Alexanian et Dimopoulos, 1995). La médiane de survie de ce type de thérapeutique est d'environ 36 mois, avec moins de 5% des patients obtenant une rémission complète (RC). L'intensification de la chimiothérapie associée à une autogreffe de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques (CSP), a permis d'améliorer significativement le taux de RC (25%) et la médiane de survie (supérieure à 50 mois) (Attal et al., 1996; Barlogie et al., 1999). Le taux de rémission complète peut-être augmenté à 40% en proposant une deuxième autogreffe un an après la première (Barlogie et al., 1999). L'analyse des courbes de survie sans rechute montre cependant qu'il n'apparaît pas de plateau qui pourrait suggérer une guérison d'une partie des patients. Il faudra cependant suivre le devenir des 10% de patients vivant sans progression de leur maladie plus de dix ans après des traitements intensifs avant de pouvoir affirmer que la chimiothérapie ne peut pas guérir un MM ou le ramener au stade de MGUS (Barlogie et al., 1998). Un des problèmes théoriques liés à l'autogreffe est la réinjection de cellules tumorales pouvant contribuer à la rechute. La sélection CD34 des CSP permet effectivement de diminuer significativement la contamination du greffon par des cellules myélomateuses, mais n'améliore pas la survie des patients traités (Stewart et al., 2001). Un autre progrès récent dans le traitement du myélome est l'introduction des biphosphonates de seconde génération dont l'utilisation permet de réduire les événements osseux des patients atteints de MM, mais sans allonger la survie globale (Berenson et al., 1996). La thalidomide a démontré récemment une efficacité

anti-tumorale avec 32% de réponses dans une série de 84 patients multitraités, réfractaires (Singhal et al., 1999). Mais l'efficacité est de courte durée et les effets secondaires assez marqués aux fortes doses. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été proposée comme traitement du MM, mais cette procédure reste grevée d'une morbidité et d'une mortalité sévère. Pourtant il a été démontré l'existence d'un effet greffon contre myélome, ainsi dénommé par analogie avec l'effet greffon contre leucémie (GVL, graft versus leukemia), suggérant une action des lymphocytes T cytotoxiques du donneur contre les cellules myélomateuses (Tricot et al., 1996). Cette approche est donc séduisante et pourrait, par comparaison avec l'expérience de l'allogreffe dans la leucémie myéloïde chronique, peut-être amener à la guérison de certains patients. La diminution de l'intensité du conditionnement par des « mini allogreffes » pourrait diminuer la morbidité de la greffe allogénique de moelle et étendre les indications à des patients plus âgés. Cependant, la nécessité d'une compatibilité HLA entre donneur et receveur limitera toujours le nombre de patients qui pourrait bénéficier d'un tel traitement. Mais l'effet greffon contre myélome est un élément encourageant le développement d'une approche thérapeutique du MM par immunothérapie.

Le MM reste pour le moment un cancer incurable et de nouveaux traitements sont nécessaires. Une nouvelle option thérapeutique suggérée par des expériences *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins est l'utilisation d'OPG (cf. p). D'une manière générale, une meilleure compréhension des mécanismes d'oncogenèse du MM devrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques, et les puces à ADN vont assurément jouer un rôle important dans la compréhension de ce cancer et le développement de nouveaux traitements.

(7) Conclusion

Hallek *et al.* ont proposé un modèle multi-étapes dans l'oncogenèse du MM (Hallek et al., 1998). Ces différentes étapes sont le plasmocyte normal, la MGUS, le MM intra-médullaire et finalement les formes extra-médullaires du MM. Ils suggèrent que l'événement génétique fondateur du MM est une translocation impliquant le locus Ig et a lieu pendant la différenciation du plasmocyte normal. Ceci rejoint l'hypothèse de Zandecki *et al.* qui suggère qu'une anomalie de structure serait le premier événement puisque 8-11 % des caryotypes de MM montrent comme seule

anomalie des anomalies structurales tandis qu'une anomalie de nombre isolée est exceptionnelle (0 – 3%) (Zandecki et al., 1996). A cause de l'instabilité caryotypique, retrouvée dès le stade de MGUS, des événements génétiques s'accumuleraient au fil de l'évolution, pouvant conduire de la MGUS au MM, et du MM aux leucémies à plasmocyte d'évolution fulminante. Remarquons néanmoins que seuls 30% des MM présentent un historique de MGUS documenté et qu'une analyse par FISH des anomalies chromosomiques du MM montrent une différence significative (délétion 13q14) entre les MM après une MGUS par rapport à un MM de novo, suggérant que ce sont deux formes de MM avec une histoire de la maladie différente (Avet-Loiseau et al., 1999d). D'autre part tous les MM n'évoluent pas vers des formes extra médullaires et inversement il existe des formes extra médullaires (en particulier des leucémies à plasmocytes) inaugurales. C'est cependant un schéma général qui permet d'intégrer tous les événements génétiques que nous venons d'énumérer (voir Figure 13)

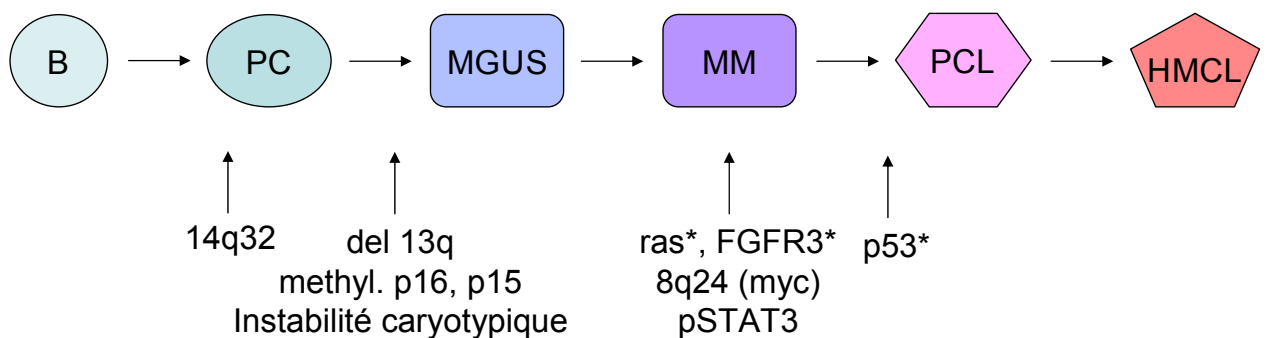


Figure 13 : Evénements moléculaires principaux observés au cours de la genèse du MM et de son évolution vers une leucémie à plasmocyte (PCL). (B : lymphocyte B ; PC : plasmocyte ; HMCL : lignée de MM ; del 13q : délétion du locus 13q14 ; méthyl. : méthylation du promoteur de p16 ou p15 ; pSTAT3 : phosphorylation de STAT3).

Ces anomalies caryotypiques et moléculaires contribuent à l'émergence du MM sont compatibles avec le concept que le MM naît de la transformation d'un plasmocyte à longue durée de vie, non proliférant mais capable de survivre longtemps. En effet, la grande majorité des oncogènes surexprimés par les translocations 14q32 du MM sont des gènes impliqués dans le cycle cellulaire plutôt que la survie (Bergsagel et Kuehl, 2001), contrairement au lymphome folliculaire où

l'événement caryotypique central conduit à la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

L'amélioration de la connaissance de la biologie du MM laisse espérer l'apparition de nouvelles armes thérapeutiques et donc l'allongement de la durée de la rémission.

2. cDNA arrays

Les cDNA arrays sont le fruit de la convergence des techniques de miniaturisation issues du monde informatique, des techniques de robotisation et du séquençage du génome humain. Grâce aux efforts de séquençage et d'analyse bioinformatique de la séquence de notre génome, il apparaît que le génome humain comporte au moins 35 000 gènes, vraisemblablement plus selon une lettre récente parue dans Cell (Hogenesch et al., 2001). Le principe de l'hybridation moléculaire de deux acides nucléiques complémentaires fut établi dès la description de la structure en double hélice de l'ADN. Ed Southern décrit en 1975 une technique permettant, à l'aide d'un acide nucléique radiomarqué, de détecter un acide nucléique attaché sur un support. Mais Southern Blots et Northern Blots n'explorent qu'un gène à la fois. Analyser les phénomènes biologiques complexes tels que les cancers en étudiant un gène à la fois paraît désormais dérisoire au regard du nombre des gènes qu'une cellule est susceptible d'utiliser. Le dépôt en parallèle de d'ADNc ou d'oligonucléotides sur un support de nylon ou de verre résout cet obstacle en permettant l'analyse simultanée de l'ARN messager de nombreux gènes. Le dépôt d'ADNc sur une membrane de nylon est appelée « macroarray » tandis que le dépôt d'ADNc ou la synthèse in situ d'oligonucléotides sur un support de verre de petite surface est appelée « microarray » ou puce à ADN (Lee et Hudson, 2000). On notera qu'on appelle classiquement « sonde » la puce elle-même, tandis que la « cible » est l'ARN du tissu étudié. Les applications qui découlent de ces techniques dépassent largement le cadre de la cancérologie et les puces à ADN vont profondément modifier la biologie et la médecine.

IV. Les différentes techniques de cDNA array

A) Macroarray

Le Southern blot fut la technique historique pour interroger un échantillon sur la présence d'un acide nucléique donné. Ensuite se développèrent des techniques permettant le criblage d'une banque de clones étalée sur une membrane. Puis on cribla des collections de clones ordonnées dans des microplaques de culture et

transférées sur une membrane de nylon, ce qui ouvrait la voie à des applications puissantes. Mais la mise en œuvre de ces expériences était lourde.

La robotisation fut le saut technologique qui permit le dépôt ordonné de centaines puis de milliers d'ADNc différents sur une membrane de nylon de quelques dizaines de centimètres carrés. Chaque ADNc est amplifié et purifié, en général à partir d'un plasmide maintenu dans un clone bactérien. Certaines membranes comme les membranes commerciales Atlas de Clontech comportent un nombre restreint de gènes appartenant à une catégorie fonctionnelle précise (apoptose, cycle cellulaire, cytokines, etc.), d'autres au contraire comprennent des milliers de gènes aux fonctions diverses, sur une surface en générale similaire, au détriment de la taille du dépôt. L'hybridation des macroarrays utilise des ADNc radioactifs obtenus par transcription reverse de l'ARN messenger en présence d'un nucléotide radiomarqué. Les ADNc radioactifs sont hybridés pendant la nuit puis la membrane est lavée par des solutions de plus en plus stringentes. La membrane est révélée par numérisation de la radioactivité au Phosphorimager ou par autoradiographie.

Les macroarrays ont initialement eu l'avantage d'une relative simplicité de fabrication, ainsi qu'une hybridation et une lecture facilitée par l'utilisation de la radioactivité comme marquage de la cible. Cependant les techniques qui permettent de fabriquer des microarrays par dépôt d'ADNc sont maintenant plus facilement abordables. La gestion des milliers de clones bactériens, des PCR et des purifications suppose une logistique lourde et ce problème est partagé entre les deux types de cDNA arrays. Un autre désavantage de la technique de macroarray est la surface importante d'hybridation, ce qui augmente de manière significative la quantité d'ARN nécessaire pour effectuer une hybridation (environ 100 µg d'ARN total). De plus, pour les membranes comportant plusieurs milliers d'ADNc différents, l'utilisation de la radioactivité (en particulier le phosphore 32) pose le problème d'une bavure des signaux sur les points adjacents (« bleeding »).

Au total cette technique offre certains avantages de fabrication et de lecture, mais ne peut plus aujourd'hui rivaliser avec les puces à ADN sur le nombre des gènes interrogés. Or c'est certainement ce dernier point, la possibilité de tester le plus grand nombre de gènes différents, qui est actuellement recherché dans les DNA arrays.

B) cDNA microarray

C'est l'équipe de Pat Brown et de Ron Davis de l'université de Stanford qui a été pionnière de cette technique (Schena et al., 1995). Sur un support de verre traité, d'aspect identique à la lamelle en verre utilisée en microscopie traditionnelle, sont déposés des milliers d'ADNc à l'aide d'un micropipetteur robotisé. Ces dépôts font environ 50 à 150 μ de diamètre et on peut typiquement déposer 10 000 ADNc différents sur une surface de 3,6 cm².

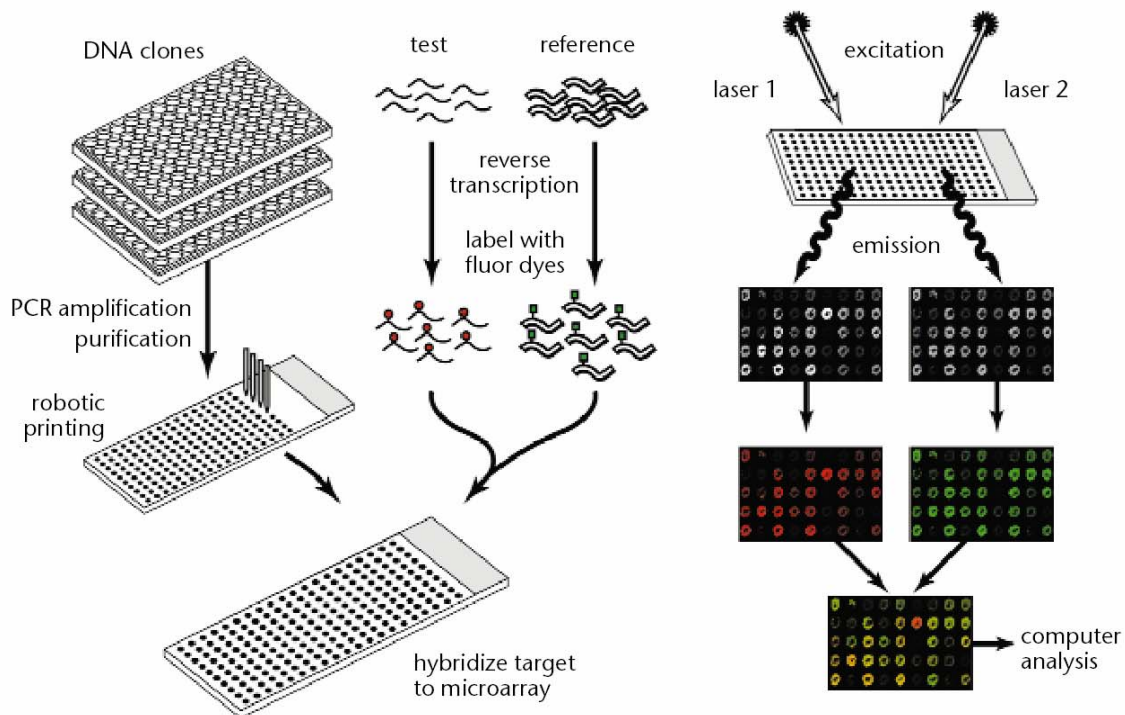


Figure 14 : Construction de puces à ADNc et hybridation compétitive avec un échantillon test et un échantillon de référence. (Duggan et al., 1999)

L'hybridation d'une puce à ADN de type cDNA microarray est effectuée par hybridation compétitive entre un ARN d'intérêt et un ARN de référence, celui-ci servant de contrôle interne. Chaque échantillon est marqué par un fluorophore différent (Cy-3 vert et CY-5 rouge). Dans une série d'expérience où l'on souhaite comparer des échantillons d'ARN entre eux, on utilisera dans chaque expérience un ARN de référence identique – en général un mélange d'ARN de tissus ou de lignées de différentes origines – et l'on comparera les rapports ARN d'intérêt/ARN de

référence entre eux plutôt que le signal absolu de fluorescence. Une telle approche permet de s'affranchir d'une certaine hétérogénéité dans le dépôt des ADNc et d'une variation dans l'intensité du marquage. Après hybridation simultanée des deux échantillons marqués, suivi de lavages, l'intensité du signal est mesurée par un scanner à laser, sur les deux longueurs d'onde. Le rapport de fluorescence rouge/vert est ainsi déterminé et permet de comparer les taux d'expression relatifs des gènes dans les deux échantillons d'ADNc. Un excès d'un gène donné dans l'échantillon marqué en rouge produira un signal rouge, un excès d'un gène dans l'échantillon marqué en vert produira un signal vert, tandis que l'expression équivalente d'un gène dans les deux échantillons produira un signal jaune.

Les puces produites par dépôt d'ADNc offrent une grande souplesse d'utilisation puisque l'on peut modifier à volonté le choix des gènes que l'on veut étudier. Bien que nécessitant certains investissements pour le micropipetteur robotisé et le scanner, les modalités de construction et de manipulation d'un système de type cDNA microarray est disponible sur Internet (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) et est accessible à toute équipe de recherche qui souhaite s'y consacrer. La préparation et l'optimisation de ces puces à ADN ne sont cependant pas simples car cela nécessite de gérer des milliers de clones bactériens, d'effectuer des milliers de PCR, de purifier les produits de PCR et de vérifier par séquençage la validité de chacun des clones utilisés.

C) Oligonucléotide microarray

En 1991, Fodor et collaborateurs de la Société Affymax (aujourd'hui Affymetrix) proposent une technique de synthèse d'oligonucléotides in situ sur support solide par photolithogravure, en empruntant la technologie qui avait permis à la microélectronique d'effectuer la révolution des microprocesseurs (Fodor et al., 1991). Dans ce procédé, la synthèse d'oligonucléotides, qui utilise la chimie phosphoramidite, est dirigée par un rayon lumineux qui déprotège les nucléotides d'une zone précise de la puce et les rends accessible à l'ajout d'une base supplémentaire (voir Figure 15 : procédé de synthèse in situ sur une puce oligonucléotide., ci-dessous). Pour effectuer la synthèse en parallèle de milliers d'oligonucléotides de 25 bases on procède à 100 étapes de synthèse, c'est à dire 25 cycles de synthèse des quatre nucléotides qui composent l'ADN. A chaque étape, le

rayon lumineux dirigé par un masque de photolithogravure détermine si une base doit être ajoutée ou non en un point déterminé de la puce. Chaque élément de la puce est un carré de 20 µm X 20 µm contenant plus de 10⁷ copies d'un oligonucléotide donné. La surface d'une puce est d'environ 1,6 cm² et peut contenir 400 000 oligonucléotides différents (Lockhart et al., 1996). Les brevets de cette technologie ont été pris par la société Affymetrix, qui est la seule à commercialiser des puces à oligonucléotides obtenues par photolithogravure.

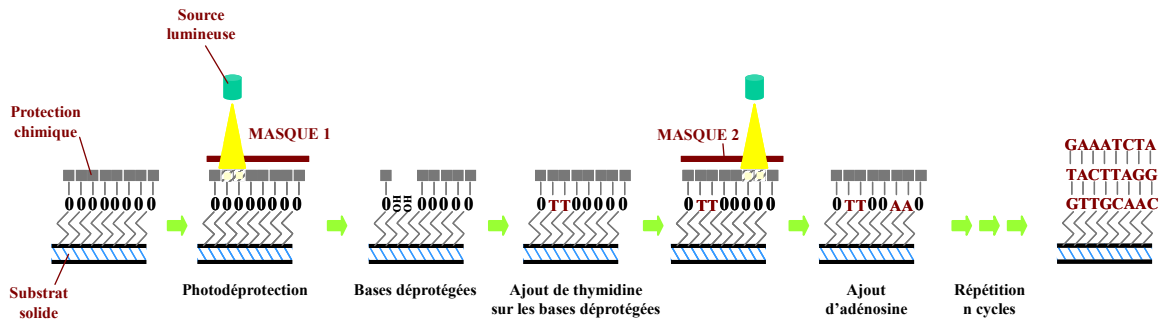


Figure 15 : procédé de synthèse in situ sur une puce oligonucléotide.

La longueur de l'oligonucléotide est limitée par le nombre d'étapes d'addition de nucléotides que l'on peut effectuer tout en conservant un nombre limité d'erreur. Dans la technique de photolithogravure 25 bases semble être un maximum puisque cela nécessite 100 étapes différentes et que l'on ne peut augmenter ce nombre sans dépasser un pourcentage d'erreur intolérable.

Initialement une des applications majeures des puces oligonucléotides devait être le séquençage (Lipshutz et al., 1999), mais les progrès du séquençage de masse par les techniques classiques ont focalisé l'utilisation des puces à oligonucléotides vers la mesure de l'expression des gènes, domaine où les microarrays restent irremplaçables (Lockhart et al., 1996). Afin d'obtenir une information d'hybridation la plus spécifique possible malgré une longueur de l'oligo relativement faible, les puces Affymetrix analysent l'expression d'un ARNm par 40 oligonucléotides différents (voir Figure 16, ci-dessous), 20 dont la séquence est parfaitement complémentaire de l'ARN cible (« perfect match ») et 20 dont la séquence diffère de l'ARN cible d'une base (« mismatch ») (Lockhart et al., 1996).

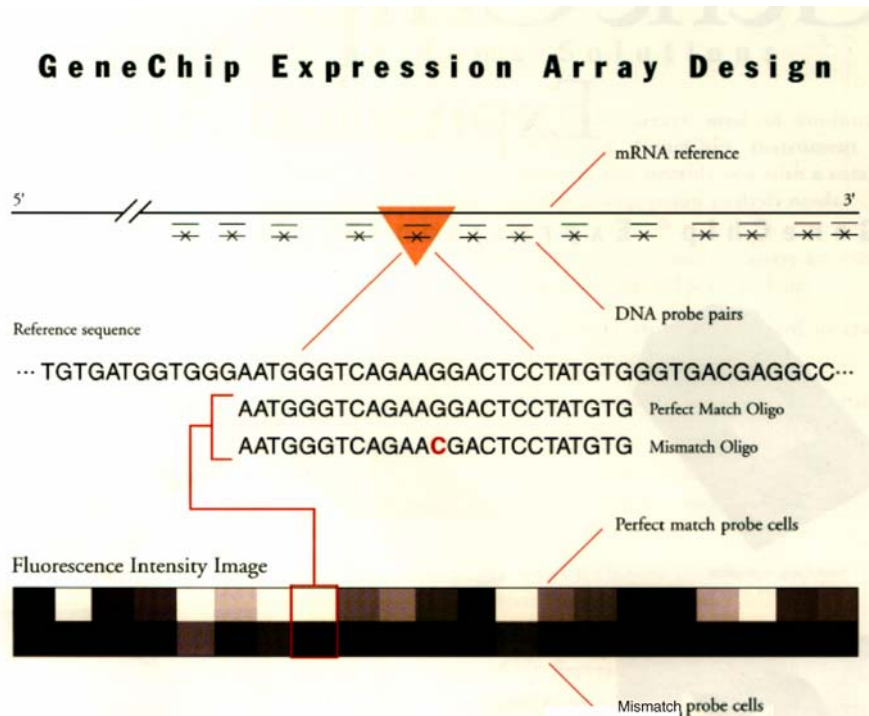


Figure 16 : choix des séquences des oligonucléotides pour couvrir un ARN messenger dans une puce Affymetrix : 20 oligonucléotides différents de séquence parfaitement complémentaire de l'ARN cible (« perfect match ») et 20 oligonucléotides dont la séquence diffère de l'ARN cible d'une base (« mismatch »).

Pour l'analyse de l'expression de gènes, l'ARN total est transformé en ADNc, avec incorporation du promoteur de la T7 ARN Polymérase (voir Figure 17). Une polymérase transforme cet ADNc simple brin en ADNc double brin. Celui-ci est alors

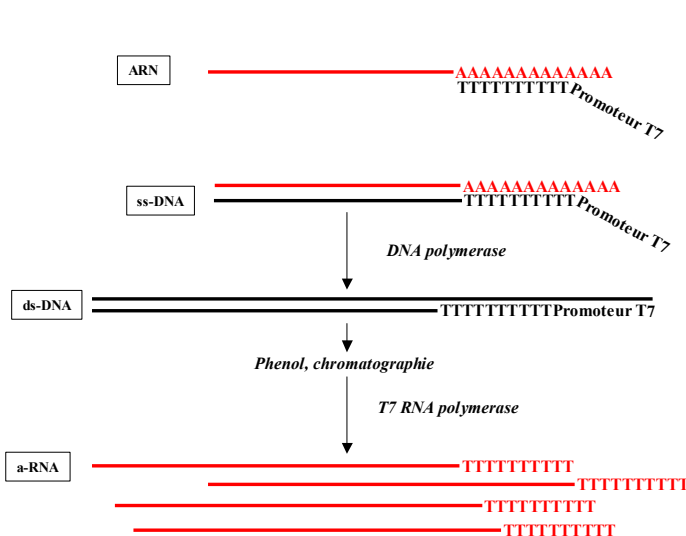


Figure 17 : Méthode d'amplification linéaire et de marquage des ARNc.

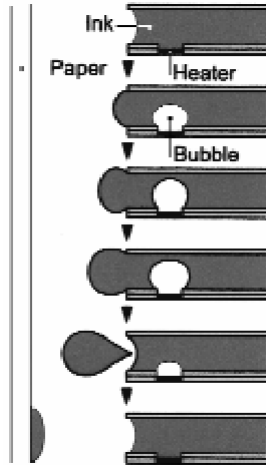
transcrit en ARN grâce à la T7 ARN Polymérase en présence de nucléotides biotinylés. Cette combinaison d'étapes permet une amplification du signal d'un facteur 100 à 1000, et permet une synthèse de sonde à partir de 5 µg d'ARN total seulement. L'hybridation est conduite dans un très petit volume dans une station d'hybridation spécifique. Elle est suivie par un

marquage par de la streptavidine couplée à la phycoérythrine. Après lavage, la fluorescence de la puce est lue grâce à un scanner à laser. La présence d'un mismatch permet de s'assurer de l'absence d'hybridation non spécifique : tout couple d'oligonucléotide dont l'hybridation du mismatch est plus intense que le perfect match est éliminé. Un algorithme développé par Affymetrix permet de calculer à partir de l'ensemble des 40 unités d'hybridations d'un gène une valeur (« average difference ») qui est proportionnelle à la quantité d'ARN cible dans la solution de départ. Cette valeur, d'unité arbitraire, est considérée comme une représentation de la valeur absolue de l'expression d'un gène dans un échantillon donnée et peut être comparée à celle mesurée dans d'autres échantillons sans nécessiter un ARN de référence, à la différence du système des cDNA microarrays. Les comparaisons des résultats obtenus dans différentes équipes sont donc facilitées. La démonstration de la fiabilité du système pour la mesure simultanée du niveau d'expression de très nombreux ARN fut publiée en 1996 (Lockhart et al., 1996).

Cependant plusieurs limites de cette méthodologie sont évoquées. Le système de masque pour la photolithographie est lourd et onéreux : il ne peut être mis en place que dans le cadre d'un projet industriel de grande envergure, il n'est pas flexible et ne permet pas de faire des puces « à façon », et les puces ainsi produites sont chères. De plus l'étape d'amplification proposée par Affymetrix pourrait introduire un biais en permettant l'amplification préférentielle de certains ARN. A ces deux remarques on peut répondre que le prix de ces puces a nettement baissé depuis la mise en vente des premiers exemplaires et qu'un biais dans l'étape d'amplification n'a pour le moment pas été mis en évidence. La plus grande réserve est sans aucun doute la longueur de l'oligonucléotide qui est limitée à 25 dans la technique de photolithographie. Bien qu'un oligonucléotide court (20-25 bases) offre théoriquement la plus grande discrimination entre deux séquences apparentées, des travaux récents viennent de démontrer qu'un oligonucléotide court lié à un substrat solide par une de ses extrémités présentait des propriétés d'hybridation médiocres en raison d'une gêne stérique (Shchepinov et al., 1997; Hughes et al., 2001). Certains chercheurs ont proposé d'ajouter des « spacers » entre le substrat et la séquence oligonucléotidique, ce « spacer » pouvant être par exemple une séquence poly-dT. Il s'avère que le « spacer » le plus judicieux est la partie de la séquence du gène étudié qui est directement adjacente à l'oligonucléotide initialement choisi.

Autrement dit, il est plus adéquat de choisir un oligonucléotide plus long que 25 bases.

La technique qui a permis la synthèse in situ d'oligonucléotides plus long que 25 bases est la technique de jet d'encre (Okamoto et al., 2000;



Hughes et al., 2001). Ici encore c'est une technologie du domaine de l'informatique qui a été empruntée par la biologie moléculaire. Comme pour les puces Affymetrix, il s'agit d'une synthèse in situ d'oligonucléotide qui utilise la chimie phosphoramidite. Mais l'adressage spatial est déterminé ici par le dépôt d'une gouttelette d'un nucléotide délivré par une buse à jet d'encre. La tête « d'impression » comportant quatre buses, une pour chacun des quatre nucléotides, chaque base de l'oligonucléotide ne nécessite qu'un passage de la tête d'impression et donc une seule réaction chimique. On diminue ainsi par quatre le nombre d'étape nécessaire pour synthétiser un oligonucléotide, ce qui ouvre la voie à l'utilisation d'oligonucléotides plus longs. De plus, par rapport à la technique des cDNA microarrays, la technique de jet d'encre

Figure 18 : Dépôt d'une solution d'ADN par technique de jet d'encre [Okamoto, 2000 #2318].

permet un dépôt très régulier et mieux calibré que les micropipetteurs robotisés. Par rapport aux oligonucléotides arrays Affymetrix, le jet d'encre apporte une grande souplesse d'utilisation : chaque puce peut être différente de la précédente.

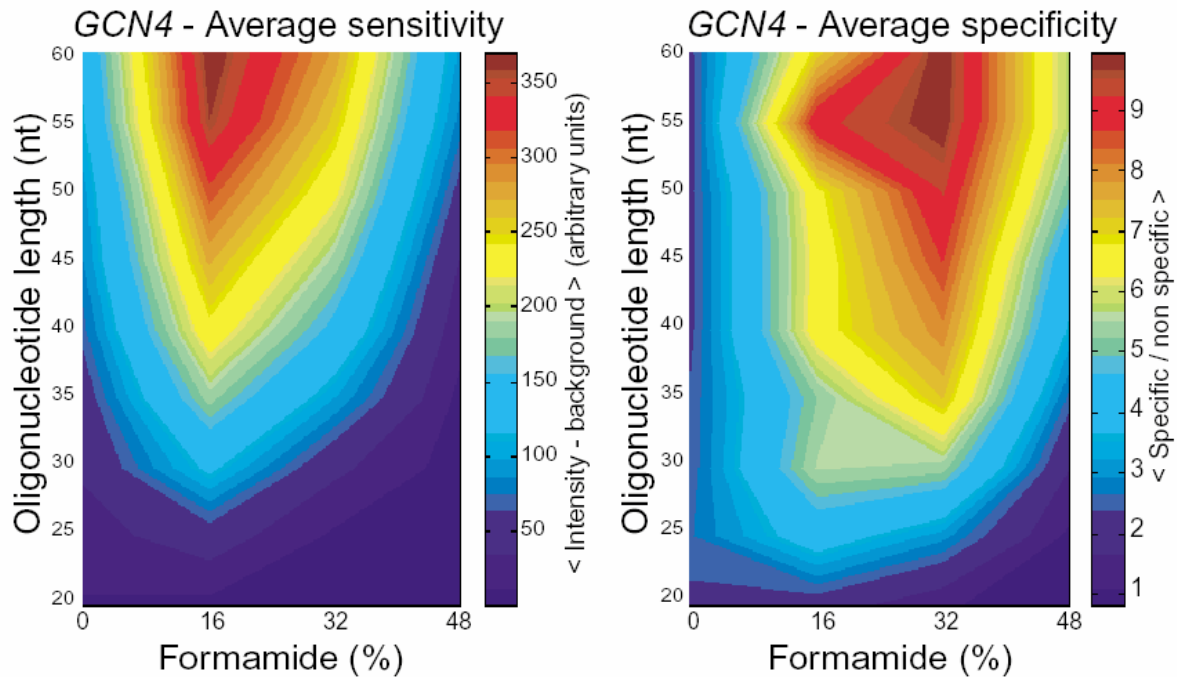


Figure 19 : Etude de la sensibilité et de la spécificité du signal sur une puce à ADN en fonction de la longueur de l'oligonucléotide (Hughes et al., 2001).

Le développement de cette technologie a permis l'étude précise de l'impact de la longueur de l'oligonucléotide sur la qualité de l'hybridation. Comme le montre la Figure 19, le travail de Hughes et al. montre qu'une longueur de 60 bases est optimale pour assurer la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité possible. Les auteurs ont également quantifié l'impact des délétions et des mismatch dans la spécificité de l'hybridation. Ils observent qu'à partir de douze mismatch répartis au hasard dans un oligonucléotide de 60 bases, l'intensité de l'hybridation est identique à celle du bruit de fond : toute spécificité est perdue. Mais l'impact d'un mismatch ou d'une délétion dans l'oligonucléotide sur la qualité de l'hybridation dépend de la position de cette altération par rapport à l'extrémité de l'oligonucléotide qui est attaché au support. Les auteurs observent que c'est la partie la plus éloignée du substrat qui détermine au maximum la spécificité. Par exemple, pour faire chuter le signal d'hybridation de 50%, il faut en moyenne 5 mismatches répartis au hasard dans un oligonucléotide de 60 bases. Mais un seul mismatch, s'il est situé à 10 bases de l'extrémité libre, diminuera le signal également de 50%. Les 25 bases proposées par la technologie d'Affymetrix semblent donc loin d'être optimales et l'avenir pourrait bien appartenir aux puces à oligonucléotides par synthèse avec la technologie à jet d'encre puisqu'elles réunissent les qualités de sensibilité, de spécificité, de flexibilité

et de coût raisonnable. Il reste cependant à l'avantage de la technologie Affymetrix l'utilisation pour l'analyse de chaque ARNm d'un ensemble de 20 perfect match et de 20 mismatch, ce qui, nous l'avons déjà remarqué, dispense de l'utilisation d'un ARN de référence, et compense en partie le manque de sensibilité et de spécificité de chaque oligonucléotide de 25 bases pris isolément.

D) Techniques apparentées

(1) SAGE

Le SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) est une technique de mesure de l'expression des gènes à large échelle mais qui ne fait pas partie à proprement parler de la technique des puces à ADN. Les résultats obtenus sont cependant du même ordre que ceux offerts par les puces à ADN et il est important de citer cette technique dans une description des cDNA arrays. La technique a été développée dans le laboratoire de Kinzler en 1995 et a été décrite dans *Science* (Velculescu et al., 1995). Très brièvement, une ingénieuse série de manipulations permettent, à partir de l'ARNm cellulaire, d'obtenir des concatémères de 14 paires de base (appelés Tags) qui correspondent aux 14 pdb situées à une position spécifique de l'extrémité 3' de l'ARNm. Ces concatémères sont séquencés et chaque Tag dénombré. Un Tag est spécifique d'un ARNm donné, et le nombre de copie d'un Tag est proportionnel à la concentration de cet ARNm dans le tissu étudié. Il s'agit donc d'une technique unique parce que d'une part elle donne une valeur absolue sur l'expression d'un gène dans un échantillon et d'autre part elle fournit le niveau d'expression de la quasi totalité des gènes qu'ils soient connus ou non. Les puces à ADN nécessitent au contraire la connaissance de chacun des gènes dont on veut examiner le niveau d'expression. Des publications importantes ont utilisé cette technique dans l'exploration de la différenciation du monocyte en cellule dendritique, du cancer du colon ou de la néoangiogenèse observée dans le cancer du colon. (Hashimoto et al., 1999; Zhang et al., 1997; St Croix et al., 2000).

(2) Protein chip

L'accomplissement du séquençage de génomes complets, et l'apparition de techniques telles que les puces à ADN, a amené la communauté scientifique à définir de nouvelles expressions : l'ensemble des ARN messagers d'une cellule est appelé le **transcriptome**, l'ensemble des protéines d'une cellule est appelé le **protéome**, et

l'ensemble des voies métaboliques d'une cellule le **métabolome** (Delneri et al., 2001).

Bien que l'intérêt des puces à ADN est évident dans l'analyse de l'expression des gènes, elles ne nous fournissent qu'une estimation indirecte de la quantité des protéines qui sont synthétisées à partir des ARNm, et ne nous apprennent rien sur les modifications post-traductionnelles, ni sur les activités de ces protéines, ni sur les interactions protéines-protéines. Pour ces raisons, plusieurs équipes travaillent sur la mise au point de puces à protéines (Irving et Hudson, 2000). La **puce à protéine ou protein chip** explore simultanément les propriétés de l'ensemble des protéines d'une cellule. Une démonstration convaincante de la protein chip a été publiée récemment dans la revue Nature (Zhu et al., 2001). Les auteurs ont cloné 5800 ORFs de la levure, les ont surexprimés dans la levure puis les ont purifiés, avant de les déposer sur une lamelle de verre pour constituer une puce à protéine. Cette puce a été utilisée pour identifier des interactions protéines-protéines ou protéines-phospholipides, permettant d'identifier avec succès un groupe de protéines se liant à la calmoduline et des protéines liant des phosphatidyl-inositols phosphorylés. Cette technique présente des avantages par rapport aux techniques existantes : les banques d'expression sont souvent incomplètes et les séquences parfois amputées ; la technique du double hybride repose sur une interaction qui a lieu dans le noyau, ce qui limite le type d'interaction qui peut-être détecté.

On peut élargir la définition de la puce à protéine aux techniques qui consistent à imprimer sur le support de verre des collections soit de petites molécules, soit d'anticorps, soit de phages, soit d'ADN et qui viennent interroger cette puce avec une protéine marquée par un fluorophore (de Wildt et al., 2000; Irving et Hudson, 2000).

Finalement on peut imaginer toutes les combinaisons possibles entre deux partenaires dont on veut connaître l'interaction : le premier est inconnu mais appartient à une collection de molécules fixées sur un support de verre (« la puce ») et le second étant connu, marqué par un fluorophore et vient hybrider la puce. Il peut s'agir de collection de protéines, de petites molécules, d'anticorps, de phages ou bien d'ADN (voir Figure 20). Par exemple une puce à ADN représentant des séquences promotrices pourrait être hybridée avec un facteur de transcription marqué pour identifier en une expérience quel(s) promoteur(s) parmi des milliers ce facteur de transcription peut lier. A l'inverse il est concevable d'hybrider une puce à protéines avec une molécule d'ADN marquée dont la séquence correspond à une

motif présent dans le promoteur de plusieurs gènes dont l'expression est co-régulée afin d'identifier les protéines qui se lient à cette séquence ADN.

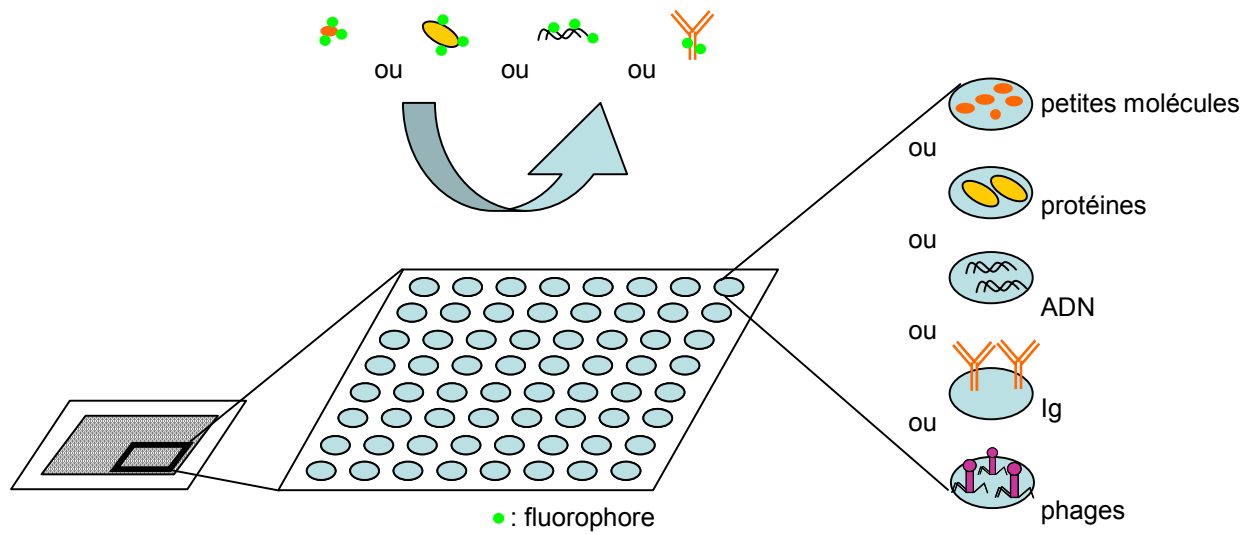


Figure 20 : toutes les combinaisons sont imaginables entre une puce à ADN, à protéine, à anticorps, à petite molécule ou à phage, et une « sonde », marquée par un fluorochrome, qui peut-être de l'ADN, une protéine, un anticorps ou une petite molécule.

(3) Cell chip

Une autre manière d'étudier la fonction de milliers de protéines en parallèle est la « puce à cellule » ou microarray of cells. Dans cette technique on dépose en parallèle sur une lamelle de verre des milliers d'ADNc, sous forme de plasmides dans une solution aqueuse de gélatine (Ziauddin et Sabatini, 2001). Les lames sont séchées, couvertes par un lipide cationique pour favoriser la transfection, puis on couvre la puce par des cellules adhérentes dans leur milieu de culture. Après 2-3 divisions cellulaires on obtient une lamelle de verre couverte de milliers de petites colonies cellulaires, chacune transfectée par un ADNc différent. Les auteurs ont appliqué leur méthode à l'identification de cibles médicamenteuses ou l'identification d'altérations de la phosphorylation protéique, de l'apoptose ou de l'adhésion cellulaire induites par l'expression de divers gènes.

V. Les applications des cDNA arrays

A) Séquençage et analyse du polymorphisme de l'ADN génomique

Une des premières applications envisagées par les puces à oligonucléotides fut le séquençage (Fodor et al., 1991). Le séquençage par puces repose sur des puces à oligonucléotides « universelles » qui sont des collections d'oligonucléotides de taille n (typiquement huit) qui couvrent toute les séquences possibles de n nucléotides (Hacia, 1999). En théorie une telle puce peut séquencer n'importe quel morceau d'ADN puisque toutes les séquences complémentaires de cet ADN sont présentes sur la puce. Des algorithmes informatiques permettent de reconstruire la séquence du morceau d'ADN examiné en fonction des oligonucléotides qui ont été hybridés. En pratique cette technique s'est heurtée à des problèmes de spécificité d'hybridation – en particulier à cause de la longueur réduite de l'oligo (cf. discussion dans le paragraphe p 99) – et au problème des séquences d'ADN répétées. De plus le développement du séquençage de masse par des techniques conventionnelles a rendu cette approche caduque pour le séquençage du génome.

Mais si le séquençage par puce a été abandonné, le séquençage de portions d'ADN connues pour la recherche des mutations et des polymorphismes est devenu une application majeure des puces à oligonucléotides (Hacia, 1999). En 1996, le laboratoire Affymetrix publiait l'analyse du polymorphisme de l'ensemble des 16,6 kilobases du génome mitochondrial humain par une puce à oligonucléotides comportant 135 000 sondes de 25 paires de base (Chee et al., 1996). La résolution était de l'ordre du nucléotide. La technique exploite la haute spécificité de la puce à oligonucléotide capable de discriminer une complémentarité parfaite d'une complémentarité incomplète causée par une paire de base non appariée. Dans le génome, les SNPs (single nucleotide polymorphisms) sont des nucléotides pour lequel un polymorphisme significatif entre différents individus a été observé. L'identification des SNPs bénéficie également de l'utilisation de puces oligonucléotides (Winzeler et al., 1998). L'enjeu est de taille puisque l'analyse des SNPs devrait aboutir à l'essor de la **médecine prédictive** : on pourra lier tel SNP à la prédisposition à telle pathologie. L'analyse de notre patrimoine génétique est aujourd'hui encore un test biologique lourd, restreint à quelques gènes seulement. Demain, pour le meilleur ou pour le pire, on pourra par hybridation d'une seule puce

à ADN, géotyper chez un sujet des milliers de SNPs (Lindblad-Toh et al., 2000b). D'autres applications pratiques comportent l'étude des liaisons génétiques, la caractérisation d'anomalies cytogénétiques y compris les mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur. Par exemple, la société Affymetrix fournit une puce spécialement dédiée à l'analyse des mutations de la protéine p53. L'analyse de 108 tumeurs ovariennes avec ces puces, et une comparaison avec les techniques conventionnelles de séquençage, montre une sensibilité des puces oligonucléotides de 92% et une spécificité de 100%, ce qui est sensiblement supérieur à la technique par séquençage mais beaucoup plus simple à mettre en application (Wen et al., 2000). Par ailleurs on sait que dans une cellule cancéreuse de nombreuses régions génomiques comportant un gène suppresseur de tumeur perdent une des deux copies du gène, l'autre copie étant selon la théorie de Knudson inactivée par mutation. La perte d'une copie d'un gène s'accompagne d'une perte de l'hétérozygotie de cette zone du génome, phénomène appelé L.O.H. (loss of heterozygosity). Des puces oligonucléotides couvrant un grand nombre de SNPs permettent de détecter des L.O.H. dans les cellules cancéreuses en dehors de la connaissance préalable de ces gènes suppresseurs de tumeurs (Mei et al., 2000; Lindblad-Toh et al., 2000a).

La puce à oligonucléotides devrait donc rapidement permettre la mise en pratique en routine de l'analyse du polymorphisme génomique d'un individu ou d'un clone tumoral.

B) Exploration du transcriptome

L'analyse du transcriptome par les puces à ADN offre aujourd'hui une approche nouvelle de la biologie. Les puces à ADN ont permis de développer une approche qui n'est pas basée sur des hypothèses et offre l'opportunité unique de repenser les grandes questions de la biologie avec un regard neuf et exempt d'à priori (Brown et Botstein, 1999). Par ailleurs la puce à ADN fournit un moyen puissant pour appréhender le système biologique complexe que constitue la cellule.

Les premières expériences d'analyse de l'expression des gènes par puces à ADN se sont intéressées à la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont le génome venait alors d'être séquencé, permettant ainsi l'analyse de la totalité des 6400 gènes environ que comporte ce organisme (DeRisi et al., 1997). La bonne connaissance du

génomique et de la quasi totalité des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'analyser l'ensemble du transcriptome au cours de modifications du métabolisme, du cycle ou de la méiose (DeRisi et al., 1997; Cho et al., 1998; Primig et al., 2000).

Les applications sont très variées et le nombre exponentiel des publications utilisant la technique des puces à ADN en atteste. La technique a été appliquée à divers organismes tels que les bactéries (*Escherichia coli*) (Ochman et Jones, 2000), le ver *Caenorhabditis elegans* (Jiang et al., 2001), la drosophile (Furlong et al., 2001), la souris (Devireddy et al., 2001) et bien sûr l'homme. On peut détailler plusieurs publications majeures qui utilisent la technique des puces. L'équipe de Lander a étudié la transduction du signal au niveau du transcriptome dans des fibroblastes NIH3T3 par plusieurs récepteurs de cytokine (Fambrough et al., 1999). De manière surprenante, les auteurs découvrent que la stimulation de fibroblastes par diverses cytokines, y compris si les récepteurs de ces cytokines sont mutés au niveau de certaines de leur tyrosines intracellulaires, donnent des altérations du transcriptome très similaires entre elles, soulignant la redondance des cytokines entre elles, ainsi que la redondance des voies de signalisation qui sont activées en aval d'un récepteur de cytokine. Pat Brown a appliqué sa technique des cDNA microarrays à l'étude de la réponse des fibroblastes au sérum, qui est un modèle classique d'induction du cycle cellulaire (Iyer et al., 1999). L'analyse du transcriptome sur douze points étalés sur 24 heures montre l'induction de nombreux gènes du cycle cellulaire (ce qui valide l'expérience), mais également l'induction d'un certain nombre d'autres gènes en particulier des gènes impliqués dans la cicatrisation, la néoangiogénèse et le recrutement de cellules du système immunitaire. En situation physiologique, un fibroblaste n'est mis en contact avec du sérum *in vivo* que dans le contexte d'une plaie (le sérum est la résultante de la coagulation du sang). Le fibroblaste interprète ce contact comme un signal de cicatrisation qui est bien plus complexe que le simple démarrage du cycle cellulaire. Cet exemple illustre bien un des avantages de la technique des puces qui est d'examiner l'expression d'un ensemble de gènes très large et donc non biaisé par un choix de l'expérimentateur, ce qui peut amener à des conclusions inattendues au départ. L'équipe de Levine a étudié la réponse à l'induction du facteur de transcription p53 dans une lignée de cancer du colon exprimant la forme sauvage de p53 en aval d'un promoteur inducible par le zinc (Zhao et al., 2000). Ils observent l'induction de p21, cible

classique de p53, mais également l'induction de 106 autres gènes et la répression de 54 gènes, transformant ainsi notre connaissance de la biologie de p53.

C) Transcriptome des cellules cancéreuses

Il est bien établi que la tumorigénèse est un processus multi étape et correspond à l'altération successive de plusieurs gènes différents au sein d'une cellule initialement normale, et amène des changements d'expression de gènes bien plus complexes que l'on ne le croyait initialement lorsque furent clonés les premiers oncogènes. Le cancer est donc un domaine d'application exemplaire pour l'utilisation des puces à ADN, et devrait permettre de mieux comprendre les événements moléculaires qui accompagnent la transformation d'une cellule normale en une cellule maligne. Il est devenu possible de comparer, grâce aux puces à ADN, le transcriptome d'un tissu sain avec son équivalent cancéreux (Alizadeh et al., 2000). De plus, les cliniciens ont observé depuis longtemps que des cancers d'une même histologie sont en réalité souvent hétérogènes et recouvrent des tumeurs au pronostic très différent. Plusieurs auteurs ont suggéré qu'une nouvelle classification, plus fine, pourrait être établie en utilisant l'information fournie par l'expression de milliers de gènes différents : les puces à ADN pourraient transformer la taxonomie des cancers en apportant une classification moléculaire qui permettrait de mieux appréhender la physiopathologie des différents sous-groupes de tumeurs et d'offrir des paramètres pronostics plus fiables (DeRisi et al., 1996; Khan et al., 1998). La comparaison d'échantillons tumoraux par puce à ADN met en évidence l'existence de sous groupes moléculaires de tumeurs au sein d'une histologie que l'on croyait unique, et les sous-groupes peuvent présenter des profils d'expression proches de certains tissus normaux (« signatures »). On a ainsi pu reclasser quelques types de cancer en fonction de leur transcriptome, et dans certains cas associer une signature particulière avec un pronostic clinique. Alizadeh et al. ont ainsi comparé des ARN de différents types de lymphomes et de différents échantillons de lymphocytes normaux, activés ou non, et ont établi qu'au sein des lymphomes à grande cellule (DLBCL) qui constituent histologiquement une entité homogène on pouvait définir deux grands groupes que les auteurs ont nommé « germinal centre B-like DLBCL » et « activated B-like DLBCL » selon que le profil d'expression des tumeurs était plus proche du lymphocyte B germinal ou du lymphocyte B activé (Alizadeh et al., 2000).

L'observation que l'appartenance au groupe « activated B-like DLBCL » était un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patients atteints de DLBCL démontre que l'analyse moléculaire d'un cancer par puce à ADN pouvait identifier un sous-groupe à risque là où les techniques classiques d'histologie ne montraient qu'un groupe homogène. Golub et al. ont choisi d'étudier les leucémies aiguës pour déterminer une approche mathématique pour la découverte de classes de cancer et pour l'attribution d'un échantillon aux classes ainsi définies (Golub et al., 1999). En analysant à l'aveugle 38 échantillons de leucémie aiguë, les auteurs ont retrouvé la dichotomie LAM/LAL. Ils ont alors défini les 50 gènes les plus discriminants entre les grandes classes de leucémie aiguë et ont formulé un « prédicteur » basé sur ces 50 gènes, qui permet de déterminer à quelle classe un échantillon appartient. Une classification des tumeurs a également été proposée pour le cancer du sein, qui retrouve par une analyse sur 8102 gènes les sous-groupes déjà connus exprimant soit le récepteur aux oestrogènes soit le récepteur ErbB2, mais également un nouveau sous-groupe caractérisé par l'expression de gènes caractéristiques des cellules épithéliales basales qui exprime fortement les kératines 5 et 17 (Perou et al., 2000). Une autre étude s'est intéressée aux mutations de BRCA1 et BRCA2 dans le cancer du sein. En comparant l'expression de 5361 gènes dans les cellules tumorales primaires de 7 échantillons de cancer du sein de femmes porteuses d'une mutation sur BRCA1, 7 échantillons de cancer du sein de femmes porteuses d'une mutation sur BRCA2 et 7 échantillons de cancer du sein sporadique, les auteurs montrent par une analyse multi variée que les profils d'expression génique de ces trois groupes diffèrent significativement entre (Hedenfalk et al., 2001). Ils établissent une liste de 176 gènes qui sont significativement différents entre les tumeurs avec mutation BRCA1 et les tumeurs avec mutation BRCA2, ce qui suggère fortement que ces deux groupes de tumeurs sont fonctionnellement différents. Cette différence moléculaire marquée est surprenante à plus d'un titre car les mutations sont observées sur deux gènes qui ont une séquence proche l'une de l'autre, car ces deux mutations conduisent à une prédisposition importante de cancer du sein ou de l'ovaire et parce que l'histologie ne permettait pas de différencier ces deux sous-groupes.

Les mécanismes moléculaires qui gouvernent les phénomènes de métastase ont également été appréhendés par puce à ADN. Clark et al. ont comparé par oligonucléotide microarrays des lignées de mélanome avec un clone obtenu après

une sélection in vivo dans la souris nude pour être hautement métastatique (Clark et al., 2000). Parmi les gènes différentiellement exprimés, trois sont constamment augmentés dans les clones hautement métastatique, dans toutes les métastases analysées : la fibronectine, RhoC et la thymosine β 4. Pour RhoC, qui est un membre des GTPases, les auteurs montrent que la surexpression de ce gène suffit pour augmenter significativement le pouvoir métastatique d'une lignée de cancer, suggérant que la surexpression de RhoC est une des causes possibles d'un pouvoir métastasant d'un cancer.

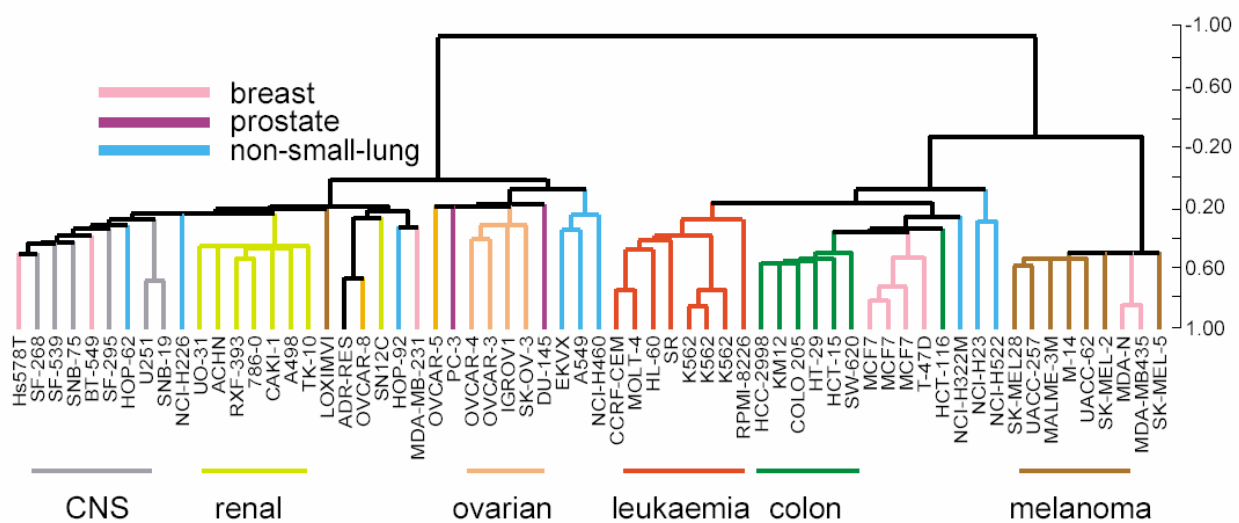


Figure 21 : classement par hierarchical clustering de 60 lignées de cancer [Ross, 2000 #2082].

Une autre validation de l'analyse du cancer par des puces à ADN a été apportée par un travail qui a comparé le profil d'expression de 8000 gènes dans les 60 lignées de cellules cancéreuses qui sont utilisées par le National Cancer Institute des Etats-Unis pour le criblage des médicaments anti-cancéreux. Lorsque l'on ordonne ce panel de lignées de cancers de différents tissus selon leur profil d'expression par la technique du hierarchical clustering (cf. p 121), les échantillons se regroupent selon leur tissu d'origine : on distingue le groupe des lignées de cancer du colon, de mélanome, de cancer du rein, etc. (Ross et al., 2000). Ces groupes de lignées se distinguent par des profils d'expression particulier, par exemple les lignées de mélanome surexpriment un groupe de 90 gènes comportant

des gènes jouant un rôle connu dans la biologie du mélanocyte, comme la tyrosinase, MART1 ou S100- β . Une exception notable était la présence des deux lignées MDA, obtenues à partir d'un épanchement pleural et d'un ganglion d'une patiente présentant un cancer du sein, dans le groupe des lignées de mélanome et partageant avec celui-ci l'expression des gènes « mélanocytes ». Cette observation ouvre la possibilité que cette patiente était atteinte à la fois d'un adénocarcinome du sein et d'un mélanome occulte, métastasé, lequel serait à l'origine des deux lignées MDA. Il est à noter que la lignée de myélome RPMI8226 se localise tout naturellement dans le groupe des néoplasies d'origine hématopoïétique, à une certaine distance cependant des lignées leucémiques HL60 ou K562.

Les puces à ADN vont rapidement transformer notre compréhension du cancer en proposant une vue d'ensemble des changements qui amène une cellule à devenir cancéreuse, et d'autre part elles vont permettre de classer les cancers beaucoup plus finement ce qui aura des implications pronostiques et thérapeutiques essentielles.

D) Transcriptome et traitement anticancéreux

Une autre application de la technique d'analyse du transcriptome par puces à ADN est d'aider au développement des traitements, en particulier celui du traitement du cancer : compréhension des mécanismes d'action au niveau moléculaire des traitements anticancéreux, criblage de nouvelles molécules, établissement de critères pronostiques de réponse au traitement permettant d'offrir aux patients des traitements plus ciblés.

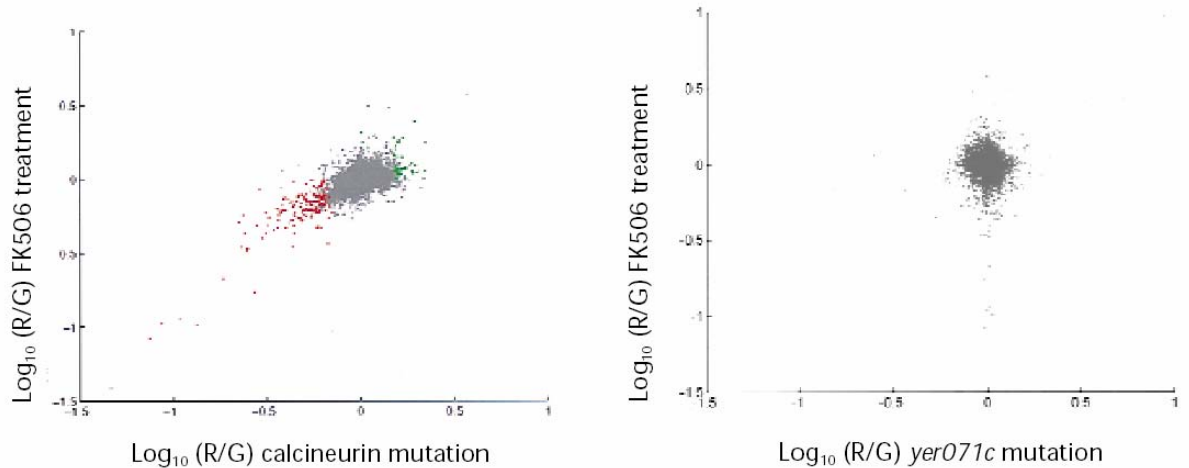


Figure 22 : la comparaison du profil d'expression d'une souche de levure traitée avec du FK506 et une souche dont le gène de la calcineurine est muté montre une altération similaire de l'expression des gènes. En revanche il n'y a pas de corrélation entre le profil d'expression du traitement par FK506 et celui d'une mutation d'un gène choisi au hasard (*yer071c*). Les valeurs sont exprimées comme le rapport (log base 10) de la fluorescence de l'ARN étudié (R) par rapport à un ARN de référence (G). (Marton et al., 1998)

Marton et al. ont illustré les possibilités des cDNA microarrays pour valider ou identifier le mode d'action d'un médicament au niveau moléculaire (Marton et al., 1998). Les auteurs partent du principe qu'un médicament idéal est une molécule capable d'inhiber totalement et spécifiquement une cible moléculaire, de façon à ce que cette cible soit fonctionnellement absente. Ils ont pris comme modèle les molécules FK506 et ciclosporine, médicaments utilisés comme immunosuppresseurs chez l'homme et dont le mode d'action principal est l'inhibition de la calcineurine chez tous les eucaryotes. La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase impliquée dans la signalisation calcique. Elle est très conservée dans le monde animal et elle est présente de la levure à l'homme. L'analyse d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* soumise à un traitement par FK506 mets en évidence 36 gènes dont l'expression a changé de plus de deux fois par rapport à la même souche sans traitement. En comparant ce profil d'expression à celui d'une souche de levure traitée par ciclosporine ou d'une souche de levure mutante dont les deux sous unités de la calcineurine ont été délétées, on constate un profil d'expression très similaire avec une corrélation statistiquement significative entre les trois profils d'expression « traitement par FK506 », « traitement par ciclosporine » et mutant calcineurine^{-/-}. Une telle corrélation n'est pas retrouvée avec les profils d'expression de quarante

souches de levure mutées pour des gènes pris au hasard. Les auteurs démontrent également que le profil d'expression d'une levure traitée par un médicament est très différent si cette levure est mutée pour le gène qui est la cible de ce médicament. Par exemple, le profil d'expression d'une levure sauvage traitée par FK506 est très différent de la levure calcineurine^{-/-} traitée par FK506. C'est une seconde façon de montrer par puce à ADN que la calcineurine est une cible du FK506.

La même équipe va plus loin dans un article majeur du jeune domaine des puces à ADN en publiant dans Cell une approche par « Compendium » pour l'analyse fonctionnelle de molécules biologiquement actives et des gènes (Hughes et al., 2000). Le « Compendium » est une base de donnée de plus de 300 profils d'expression couvrant la totalité du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* soumise à divers traitements chimiques ou mutée pour divers gènes. Après une analyse par « hierarchical clustering » (cf. chapitre « Techniques d'analyse des données », p 121), le profil d'expression d'un médicament est classé à côté du mutant pour lequel la cible du médicament a été invalidée : par exemple le profil transcriptionnel du traitement par la lovastatin est très proche de celui de celui du mutant HMG-CoA réductase qui est sa cible, de même que les profils d'expression après traitement par l'itraconazole et le mutant de la cible de l'itraconazole, erg11.

Les applications de ces concepts, démontrées chez la levure, à l'homme seront nombreuses et majeures. Une approche, que les grands groupes pharmaceutiques sont sans doute déjà en train d'implémenter, est d'établir une vaste banque de donnée (« Compendium ») d'expression de gène (un nombre maximal de gènes, dans un avenir proche tous les gènes humains), dans un grand nombre d'échantillons : tissus normaux, tissus tumoraux, et surtout lignées cellulaires traitées par des médicaments de référence et lignées cellulaires chez lesquelles on a pu établir des délétions homozygotes d'un gène donné. Ce Compendium doit alors permettre d'aider à établir le mécanisme d'action d'une nouvelle molécule si son profil d'expression ressemble en tout ou en partie à celui obtenu dans un autre échantillon. On peut aussi émettre l'hypothèse qu'une telle approche permettra de mieux cerner les effets secondaires d'une molécule en mettant en relief des effets sur l'expression d'un groupe de gènes en dehors de sa cible principale.

Pour tenter de comprendre le mécanisme d'action d'une molécule thérapeutique on peut examiner la corrélation entre le niveau d'expression d'un gène et la sensibilité d'une lignée cellulaire à un produit de chimiothérapie (Scherf et al.,

2000). Disposant du profil d'expression de 8000 gènes dans 60 lignées de divers cancers (cf. la liste des ces lignées dans la Figure 21) et de la sensibilité des ces 60 lignées à 118 produits de chimiothérapie, Scherf et al montrent que l'on peut retrouver un lien statistique entre l'efficacité d'un produit et l'expression de certains gènes (Scherf et al., 2000). Ils observent par exemple une corrélation significative entre l'expression de la dihydropyrimidine dehydrogénase (DPYD), dont l'activité est limitante dans le catabolisme du 5-fluorouracile (5-FU), et la résistance d'une lignée cellulaire au 5-FU. De même, il existe une corrélation inverse entre l'expression de l'asparagine synthétase (ASNS) et la sensibilité à la L-asparaginase. On sait que la L-asparaginase n'est toxique que lorsqu'une cellule est dépourvue d'asparagine synthétase et repose sur l'asparagine extérieure à la cellule pour son métabolisme. Ces deux observations valident le modèle et permettent d'envisager : (1) de trouver une corrélation entre l'expression d'un ou de plusieurs gènes et l'efficacité d'action d'une nouvelle molécule thérapeutique pour tenter de mieux cerner son mécanisme d'action ; (2) de tenter de prédire la sensibilité d'une tumeur à un produit de chimiothérapie : par exemple en cas de surexpression de la ASNS, une tumeur aura toutes les chances d'être résistante à la L-asparaginase et l'on pourra épargner au patient un traitement de chimiothérapie inutile et toxique.

Dans le cancer, les puces à ADN vont aussi permettre d'identifier les gènes clefs qui sont surexprimés dans chaque type de cancer, ce qui désignera ces gènes comme une cible idéale pour développer un traitement anticancéreux le plus spécifique possible.

Enfin les puces à ADN sont un outil d'avenir pour déterminer le pronostic d'une tumeur, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent (cf. p111).

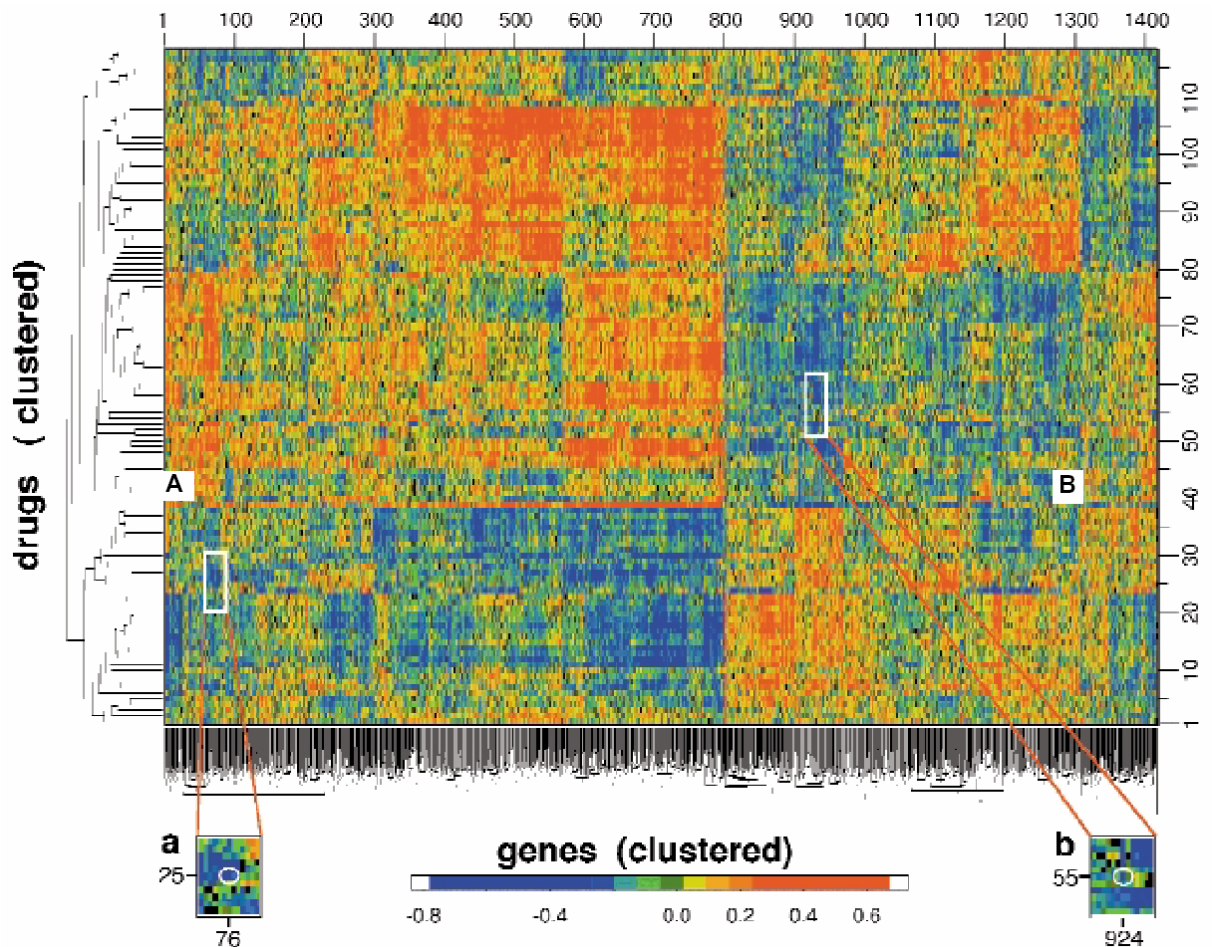


Figure 23 : Matrices des coefficients de corrélations (coefficient de corrélation de Pearson) entre une molécule de chimiothérapie (« drugs (clustered) ») et l'expression d'un gène (« genes (clustered) »). Ce tableau explore la corrélation qui existe, pour un gène donné et une molécule donnée, (l'intersection entre les deux entrées du tableau) entre le niveau d'expression de ce gène et la sensibilité à cette molécule pour chacune des 60 lignées de cancer étudiées. Cette matrice est représentée par un « hierarchical clustering » qui représente le coefficient de corrélation selon un code de couleur (absence de corrélation : vert ; corrélation inverse : bleu ; corrélation positive : orange) et rapproche entre eux les gènes ainsi que les molécules de chimiothérapie qui ont un profil similaire. L'encart (a) illustre la corrélation inverse qui existe entre l'expression de la DPYD et la sensibilité au 5-FU, l'encart (b) la corrélation inverse entre expression de ASNS et sensibilité à la L-asparaginase (voir le texte). (Scherf et al., 2000)

E) Mesure du nombre de copie d'ADN

Des amplifications géniques sont un mécanisme fréquemment impliqué dans la cancérogenèse, par exemple l'amplification du gène de la cycline D1 ou de ErbB2 dans le cancer du sein. A l'inverse certaines parties du génome sont fréquemment

délétées dans certains cancers car elles comportent des gènes suppresseurs de tumeur, par exemple la région 13q14 autour du gène Rb dont une copie est classiquement délétée dans le rétinoblastome. L'équipe de Pat Brown a proposé l'utilisation des cDNA microarrays pour mesurer des variations du nombre de copie d'un grand nombre de gène (pollack 1999). En hybridant concomitamment de l'ADN d'un tissu normal (par exemple les cellules mononuclées du sang) et de l'ADN d'un échantillon tumoral, marqués par deux fluorophores différents (Cy3 et Cy5 respectivement), une amplification génique dans l'échantillon tumoral apparaîtra rouge (Cy5), une délétion verte (Cy3) et un nombre de copies d'ADN normal jaune (Cy3 + Cy5). Cette technique est un équivalent de la CGH (comparative genomic hybridization) mais la résolution est bien meilleure.

F) Détermination des gènes et de leur fonction

Le séquençage du génome humain a été une contribution majeure à la biologie, mais ne s'est pas traduit d'emblée par la connaissance de l'ensemble des gènes qui gouvernent la biologie de l'être humain. En effet, la liste des gènes publiée par chacune des deux équipes qui a séquencé indépendamment le génome humain n'est pas complète (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Une lettre publiée récemment dans la revue *Cell* démontre que les 29 000 gènes proposés par le consortium Ensembl et les quelques 39 000 gènes proposés par Celera ne se recoupent que pour 15 000 gènes, ce qui laisse plus de 25 000 gènes décrits par une seule équipe à la fois (Hogenesch et al., 2001). Ceci est d'ailleurs à rapprocher du chiffre initialement avancé, de 35 000 à 140 000 gènes pour le génome humain (Ewing et Green, 2000; Dunham et al., 1999; Liang et al., 2000). Pour identifier plus précisément l'ensemble des gènes d'un organisme, il a été proposé d'établir une liste de gènes potentiels à l'aide d'algorithmes informatiques moins restrictifs, et de vérifier au sein de ces gènes potentiels quels gènes sont effectivement exprimés. Cette méthode a été appliquée avec succès dans le ver *Caenorhabditis elegans* (Reboul et al., 2001). Pour l'homme, Schoemaker et al. de la société Rosetta ont franchi une première étape dans ce sens (Shoemaker et al., 2001). Constatant que l'établissement d'un catalogue précis et exhaustif des ARN messagers ne peut-être obtenu par annotation informatique seule mais nécessite une validation expérimentale à l'échelle du génome, les auteurs ont analysé par puce oligonucléotide l'expression des 8183 exons du chromosome 22 qui avaient été

décrits par le consortium Ensembl en 1999 (Dunham et al., 1999) dans 69 tissus normaux ou cancéreux. Les exons qui sont contigus sur le génome et qui sont co-régulés c'est à dire exprimés en même temps dans les mêmes tissus font selon toute évidence partie du même gène. Cette technique permet de vérifier les gènes connus, dans certains cas invalide certains exons car ils ne sont pas exprimés de manière coordonnée avec les autres exons du gène, dans d'autre cas fusionne deux gènes en un seul. Cette technique permet également de vérifier l'expression de gènes qui n'avaient pour le moment jamais été identifiés que sur support informatique comme le gène AF324466 cité en exemple et qui comporte six exons co-exprimés uniquement dans le tissu testiculaire. Enfin les auteurs utilisent la puce à oligonucléotide pour analyser la structure exacte d'un gène en identifiant très précisément la partie de l'ADN génomique qui est exprimé : visualisation au nucléotide près de chaque exon. L'extension de cette technique à l'ensemble des exons déjà décrits et aux exons probables fournis par des algorithmes de prédiction de gène comme Genescan nous apporteront le catalogue de tous nos gènes, et donc la puce « Génome ». Une approche similaire a été utilisée pour étudier l'expression de l'ARN chez *Escherichia coli* grâce à une puce à ADN qui couvre le génome entier de la bactérie avec une résolution de 6 paires de bases dans les régions intergéniques et 60 paires de bases pour les 4290 ORFs (Selinger et al., 2000). Là aussi les auteurs soulignent que la technique devra permettre d'identifier les splicing alternatifs et les régions de transcription qui ont été ratées par les algorithmes de prédiction d'ORF.

Les puces à ADN nous permettrons également d'appréhender la fonction de ces milliers de nouveaux gènes que nous apporte le séquençage du génome humain. Dans l'approche « Compendium » proposée par Hughes et al. (Hughes et al., 2000), la comparaison des profils d'expression de gènes de différents échantillons qui ont soit un gène invalidé ou qui ont été traités par différents médicament peut permettre de comprendre la fonction d'un gène (voir p 116). Les auteurs identifient ainsi dans la levure la fonction de l'ORF YER044c, jusque là non caractérisé. En effet, le profil d'expression de la souche de levure mutante pour YER044c se co-localise avec les profils d'autres souches déficientes pour des gènes intervenant dans la synthèse des ergostérols. Les auteurs démontrent ensuite par des analyses biochimiques conventionnelles qu'effectivement YER044c, renommé ERG28, joue un rôle dans la biosynthèse des ergostérols.

VI. Techniques d'analyse des données

Les puces à ADN fournissent d'abondantes quantités de données, et ce déluge d'information est un défi d'un nouvel ordre pour le biologiste. Seule l'informatique permet d'envisager l'analyse des tables de données ainsi générées. Des outils informatiques ont été développés, en particulier pour l'analyse d'étude d'expression, et nous en donnerons une brève description ci-dessous.

A) Hierarchical clustering

Les données fournies par les cDNA arrays constituent un tableau où les colonnes représentent les échantillons et des lignes représentent les gènes. Le clustering permet d'identifier des groupes d'échantillons et des groupes de gènes qui ont un profil d'expression semblable. Il existe plusieurs manières d'exprimer mathématiquement la similarité. Dans leur travail fondateur de l'application du clustering aux puces à ADN, Eisen et al. ont suggéré que le coefficient de corrélation (les auteurs proposent une formule proche du coefficient de corrélation de Pearson) était bien adapté à la biologie parce que cette mesure rapproche deux séries de valeurs si elles ont une « forme » similaire et ne prend pas en compte l'intensité du signal (Eisen et al., 1998). Le clustering groupe entre eux les gènes qui ont le profil d'expression le plus proche parmi différents échantillons, et groupe entre eux les échantillons qui ont le profil d'expression le plus proche parmi différents gènes. Mais le classement des gènes n'en rend moins difficile la lecture de ces listes de plusieurs milliers de gènes. Eisen et al. ont donc développé un logiciel, Treeview, permettant de visualiser ces résultats sous la forme d'une matrice colorée. Chaque point est représenté par une couleur qui est fonction du niveau d'expression : une valeur égale à la médiane des valeurs d'un gène est représentée en noir, une valeur supérieure à la médiane est représentée en rouge, et en vert si la valeur est inférieure à la médiane. La saturation de la couleur est proportionnelle à l'intensité de l'expression. De plus, la similarité entre deux gènes ou échantillons est représentée par un arbre dont la longueur de chaque branche est proportionnelle à la distance entre deux points, à la manière des arbres de comparaisons de séquences d'ADN. Ce type de représentation est appelé hierarchical clustering. Pour illustrer leur technique, les auteurs ont utilisé les données d'expression de gène dans des fibroblastes stimulés par du sérum de veau foetal (SVF), mesurés à différents temps après stimulation

(Eisen et al., 1998). Comme il s'agit de plusieurs mesures d'un même échantillon au cours du temps, seuls les gènes ont été classés par clustering, l'ordre des échantillons dans la représentation graphique est resté l'ordre chronologique.

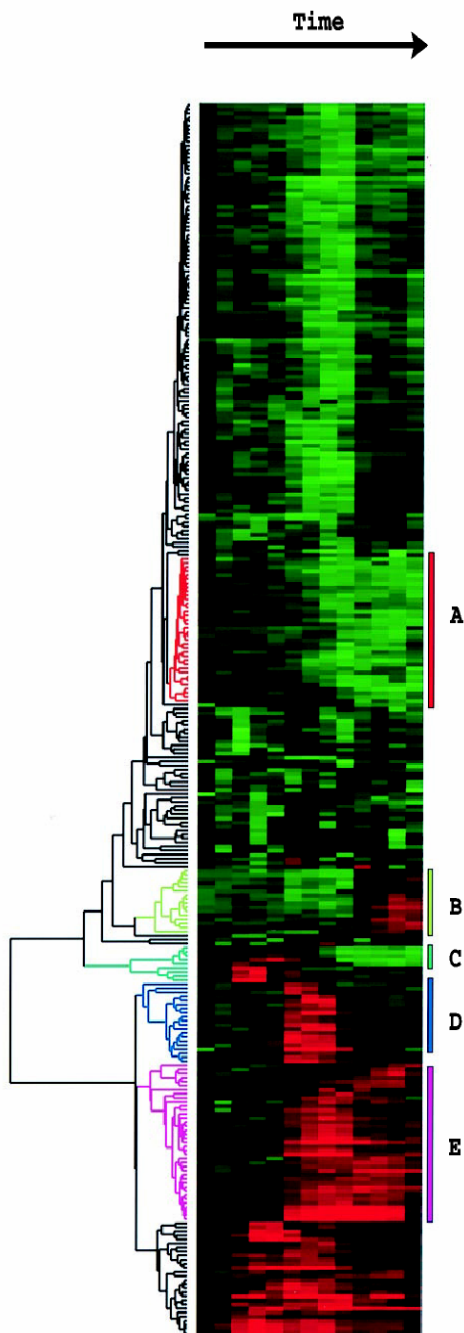


Figure 24 : Hierarchical clustering visualisé par Treeview sur des données issues d'une expérience de stimulation de fibroblastes humains par du SVF. Les échantillons ont été prélevés aux temps 0, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h et 24h. Ces résultats ont été obtenus par des puces à ADN permettant d'évaluer environ 8600 gènes différents. [Eisen, 1998 #2080]

La Figure 24 montre la présence de blocs (« cluster » en anglais) homogènes de couleur, qui correspondent à des groupes de gènes au profil d'expression similaire. Par exemple le cluster E est un ensemble de gènes dont l'expression est induite par le SVF, le cluster B est un groupe de gènes induits par le SVF mais très tardivement, tandis que le cluster A est un groupe de gènes dont l'expression est réprimée par le SVF. Les exemples d'application de cette technique sont nombreux et on peut citer la classification d'expression de gènes de lymphomes à grandes cellules (Alizadeh et al., 2000), l'analyse de la fonction de gènes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* par l'approche compendium (cf. p 116) (Hughes et al., 2000), ou encore la comparaison de 60 lignées de différents tissus (cf. p 113) (Ross et al., 2000).

B) SOM

Le hierarchical clustering souffre cependant de plusieurs défauts. L'arbre phylogénique qui relie les branches une à une est bien adapté lorsqu'il existe une véritable hiérarchie entre les différents points analysés tels que l'évolution des espèces, mais ne peut pas refléter la relation complexe de ressemblance et de dissemblance entre

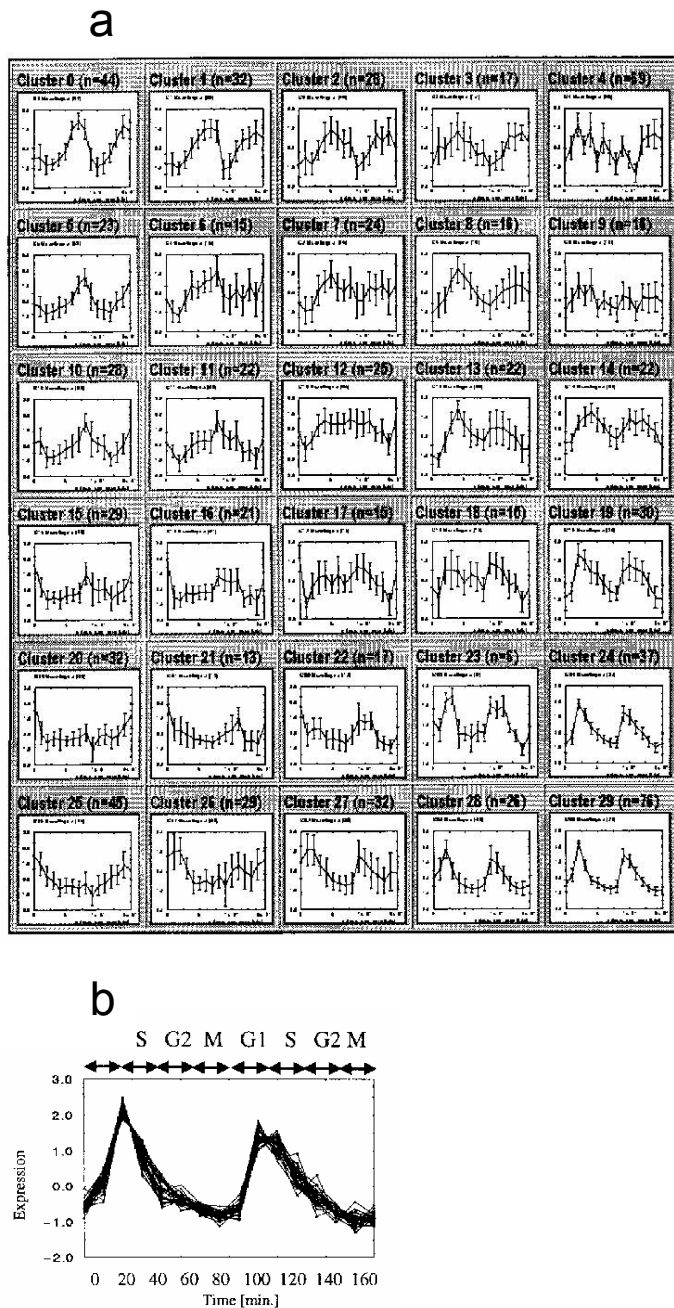


Figure 25 : a. Analyse du cycle cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en classant par SOM 6×5 l'expression de 828 gènes. b. Détail du cluster 29 qui contient 79 gènes ayant un pic d'expression maximal à la fin de G1. [Tamayo, 1999 #2465]

profils d'expression de gènes (Tamayo et al., 1999). Ce problème est exacerbé lorsque le nombre des échantillons et de gènes augmente. De plus il a été rapporté par les mathématiciens que le hierarchical clustering manque de robustesse.

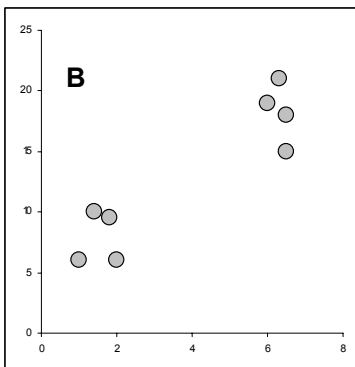
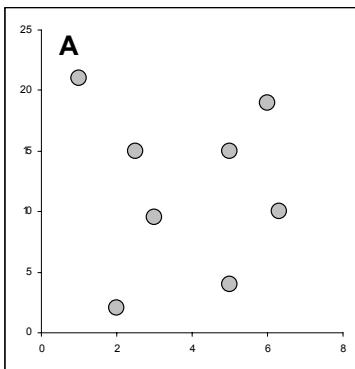
Plusieurs équipes ont proposé les SOM (self-organizing maps) comme alternative (Tamayo et al., 1999; Toronen et al., 1999). Cette technique est intéressante au stade exploratoire de l'analyse des données d'expression de gènes, et offre l'avantage de n'imposer à l'avance qu'un cadre peu rigide, à l'inverse du hierarchical clustering qui impose une structure hiérarchique très rigide, tout en conservant une visualisation aisée des données. Les SOMs sont construites en définissant au départ une grille de « nœuds », par exemple 6×5

dans l'exemple cité ci-contre, dans un espace à k dimensions, où k est le nombre de gènes analysés. Suivent alors des étapes de déplacement des nœuds dans l'espace vers les groupes de gènes les plus proches, selon un processus répétitif comportant habituellement entre 20 000 et 50 000 itérations. Le résultat final est une grille où

chaque case contient des gènes au profil d'expression similaire et où les cases adjacentes ont des profils apparentés (Tamayo et al., 1999).

L'analyse du cycle cellulaire illustrée ici est séduisante, mais le reproche qui est fait à la technique est d'imposer à chaque gène d'être obligatoirement attribué à une case, et d'imposer une grille de départ arbitraire qui va conditionner le résultat final de l'analyse. Très peu d'articles utilisant cette méthode d'analyse ont finalement été publiés, bien qu'elle reste fréquemment citée en référence dans le domaine de l'analyse de l'expression de gènes.

C) Analyse en composante principale



Lorsqu'une série d'échantillons n'a que deux caractères différents x et y , il est facile de représenter ces données sur un graphique plan où chaque échantillon est représenté par un point de coordonnées x_i et y_i . L'examen de l'allure du nuage permet d'étudier les distances entre les échantillons : absence de liaison (A), groupes homogènes (B) (voir figure ci-contre). Si le nombre n de caractères est supérieur à 2, chaque échantillon est un point dans un espace à n dimensions et la projection des échantillons sur un plan à deux dimensions ne donne qu'une information partielle sur les liens qui existent entre les échantillons. L'analyse en composante principale (ACP) consiste à changer d'axes de coordonnées de façon à ce que les premières coordonnées intègrent le maximum d'information sur les distances entre échantillons. Par exemple, nous

avons représenté 2762 gènes, mesurés dans 17 échantillons (12 échantillons de MM et 5 échantillons de plasmocytes générés in vitro), dans un plan à deux dimensions, dont le premier axe décrit 17,4% de la distance entre échantillons et le deuxième 15,7% : voir Figure 26 : Analyse en composante principale. L'on observe que l'analyse par ACP présente à gauche et en bas des gènes "myélomateux", et à droite en haut des gènes typiquement surexprimés dans des plasmocytes générés in vitro. Au centre sont situés des gènes dont la valeur est proche de zéro sur les deux nouveaux axes.

L'application de cette technique aux puces à ADN a été illustrée de manière très didactique par Raychaudhuri et al. (Raychaudhuri et al., 2000) en analysant des données publiquement accessibles via le net analysant la sporulation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Chu et al., 1998).

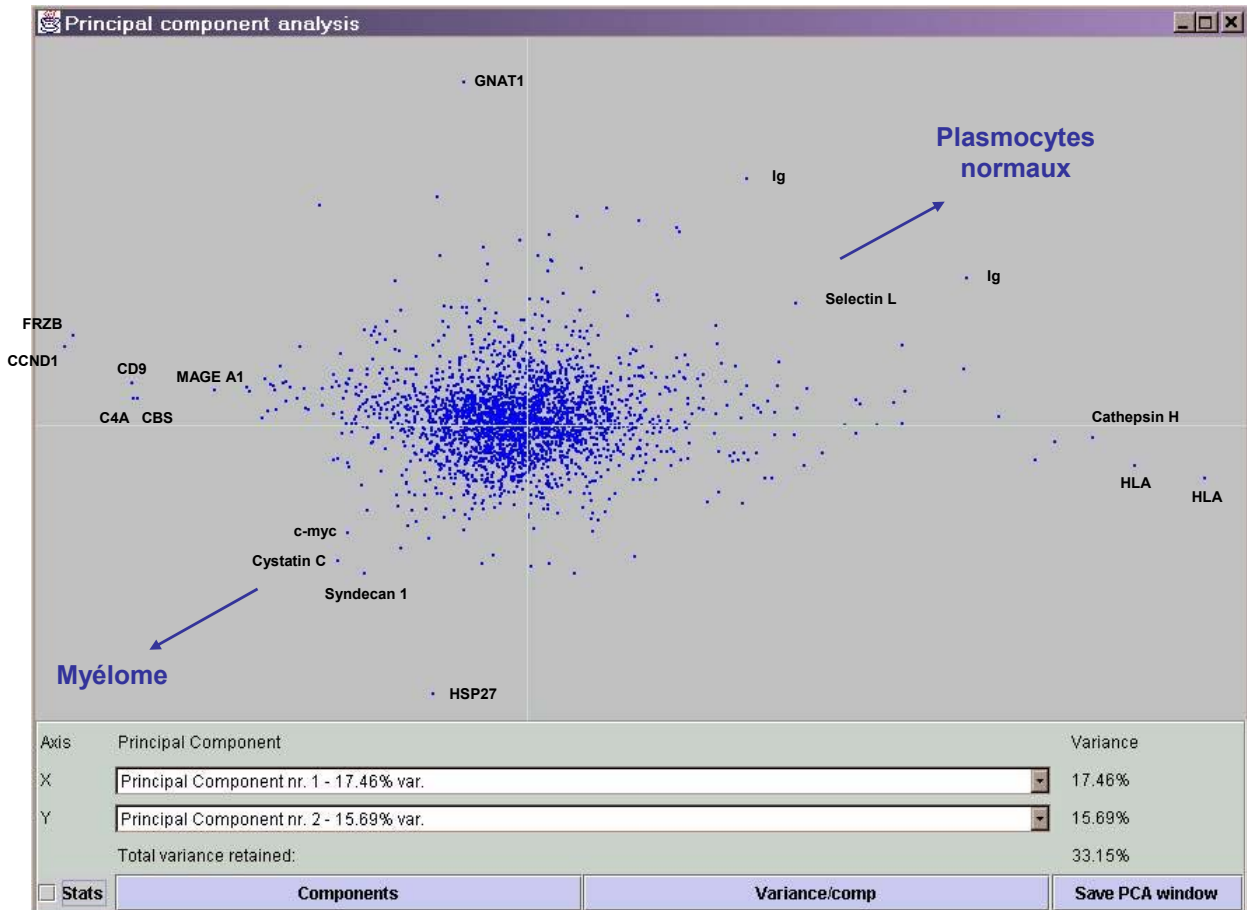


Figure 26 : Analyse en composant principale

Analyse en composante principale de l'expression de 2762 gènes dans 17 échantillons différents (12 MM et 5 PPC). Les valeurs de 7071 gènes ont été transformées en log base 2 et centrées sur la médiane, puis sélectionnées sur le critère d'une déviation standard supérieure à 0,8 avec le logiciel Cluster. L'analyse en composante principale a été effectuée avec le logiciel JExpress (<http://www.ii.uib.no/~bjarted/jexpress/>).

D) Autres techniques

Citons l'approche de « découvertes de classe » et de « prédiction de classe » développée par Golub et al. pour diviser un groupe d'échantillon en sous-groupes statistiquement différents et ensuite d'attribuer tout nouvel échantillon à l'un de ces groupes (Golub et al., 1999). Cette technique a été appliquée avec succès aux leucémies aiguës et a permis de redécouvrir la dichotomie entre leucémies aiguës myéloblastiques et lymphoblastiques.

On peut également utiliser des ANNs (artificial neural networks) pour la classification de résultats de puces à ADN. Les ANNs sont des algorithmes informatiques basés sur la structure et le comportement du cerveau humain et sont capables de reconnaître et de catégoriser des données complexes. Ils procèdent en minimisant les erreurs grâce à une aptitude à l'apprentissage. Les ANNs ont été appliqués à l'analyse des arythmies sur un tracé d'électrocardiogramme, dans l'interprétation des IRM, et viennent d'être appliqués au domaine des puces à ADN dans la classification de tumeurs pédiatriques (Khan et al., 2001).

E) Test statistiques conventionnels

Cependant, ces trois types d'analyse, hierarchical clustering, SOM et PCA ont le défaut de ne pas introduire de signification statistique dans la visualisation des résultats. Tous les gènes seront inclus dans l'analyse finale, et aucune limite ne sera tracée entre des gènes d'expression significativement différente entre deux groupes d'échantillons et des gènes dont l'expression ne varie pas significativement. Il a été proposé une technique de clustering qui définit des cluster de gènes comportant un critère de qualité, mais l'application pratique de cette technique manque encore (Heyer et al., 1999).

Il s'avère qu'un moyen très simple de définir des groupes de gènes avec des critères de signification statistique est l'utilisation des outils statistiques « classiques » pour la plupart développé il y a une cinquantaine d'années : comparaison de moyenne par test de Student, tests non paramétrique comme le test de Mann-Whitney. Ces tests ont été utilisés par l'équipe de Trent, par exemple dans leur étude des mutations de BRCA1 et BRCA2 dans le cancer du sein (Hedenfalk et al., 2001). Nous les avons utilisé pour les comparaisons entre transcriptomes de plasmocytes normaux et tumoraux (voir **articles 8 et 9**, p 240 et p 240). Ces tests

statistiques n'apportent pas de visualisation particulière des résultats, mais il est possible d'utiliser le logiciel Treeview développé par Eisen pour obtenir une représentation graphique des groupes de gènes statistiquement significatifs (voir **article 9**, p 240).

F) Autres analyses : vers les réseaux génétiques et protéiques

Les techniques mentionnées ci-dessus se sont focalisées sur l'identification de gènes dont l'expression est co-régulée dans un tissu ou d'un cancer. Mais d'autres analyses sont possibles, permettant de mieux caractériser la fonction des promoteurs des gènes et des protéines:

- identification de séquences communes en amont des gènes dont l'expression est co-régulée ; l'analyse du promoteur de groupes de gènes exprimés dans les mêmes échantillons peut permettre d'identifier des séquences régulatrices sur l'ADN qui expliquent les profils d'expression observés, et permet ensuite de prédire à partir de la séquence d'un promoteur d'un nouveau gène son expression dans les différents types cellulaires (Chu et al., 1998).

- identification de la fonction d'une protéine. Des gènes qui participent à un même processus biologique doivent avoir une expression coordonnée. C'est pourquoi il a été proposé d'attribuer à une protéine dont la fonction est encore inconnue un rôle dans un processus biologique si elle partage un profil d'expression avec un groupe de protéines à la fonction déjà connue. C'est le principe de « guilt-by-association » (Chu et al., 1998 ; Lockhart et Winzeler, 2000).

- analyse des réseaux protéiques : la compilation de l'analyse des différents génomes déjà connus (pour la plupart des bactéries), des données d'expression acquise par puces à ADN, en association avec les données de la littérature scientifique, permet, grâce à de puissants algorithmes informatiques d'envisager la prédiction du rôle et des partenaires de l'ensemble des protéines, ce qui permet de dessiner le réseau fonctionnel des protéines de la cellule. Le lecteur pourra lire avec intérêt la revue consacrée à ce thème par Eisenberg et collègues (Eisenberg et al., 2000).

Le croisement de ces différentes bases de données pourra permettre d'esquisser le réseau d'interaction et de régulation que tissent les gènes/protéines entre eux dans la cellule. Le but ultime de cette connaissance de la cellule à l'échelle du génome, du transcriptome et du protéome sera la modélisation informatique de la biologie de la cellule.

G) Les filtres : s'affranchir du bruit de fond

Dans ce chapitre consacré aux techniques d'analyse des données d'expression des gènes, il est également important de rappeler qu'un filtre préalable des données obtenues est nécessaire. Il est important en effet de ne pas prendre en compte dans l'analyse des gènes dont le niveau d'expression est situé dans le bruit de fond, sous peine de diluer les gènes intéressants dans la masse des gènes qui ne varient guère et surtout sous peine d'inclure dans les gènes significatifs des gènes dont les variations tiennent du bruit de fond mais dont le profil ressemble à celui de certains groupes de gènes avec une signification biologique. C'est pourquoi un filtre est généralement utilisé, qui élimine les gènes dont l'expression dans une majorité d'échantillons a une valeur trop proche du bruit de fond ou bien élimine les gènes qui varient insuffisamment entre les différents échantillons (voir par exemple (Ross et al., 2000)).

Les puces à oligonucléotides interrogent l'expression d'un gène par 40 oligonucléotides différents. La différence entre l'intensité d'hybridation du perfect match et celle du mismatch permet déjà d'éliminer les gènes où un signal non spécifique prédomine (mismatch > perfect match). Mais cette information complexe peut-être exploitée encore plus finement ainsi que l'illustre une publication récente en particulier pour éliminer les valeurs artéfactuelles ou les valeurs trop près du bruit de fond (Li et Wong, 2001).

H) Mise en commun des données: bases de données publiques

Les bases de données informatiques des séquences d'ADN séquencées par l'ensemble de la communauté scientifique, consultables publiquement, ont été un succès dans la coopération internationale et un facteur d'accélération incontestable de la recherche scientifique. Mais une telle mise en commun des données des puces à ADN reste actuellement lettre morte. Un gros écueil pour la mise en commun des données produites dans chaque labo est l'hétérogénéité des techniques de cDNA

arrays et l'absence de moyen unique de normalisation des données. Des projets de base de données ouvertes à tous existent, mais elles ne sont pas utilisées pour le moment en pratique dans les publications:

- la base de donnée du NCBI, GEO : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
- la base de donnée du EBI (European Bioinformatics Institute), The ArrayExpress Database : <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

VII. Conclusion

Il y a deux ans, les puces à ADN étaient une technique nouvelle à propos de la quelle on pouvait dire qu'il y avait plus de revues de la littérature que de publications originales (Lander, 1999). Ce n'est clairement plus le cas aujourd'hui, et le flot et la qualité des publications qui utilisent cette technique nous en démontrent la puissance. Nous n'en sommes pourtant qu'au début de l'exploitation des puces à ADN. Nous avons décrit leurs applications potentielles dans l'expression des gènes dans les tissus et les cellules néoplasiques, dans l'exploration des promoteurs, de leur place dans l'analyse bioinformatique des réseaux cellulaires, dans la description de nouveaux facteurs pronostiques et la découverte du mode d'action des médicaments, etc. D'autres applications sont prévisibles dans la routine médicale: l'analyse du profil d'expression de l'ARN dans différentes population leucocytaires circulantes, ou dans un tissu pathologique, devrait permettre d'associer une signature d'expression avec une infection à un germe donné, ou par exemple dans le cas d'une polyarthrite rhumatoïde d'établir le diagnostic et les facteurs pronostiques avec plus de certitude qu'une analyse classique ne faisant intervenir qu'une ou deux dizaines de marqueurs biologiques. Ces exemples ne sont pas limitatifs et illustrent les utilisations potentielles des puces à ADN en médecine, où tout reste à faire.

En revanche d'un point de vue technique, la révolution des puces à ADN a eu lieu dans les années 90. Cette technique est maintenant un acquis qu'il ne reste plus qu'à perfectionner. Les progrès attendus à moyen terme sont cependant importants :

- la couverture de l'ensemble des gènes du génome humain, ainsi que des autres grands génomes d'intérêt scientifique ou économique : les gènes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont bien connus et cette connaissance est abondamment exploitée par la technique des puces à ADN, les gènes du ver *Caenorhabditis elegans* et de la drosophile sont connus en grande partie mais la liste

exacte des gènes reste débattue (Reboul et al., 2001), les gènes de l'homme restent en partie inconnus. La séquence du génome humain va permettre de concevoir une « puce génome » qui couvrira l'intégralité des gènes du génome humain, à l'image des puces dont disposent les chercheurs travaillant sur la levure. Toutefois, ainsi que nous l'avons signalé plus haut, la déduction de l'ensemble des gènes à partir de la séquence génomique se révèle plus ardue que ce qui avait été anticipé initialement et ces difficultés retardent la genèse de cette puce mythique. Dans un avenir plus ou moins proche nous disposerons du génome et donc de la liste complète des gènes du riz, de la souris, du rat, de la vache, du poulet, du cochon, du chimpanzé, du zebrafish, du fugu, etc. (Pennisi, 2001). Cette collection de génomes sera alors un outil très précieux pour la communauté scientifique.

- une augmentation de la sensibilité et de la sensibilité de la technique. La puce oligonucléotide par technique à jet d'encre apparaît dans ce domaine comme une avancée majeure (Hughes et al., 2001). Mais un autre progrès pourra venir du perfectionnement de l'amplification de la cible, comme récemment décrit par Wang et al., où les auteurs démontrent que l'on peut amplifier d'un facteur 10 000 à 100 000 l'ARNc fluorescent qui sert à hybrider les puces, sans perte de signal significative (Wang et al., 2000). De tels protocoles permettront d'appliquer la technique des puces à ADN à des cellules rares telles que certaines cellules souches ou certains neurones (Serafini, 1999).

- la démocratisation du prix des puces à ADN par une production industrielle à grande échelle, ce qui sera une évolution logique dès lors que cette technique investira la pratique médicale de routine.

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

Nous venons de voir dans l'introduction que le MM est un cancer qui reste sans perspective de guérison pour le patient, malgré l'utilisation de chimiothérapies intensives utilisées à la dose maximale tolérable pour un corps humain. La chimiothérapie est un traitement du cancer non spécifique et l'essentiel des possibilités thérapeutiques qu'elle offre semble être atteint dans le MM. L'identification des mécanismes qui gouvernent la survie et la prolifération des cellules plasmocytaires malignes, et qui provoquent la transformation d'un plasmocyte normal en plasmocyte malin devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. De tels traitements, en conjonction avec la chimiothérapie, pourront sans doute dans le futur prolonger la survie sans rechute des patients, et peut-être permettre la guérison du MM.

Le travail de ma thèse a consisté à approfondir la connaissance de la biologie du myélome dans la perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Les domaines de recherche ont été le signal de transduction induit par la gp130, les molécules de la famille Bcl-2 impliquées dans la survie de la cellule plasmocytaire, l'analyse des cytokines et des récepteurs de cytokine par membranes à ADNc et finalement l'utilisation des puces à ADN pour comparer le transcriptome de plasmocytes normaux et tumoraux.

1. L'IL-6 et la transduction du signal de la gp130 dans le MM : articles 2, 3 et 4

I. Anticorps anti-gp130 agonistes comme outil pour étudier le signal délivré par les membres de la famille de l'IL-6 aux cellules plasmocytaires malignes

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction (cf. p 51), l'IL-6 joue un rôle essentiel dans le myélome. Il est ainsi possible d'obtenir de manière reproductible des lignées de MM dont la survie et la prolifération sont dépendantes d'addition d'IL-6 exogène chez des malades en phase terminale. Pour les malades en phase chronique, d'autres facteurs produits par des cellules stromales sont nécessaires pour induire la croissance des cellules tumorales, en synergie avec l'IL-6. Certaines études ont suggéré que les cellules stromales apportent la première chaîne du récepteur soluble de l'IL-6 et permettraient ainsi de stimuler une croissance optimale des cellules myélomateuses en présence d'IL-6 (Van Riet et al., 1997). Par ailleurs,

d'autres cytokines de la famille de l'IL-6, utilisant également la chaîne gp130 comme chaîne de transduction, pourraient être impliquées dans la biologie du myélome (Zhang et al., 1994b). Pour mieux appréhender les signaux de survie et de prolifération de la cellule myélomateuse utilisant la chaîne gp130, nous avons développé des anticorps monoclonaux, dirigés contre la chaîne transductrice de l'IL-6 et qui permettent d'induire la dimérisation de la gp130 indépendamment du ligand.

Nous avons montré que:

- La majorité des anticorps anti-gp130 bloquent la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6, mais certains anticorps anti-gp130, s'ils sont utilisés en couple, peuvent se comporter paradoxalement en agonistes. Chacun des anticorps d'un couple agoniste cible des épitopes différents. Un seul anticorps parmi 56 anticorps monoclonaux anti-gp130 testés s'est montré capable d'activer seul la signalisation de la gp-130 : B-S12. Après analyse, cet anticorps s'est révélé être un mélange de deux anticorps anti-gp130 différents (**Article 1**).

- Ces couples d'anticorps agonistes sont capables d'induire un signal de transduction identique à celui que génère l'IL-6, avec une cinétique discrètement retardée. On observe une phosphorylation des principales cibles des JAKs : STAT1, STAT3 et MAPK (**Article 2**). De fait, les anti-gp130 agonistes peuvent induire la prolifération et la survie à long terme de lignées de myélome dépendantes pour leur survie d'IL-6 exogène.

- Au même titre que l'IL-6, les anti-gp130 agonistes sont capables de stimuler la culture in vitro à long terme de cellules plasmocytaires primaires de leucémies à plasmocytes ou d'ascite myélomateuse. Ces anticorps ne sont cependant pas capables de stimuler la croissance au long terme de cellules primaires de MM lorsque le patient est à un stade médullaire (**Article 2**).

- Les anti-gp130 agonistes peuvent donc remplacer l'IL-6 in vitro mais également in vivo dans un modèle de croissance de cellules de myélome dans la souris SCID (**Article 1**).

II. La voie de transduction activée par la gp130

Compte tenu de la place de l'IL-6 dans la physiopathologie du MM, nous nous sommes intéressés au signal de transduction de la gp130. Une des principales conséquences de l'homodimérisation de la gp130 induite par l'IL-6 est la

phosphorylation sur résidu tyrosine de nombreuses protéines cellulaires. STAT3 est la principale protéine STAT phosphorylée après activation par l'IL-6 et joue un rôle essentiel dans le signal de survie délivré par la gp130 (cf. p 39 et p 91). Cette phosphorylation a été étudiée dans la lignée XG-2 par WB en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur tyrosine de STAT3 (tyrosine 705 chez la souris et son équivalent chez l'homme) (**Articles 2, 3 et 4**). En l'absence d'IL-6 STAT3 n'est pas phosphorylée sur tyrosine. Cette phosphorylation est induite par l'IL-6 et est maximale dès la première minute après addition de la cytokine. A partir de 60 minutes le signal diminue, ce qui témoigne d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Les anticorps anti-gp130 agonistes déclenchent une cascade de signalisation similaire.

Des arguments expérimentaux montrent l'importance de la voie des MAPK dans le signal de prolifération délivré par l'activation de la gp130 et pour la survie cellulaire des cellules myélomateuses (cf. p 42). La voie des MAPK est une cascade d'activation successive de kinases parmi lesquelles ERK 1 et 2. La phosphorylation de ERK2 a également été analysée par WB en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de ERK1 et 2, forme catalytiquement active (tyrosine 204). En l'absence d'IL-6, les MAPK sont faiblement phosphorylées. Cette phosphorylation est fortement induite par l'IL-6 et est maximale à la 10^{ème} minute après l'addition de la cytokine (**Articles 3 et 4**). Au bout de 60 minutes le signal diminue, ce qui témoigne également d'un rétrocontrôle négatif.

III. Le blocage par la tyrphostin AG490 de la voie de transduction de la gp130

Puisque les JAKs jouent un rôle primordial dans le signal médié par la gp130, nous avons testé les effets d'un l'inhibiteur de JAK2, la tyrphostin AG490, sur des lignées de MM dépendantes d'IL-6 pour leur croissance. Les tyrphostins appartiennent à une nouvelle catégorie de composés chimiques avec des propriétés structurales et fonctionnelles communes. Ce sont des inhibiteurs de tyrosines kinases. Certains de ces composés, dont la tyrphostin AG490, ont montré des propriétés anti-tumorales in vitro et in vivo (Meydan et al., 1996).

Nous avons montré que l'AG490 bloque effectivement l'activité kinase de JAK2, et en aval bloque la phosphorylation de STAT3 et diminue celle des MAPK. En

accord avec le rôle essentiel de la gp130 dans la biologie du myélome et celui de STAT3 dans la survie des cellules plasmocytaires malignes, nous observons une inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de lignées de myélome après addition de la tyrphostin AG490. Ce blocage de la croissance des cellules myélomateuses s'accompagne d'une importante apoptose.

IV. Discussion

Les anticorps anti-gp130 se sont révélés être des outils précieux à plusieurs titres. Un modèle expérimental de myélome dans la souris SCID a pu être développé grâce à ces anticorps (**Article 2** et (Rebouissou et al., 1998)). Le myélome étant un cancer dépendant d'IL-6, il paraissait essentiel de fournir un signal « IL-6 » aux cellules de MM administrées à la souris. L'IL-6 murine est sans effet sur le récepteur de l'IL-6 humain, alors qu'à l'inverse l'IL-6 humaine stimule le récepteur murin. Il est donc difficile d'administrer de l'IL-6 humaine aux souris en raison de la forte toxicité systémique de l'IL-6 et de la faible durée de vie plasmatique (10 minutes) de l'IL-6 in vivo. Les anticorps anti-gp130 ne reconnaissant pas la gp130 murine, ils ne présentent pas d'effet secondaire. Ils ont de plus une longue demi-vie dans la souris SCID, supérieure à 4 jours, ce qui facilite la mise en application de ce modèle. Ce modèle murin de MM présente des applications dans l'évaluation de nouvelles thérapies comme l'immunothérapie ou de nouveaux médicaments.

Les anticorps anti-gp130 ont permis de répondre à une question importante: la difficulté d'établir des cultures de cellules myélomateuses à long terme in vitro est-elle la conséquence d'un signal gp130 insuffisant en raison d'une déficience en IL-6R ou d'une absence d'autres signaux normalement apportés par les cellules du microenvironnement médullaire? Nos travaux ont montré que ni l'IL-6, ni les anticorps anti-gp130 agonistes ne permettent la survie à long terme de cellules plasmocytaires primaires de myélome à un stade médullaire de la maladie. Il existe donc d'autres signaux émis par le microenvironnement médullaire qui coopèrent avec l'IL-6 pour stimuler in vivo la croissance des cellules myélomateuses. La recherche de ces signaux a été le sujet des chapitres 4 et 5 (cf. p 147 et p 181).

Etant donné qu'il a été rapporté que tyrphostin AG490 peut-être administrée à des souris sans toxicité importante (Meydan et al., 1996), nos données suggèrent que le

blocage de la signalisation intracellulaire de l'IL-6 par une molécule chimique puisse être une stratégie de traitement du MM.

Dimerization and activation of the common
transducing chain (gp130) of the cytokines of the
IL-6 family by mAb

Autissier, P, De Vos, J, Liautard, J, Tupitsyn, N, Jacquet, C,
Chavdia, N, Klein, B, Brochier, J et Gaillard, J P.

(Article 2)

Agonist anti-gp130 transducer monoclonal
antibodies are human myeloma cell survival and
growth factors

Gu ZJ, De Vos J, Rebouissou C, Jourdan M, Zhang XG, Rossi JF,
Wijdenes J, Klein B.

(Article 3)

JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin
AG490 down-regulates the MAPK and STAT
pathways and induces apoptosis in myeloma
cells

De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B.

(Article 4)

2. Le cycle cellulaire dans le MM

Bien que le MM soit une néoplasie peu proliférante, il est probable que comme dans la majorité des cancers, le cycle cellulaire soit dérégulé, ce qui contribue à l'accumulation progressive et incontrôlée de cellules tumorales. Une analyse par western blot des principales composantes du cycle cellulaire dans un panel de lignées de myélome, a permis de montrer deux principales altérations :

- une expression dans certaines lignées de la cycline D1, cycline normalement absente des tissus hématopoïétiques,
- une perte de l'expression protéique du gène suppresseur de tumeur p16 dans une majorité de lignées de myélome. Nous constatons que sur 13 lignées de MM analysées, les deux seules lignées qui conservent une expression de p16 ont une altération manifeste de l'expression du gène suppresseur de tumeur Rb. Dans la lignée XG-4 aucune expression de Rb n'est détectée, en faveur d'une délétion bi-allélique du locus Rb. En revanche dans la lignée XG-7 seule la bande hypophosphorylée apparaît, ce qui contraste avec l'état de haute prolifération de cette lignée de myélome. Cela correspond très certainement à une mutation inactivatrice de Rb qui a été décrite comme donnant ce profil caractéristique en western blot (Kaye et al., 1990). Au total il apparaît donc que l'inactivation du contrôle du point de passage G1-S exercé par voie Rb/p16 soit un élément très fréquent voire indispensable dans la genèse des lignées de myélome. Ces observations nous amènent, dans la thématique de l'équipe d'immortalisation des plasmocytes tumoraux primaires, à envisager la transduction de gènes tels que l'antigène T du SV40 qui est capable de bloquer la voie Rb/p16.

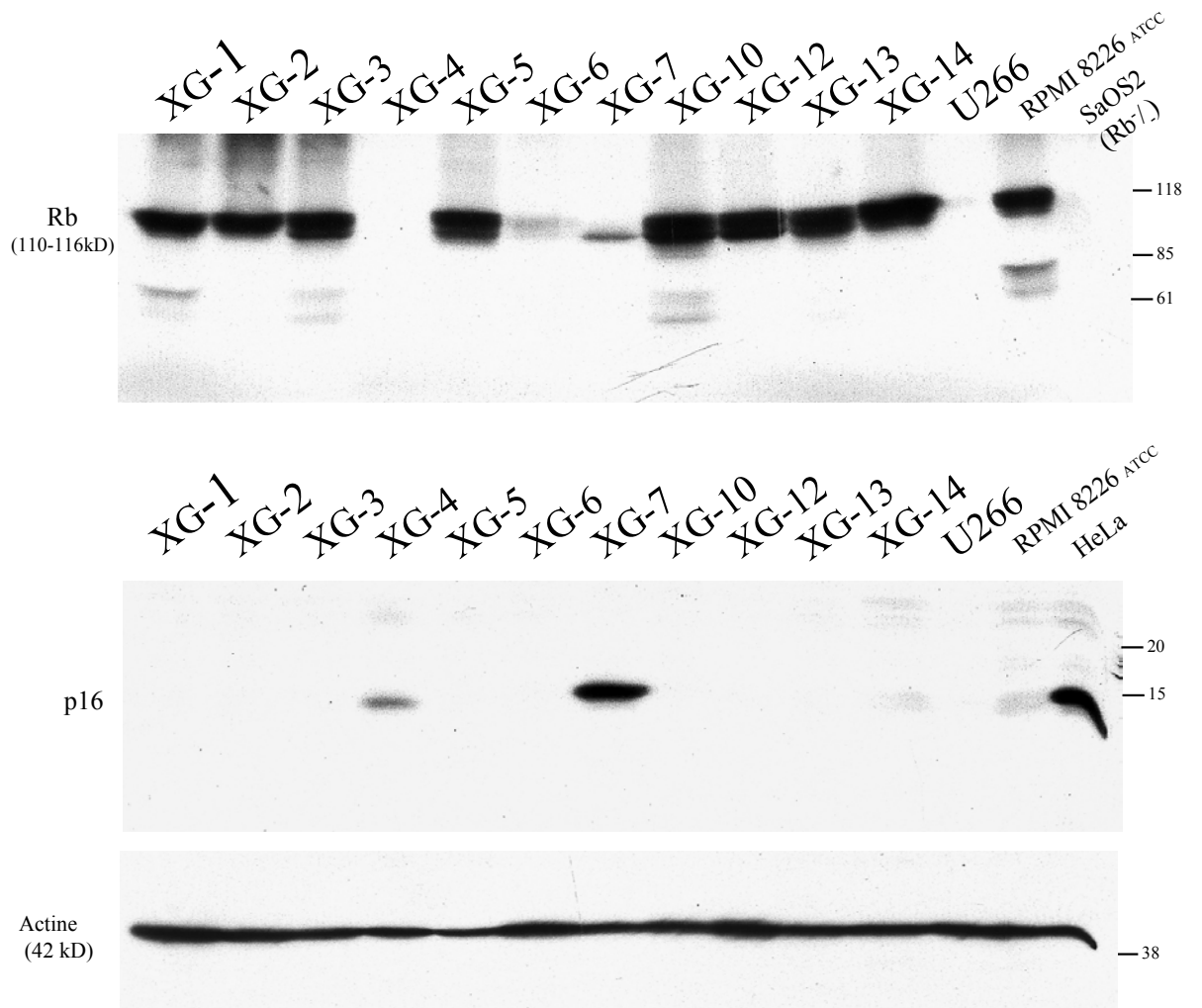


Figure 27 : Analyse par western blot de l'expression de Rb et de p16 sur un panel de 13 lignées de myélome multiple en phase de culture exponentielle. La lignée SaOS2 sert de contrôle négatif pour l'expression de Rb et la lignée HeLa comme contrôle positif pour l'expression de p16.

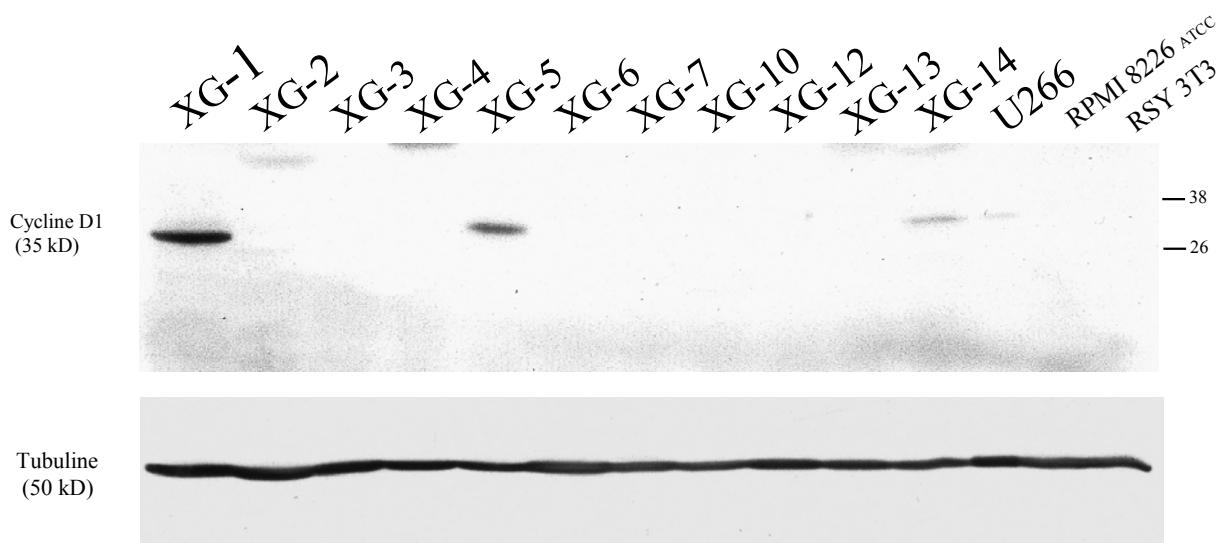


Figure 28 : Analyse par western blot de l'expression de la cycline D1 sur un panel de 13 lignées de myélome multiple en phase de culture exponentielle. La lignée de MM U266 présente un réarrangement connu conduisant à la surexpression de la cycline D1.

3. Les molécules de la famille Bcl-2 dans le MM : article 5

Résultats et discussion

Le MM est un cancer avec une faible prolifération tumorale, et l'accumulation de cellules tumorales s'explique en grande partie par une survie importante, in vivo, des plasmocytes tumoraux. Cette survie prolongée suggère une altération des mécanismes d'apoptose dans le plasmocyte tumoral. L'apoptose est la mort cellulaire par activation d'un programme de destruction systématique des différents composants de la cellule (voir Figure 29 : Apoptose).

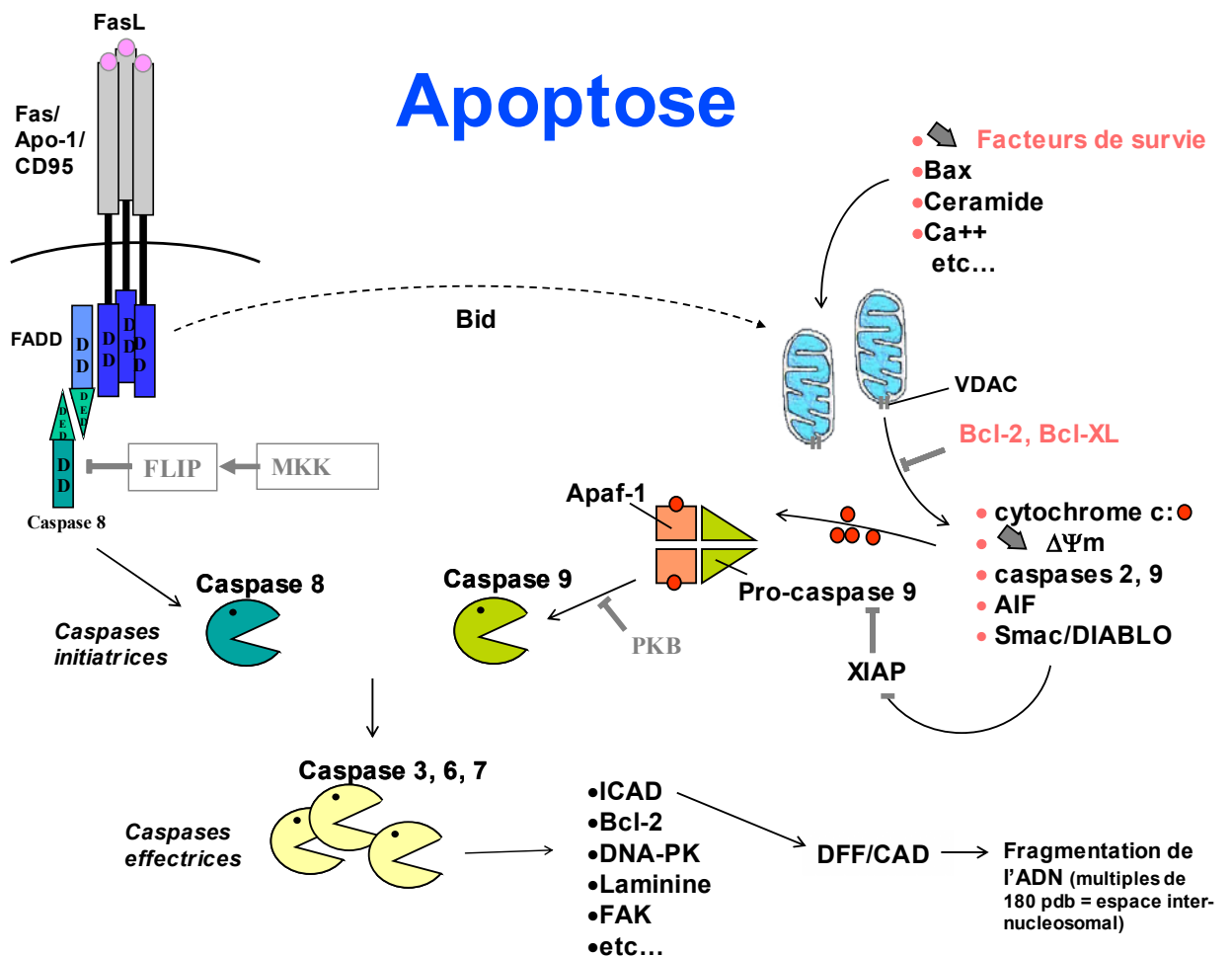


Figure 29 : Apoptose

L'apoptose peut-être déclenchée par la voie extrinsèque (par exemple agrégation du récepteur Fas) ou par la voie intrinsèque (par exemple absence d'une

cytokine essentielle). Les deux voies aboutissent à l'activation de caspases initiateuses puis de caspases effectrices.

Les protéases de la famille des caspases jouent un rôle central dans le phénomène d'apoptose. On distingue les caspases initiateuses qui sont les premières à être activées lors d'un signal pro-apoptotique, des caspases effectrices qui seront activées par clivage par les caspases initiateuses.

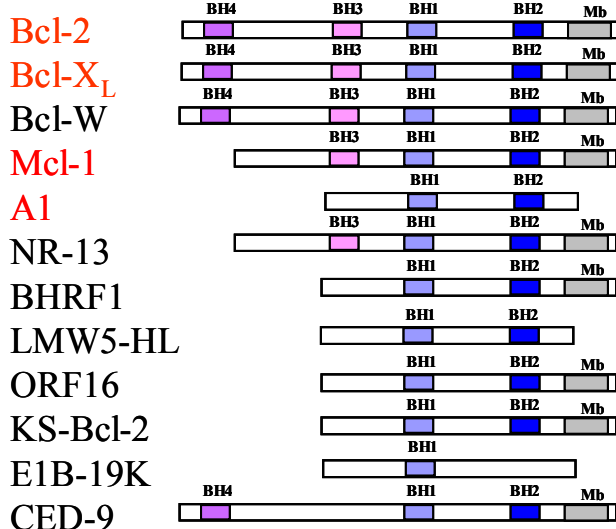
Deux grandes voies d'activation de l'apoptose sont distinguées :

- l'apoptose induite par les « death receptors » qui sont des membres de la superfamille du TNFR qui activent la caspase initiateuse 8 : c'est la voie extrinsèque.

- l'apoptose induite par un stress cellulaire, par exemple l'irradiation des cellules de myélome (Chauhan et al., 1997) mais également de très nombreux autres agressions de la cellule (résumé dans (Brenner et Kroemer, 2000)), où la mitochondrie tient une place essentielle en libérant le cytochrome c et d'autres molécules pro-apoptotiques telles que des caspases, AIF ou Smac/DIABLO. Le cytochrome c va ensuite se complexer avec Apaf-1 et activer la caspase initiateuse 9: c'est la voie intrinsèque.

En aval les caspases effectrices vont cliver diverses molécules du cytosquelette telles que la laminine, ou ICAD dont la destruction va libérer l'activité de l'enzyme CAD (caspase associated DNase) qui sera responsable du clivage systématique de tout l'ADN cellulaire en petits fragments multiples de 180 pnb. L'activation des caspases est un processus par essence très dangereux pour la cellule et de nombreux mécanismes en assurent une régulation étroite, en particulier les protéines de la famille Bcl-2 ainsi que les IAPs et FLIP. Les protéines de la famille de Bcl-2 interviennent dans le contrôle de l'apoptose au niveau de la mitochondrie.

Membres anti-apoptotiques



Membres pro-apoptotiques

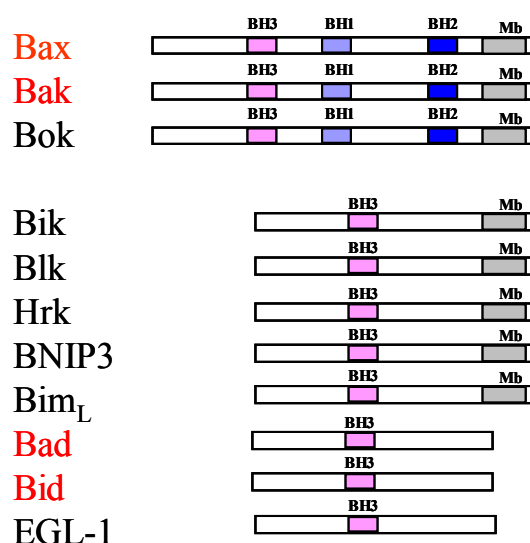


Figure 30 : Famille protéique Bcl-2

On distingue les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Ces protéines possèdent des domaines BH (Bcl-2 homology) et transmembranaires (Mb) (d'après (Gross et al., 1999)).

Cette famille comporte de nombreux membres, dont certains ont des propriétés anti-apoptotiques et d'autres des propriétés pro-apoptotiques (voir Figure 30 : Famille protéique Bcl-2). Dans les cellules myélomateuses, l'expression de Bcl-2 est connue depuis une dizaine d'année, en général en l'absence d'une translocation t (14 ;18) (Pettersson et al., 1992). Il a été observé plus récemment l'expression de Bcl-X_L dans le MM, et il a été proposé que STAT3, qui est constitutivement activé par phosphorylation dans le MM, induisait directement l'expression de Bcl-X_L en se liant au promoteur de celui-ci (Catlett-Falcone et al., 1999). Cependant le rôle des autres protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et leur régulation par différentes cytokines stimulant la survie des cellules myélomateuses n'avait pas été analysé de manière extensive auparavant.

Nous avons analysé dans onze lignées de MM (XG-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13 et 14) l'expression de neuf protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bid, Bax, Bak et Bad) ainsi que l'expression de Bag-1, qui n'est pas à proprement parler un membre de cette famille mais qui est une protéine anti-apoptotique qui se lie à Bcl-2 (Takayama et al., 1995). Ce travail montre une expression nette des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et

Bag-1, ainsi que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. L'étude de la régulation de l'expression de ces protéines par les cytokines IL-6, IFN- α et IGF-1, trois facteurs de survie des cellules de lignées de myélome dont la survie est dépendante d'IL-6, montre une régulation importante de Mcl-1 par l'IL-6 et l'IFN- α . L'expression de Bcl-X_L, n'est induite de manière reproductible par aucune de ces trois cytokines. Il existe une augmentation faible mais reproductible de l'expression de Bcl-2 induite par l'IFN- α dans certaines lignées. Il n'existe pas de régulation de ces dix protéines par l'IGF-1.

Mcl-1 apparaît donc la protéine de la famille Bcl-2 dont la variation d'expression est le plus corrélée avec la survie de la cellule myélomateuse. Cette observation est confirmée par l'équipe de Régis Bataille (Puthier et al., 1999). En revanche nous n'avons pas retrouvé la modulation de Bcl-X_L par l'IL-6 rapportée dans certaines lignées de MM, ni la baisse d'expression de Bcl-X_L qui a été observée au cours de l'apoptose induite par le blocage de la voie JAK/STAT3 par la tyrphostin AG490 ou la surexpression d'une forme dominant négatif de STAT3 dans la lignée de MM U266 (Puthier et al., 1999) (Catlett-Falcone et al., 1999). Il reste à démontrer que l'expression de Mcl-1 est bien la cause de la survie de la cellule. Dans cette optique nous développons actuellement un vecteur rétroviral murin qui permettra la surexpression de Mcl-1 dans les lignées de MM et d'en observer les conséquences sur un possible blocage de l'apoptose. L'identification de Mcl-1 comme un acteur important dans la survie du plasmocyte tumoral serait un progrès important dans la compréhension de la biologie du MM. Notre équipe recherche actuellement à immortaliser des plasmocytes tumoraux in vitro, afin d'obtenir une source continue de cellules tumorales pures pour les approches d'immunothérapie. Mcl-1 pourrait être un candidat pour bloquer l'apoptose des cellules primaires de MM mises en culture in vitro. Par ailleurs si le rôle fonctionnel de Mcl-1 se confirme, cette molécule serait une cible potentielle d'un traitement anti-myélomateux, bien qu'une protéine intracellulaire et dépourvue d'activité enzymatique directe est une cible pharmacologique difficile.

Regulation of Bcl-2-family proteins in
myeloma cells by three myeloma survival
factors: interleukin-6, interferon-alpha and
insulin-like growth factor 1

Jourdan M, De Vos J, Mehti N, Klein B.

(Article 5)

4. Molécules de communication intercellulaire dans le MM : articles 6 et 7

Les cellules myélomateuses entretiennent des relations étroites avec leur microenvironnement médullaire, par l'intermédiaire d'un contact direct et de molécules solubles telles que l'IL-6. Nous avons vu précédemment que les cytokines de la famille de l'IL-6 sont indispensables à la survie et la prolifération des cellules myélomateuses médullaires, mais non suffisantes pour les malades en phase chronique. Afin de déterminer si d'autres systèmes cytokiniques interviennent dans la physiopathologie du MM, nous avons étudié dans des échantillons de cellules myélomateuses, au niveau de l'ARN messager, l'expression de 262 gènes codant pour des cytokines, des récepteurs de cytokines et d'autres molécules de communication intercellulaire avec l'aide de membranes d'ADNc (macroarray) Atlas. Nous avons comparé ces profils d'expression à ceux observés dans des lignées lymphoblastoïdes autologues. Il apparaît que certains gènes sont très nettement surexprimés dans les cellules de MM, comme ceux codant pour la cytokine HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor), le récepteur de la thrombine, le récepteur oncogénique Tyro3, le récepteur FRZB ou encore Jagged2, un ligand des récepteurs Notch. La surexpression de ces gènes a été confirmée par RT-PCR et/ou analyse protéique (western blot, cytométrie en flux) et confirmée pour certains gènes sur des cellules primaires de myélome ou des plasmocytes normaux.

HB-EGF est un membre de la famille de l'EGF et active deux des quatre récepteurs de cette famille : ErbB1 and ErbB4. Les héparanes sulfates et la tétraspanine CD9 sont des co-récepteurs essentiels à l'activité de HB-EGF. HB-EGF est produit par de nombreux types cellulaires et a de multiples fonctions physiologiques dans les systèmes digestifs, rénaux, urinaires, musculaires, reproductifs, hépatiques et dans la cicatrisation. Il est aussi surexprimé dans un certain nombre de cancers (pancréas, prostate, ORL, foie, leucémie). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'HB-EGF (toxine diphtérique mutée) nous a permis de démontrer l'existence d'une boucle autocrine HB-EGF/CD9/Erb1 dans les lignées XG-1 et XG-14, qui surexpriment fortement HB-EGF. HB-EGF apparaît essentielle mais non suffisante à la prolifération de ces deux lignées. Comme cela a été récemment mentionné dans la littérature pour des cellules épithéliales tumorales, nos

données sont en faveur d'une coopération des signaux d'activation HB-EGF/CD9/ErbB1 et IL-6/IL-6R/gp130. L'activation du récepteur de l'EGF Erb1 joue un rôle important dans différents cancers, et plusieurs médicaments capables de bloquer l'activité de ErbB1 sont en cours de développement, voire en phase I-II en clinique. Au vu des résultats observés dans les lignées qui surexpriment HB-EGF, et sachant que certains prélèvements médullaires de myélome en phase chronique expriment HB-EGF en RT-PCR à un niveau élevé, des essais cliniques utilisant ces inhibiteurs chez les patients atteints de myélome qui surexpriment HB-EGF pourraient être intéressants.

Identifying intercellular signaling genes
expressed in malignant plasma cells by using
complementary DNA arrays

De Vos J, Couderc G, Tarte K, Jourdan M, Requirand G, Delteil
MC, Rossi JF, Mechti N, Klein B.

(Article 6)

Cooperation between heparin-binding EGF-like growth factor and interleukin-6 in promoting the growth of human myeloma cells

Wang YD, De Vos J, Couderc G, Jourdan M, Lu ZY, Rossi JF, Klein B.

(Article 7)

(Soumis à la revue Oncogene)

5. Analyse du myélome par puces à ADN : comparaison avec des plasmocytes normaux : articles 8 et 9

L'étude détaillée ci-dessus nous a incité à étendre l'approche des membranes ADN à un nombre plus important de gènes et d'inclure dans l'analyse des échantillons de plasmocytes tumoraux primaires et de plasmocytes normaux. Le choix de la technologie des puces à oligonucléotides Affymetrix a permis d'élargir le nombre de gènes étudiés à 6800, et de limiter la quantité d'ARN nécessaire à 6 µg (ARN total) – contre 100 µg pour la technique des membranes Atlas. Le développement récent dans l'équipe d'une technique d'obtention de grande quantité de plasmocytes polyclonaux par différenciation in vitro de lymphocytes B du sang d'un malade a permis de comparer les profils d'expression des cellules plasmocytaires malignes et normales autologues.

Dans un premier temps, nous avons montré que ces cellules obtenues in vitro (CD38⁺⁺/CD20⁻) avaient toutes les caractéristiques de cellules plasmocytaires : cytologie, phénotype, fonctionnalité et transcriptome obtenu par puces à ADN. Pour ce dernier point, nous avons comparé le transcriptome d'échantillons de cellules CD38⁺⁺/CD20⁻ obtenues in vitro et d'un échantillon de plasmocytes polyclonaux obtenu chez un patient qui présentait une plasmocytose réactionnelle (RP), à celui d'échantillons de myélomes (lignées et cellules primaires), et à celui d'échantillons de lymphocytes B (lignées lymphoblastoïdes et lymphocytes B du sang purifiés). Sur les 6800 gènes présents sur les puces, nous avons retenu 2263 gènes qui ont une expression supérieure au bruit de fond et qui varient suffisamment entre les échantillons. Si l'on classe les échantillons par l'algorithme « hierarchical clustering » en fonction du profil d'expression de ces 2263 gènes (voir figure ci-contre), les cellules CD38⁺⁺/CD20⁻ se classent avec l'échantillon RP et ce groupe de cellules se classe à proximité des échantillons de plasmocytes tumoraux, assez loin des échantillons de lymphocytes B. Ainsi, les cellules CD38⁺⁺/CD20⁻ obtenues in vitro sont donc bien des plasmocytes polyclonaux normaux sur des critères phénotypiques (CD20⁻, CD21^{low}, CD22^{low}, CD23^{low}, CD27⁺, CD38⁺⁺), fonctionnels (synthèse importante d'immunoglobulines polyclonales),

morphologiques en coloration May-Grünwald-Giemsa, mais aussi sur le critère de l'expression de 2263.

Ces plasmocytes normaux générés *in vitro* ont été appelés PPC (polyclonal plasma cell) et nous ont permis de comparer des échantillons de cellules plasmocytaires malignes à leur équivalent normal et à des lymphocytes B.

Dans un premier temps nous avons comparé un groupe de quatorze échantillons de myélome (huit lignées et six échantillons de cellules myélomateuses primaires purifiées dont trois leucémies à plasmocytes et trois myélomes médullaires) à un groupe de cinq échantillons de PPC. Nous avons établi une liste de gènes dont l'expression était significativement différente entre les deux groupes ($P < .05$) par un test non paramétrique de Mann-Whitney, et dont l'expression était au moins trois fois plus forte en moyenne dans un groupe par rapport à l'autre. La liste des gènes surexprimés dans le myélome (MM) comporte 104 gènes, et la liste des gènes surexprimés dans les PPC (donc sous exprimés dans le myélome) (PPC) comporte 96 gènes. L'analyse de la liste MM met en évidence de nombreux gènes déjà liés au cancer, dont 8 oncogènes. Parmi ces gènes certains pourraient être des cibles thérapeutiques comme plusieurs tyrosine kinases (dont ABL) ou le gène métabolique CBS dont la surexpression confère une sensibilité à l'aracytine. Des travaux sont en cours pour établir s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de certains des gènes de la liste MM et une sensibilité *in vitro* à des inhibiteurs spécifiques.

Generation of polyclonal plasma cells from
peripheral blood B cells: a normal counterpart of
malignant plasma cells

Tarte K, De Vos J, Thykjaer T, Fiol G, Costes V, Rème T, Legouffe
E, Rossi JF, Ørntoft O, Klein B.

THE TWO FIRST AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK.

(Article 8)

(Soumis à la revue Blood)

Transcriptome analysis of multiple myeloma
by oligonucleotides arrays: a comparison with
polyclonal plasma cells

De Vos J, Thykjær-Andersen T, Tarte K, Requirand G, Pellet F,
Rème T, Bellis M, Rossi JF, Ørntoft T, Klein B.

(Article 9)

(Article en cours de redaction)

CONCLUSION

Le traitement du cancer repose depuis longtemps sur l'action de toxiques cellulaires non spécifiques dont la découverte avait été fortuite : chimiothérapie et radiothérapie. De nouvelles molécules, développées grâce à la connaissance de la biologie d'un cancer donné, ont permis récemment des avancées thérapeutiques importantes dans le traitement de certains cancers. Il s'agit du rituximab (anti-CD20) dans les lymphomes folliculaires, l'erceptine (anti-ErbB2) dans le cancer du sein et le glivec (inhibiteur de ABL) dans la leucémie myéloïde chronique. Ces médicaments sont peu toxiques en raison d'une assez grande spécificité. Leur cible est une protéine surexprimée dans le cancer visé. Bien que la protéine cible ne soit pas complètement spécifique de la cellule tumorale, la toxicité s'avère bien plus importante pour la cellule tumorale que pour les tissus sains qui partagent l'expression de cette protéine, en général en raison d'un rôle essentiel de la protéine surexprimée dans la biologie de ce cancer. Ces données récentes illustrent le fait que le développement de nouveaux traitements médicamenteux dans le cancer reposera en grande partie sur une meilleure connaissance de la physiopathologie de chaque type de tumeur.

Dans le MM une telle approche a déjà été initiée il y a dix ans puisque l'identification de l'IL-6 comme une cytokine essentielle à la croissance des cellules plasmocytaires tumorales (Kawano et al., 1988; Klein et al., 1989) avait encouragé le développement et l'utilisation d'un anticorps monoclonal murin anti-IL-6 en clinique dans le traitement du MM (Klein et al., 1991). Bien qu'un effet anti-tumoral ait clairement été mis en évidence, le problème posé par la quantité majeure d'IL-6 produite chez certains patients est resté un frein au développement de cette approche (Lu et al., 1995). Des protocoles utilisant un anticorps anti-IL-6 sont actuellement en cours d'évaluation.

Mon travail de thèse s'est intéressé dans un premier temps aux anticorps anti-gp130 agonistes. Ces anticorps ont permis le développement d'un modèle de MM dans des souris SCID (Rebouissou et al., 1998), et ont démontré la nécessité d'une activation de la gp130 dans la survie et la prolifération des cellules primaires de myélome. Le signal de transduction délivré par la gp130 est donc apparu comme une cible thérapeutique potentielle. Nous avons évalué les effets de l'inhibiteur AG490 de

la kinase JAK2 sur les cellules de MM et avons montré que le blocage chimique de la cascade de signalisation de la gp130 était possible et se traduisait par une apoptose des cellules de lignées de MM dépendantes pour leur survie d'IL-6 exogène. Nous nous sommes également intéressés aux molécules de la famille de Bcl-2 qui étaient impliquées dans le signal de survie délivré par trois cytokines majeures de la biologie du MM : IL-6, IFN- α et IGF-1. Ce travail a mis en évidence la régulation très sensible de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 par l'IL-6 et par l'IFN- α . Un travail est en cours afin de démontrer que l'augmentation de Mcl-1 est bien la cause du signal de survie fourni par ces deux cytokines. L'observation que l'activation de la voie de signalisation de la gp130 est indispensable mais n'est pas suffisante à la survie de cellules primaires de MM nous a conduit à analyser par membrane à ADNc l'expression de 268 gènes de cytokines et de récepteurs de cytokines dans des lignées de MM. La comparaison de l'expression de ces gènes entre lignées de MM et lignées lymphoblastoïdes autologues a mis en relief la surexpression de certaines cytokines ou de certains récepteurs dans les cellules myélomateuses. La mise en évidence de la surexpression de la cytokine HB-EGF est particulièrement intéressante et nous avons montré que, dans les lignées de MM qui surexpriment ce gène, le blocage de HB-EGF ou de son récepteur ErbB1 entraîne la mort de la cellule plasmocytaire maligne. Cette observation ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le MM puisque des inhibiteurs chimiques et des anticorps monoclonaux capables de bloquer la fonction de ErbB1 sont en développement clinique dans d'autres pathologies. Finalement, le développement dans l'équipe d'un modèle d'obtention in vitro de plasmocytes normaux en grande quantité et les progrès techniques rapides dans le domaine des puces à ADN nous a naturellement amené à comparer plasmocytes normaux et tumoraux par puces à ADN. Parmi les quelque 6800 gènes différents, 199 sont différentiellement exprimés entre ces deux populations cellulaires. Certains gènes surexprimés dans les cellules myélomateuses codent pour des protéines qui sont des cibles thérapeutiques potentielles, telles que Abl, Cbs, RAR α ou RhoC.

Les progrès technologiques récents nous ont permis en l'espace de 3 ans de passer d'une analyse de la biologie du myélome gène par gène – telle qu'elle est faite par un inventaire par RT-PCR, northern Blot ou western blot – à une analyse de l'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément. Cette nouvelle approche,

couplée à l'obtention de plasmocytes polyclonaux, permet de visualiser les gènes spécifiquement surexprimés dans des plasmocytes au cours de leur transformation maligne. La pertinence des résultats obtenus a été vérifiée pour de nombreux gènes déjà connus et d'autres gènes qui n'avaient jamais encore été associés à la biologie du MM. L'analyse par puces à ADN ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement du MM.

Nous avons tout d'abord été frappé par l'hétérogénéité des échantillons de myélome, peu de gènes étant surexprimé chez la totalité des patients. Ceci est en accord avec la littérature et rejoint les observations des anomalies caryotypiques qui montre une variabilité inter-patient. Au regard de cette hétérogénéité, la technologie des puces à ADN est un atout puisque l'on pourra bientôt espérer obtenir, pour les cellules tumorales de chaque patient, le profil d'expression des principaux gènes connus, et, dans un avenir assez proche, le profil d'expression de la totalité des gènes du génome humain. La connaissance de l'ensemble du transcriptome devrait alors permettre d'appréhender avec précision l'hétérogénéité de cette pathologie. Cela conduira selon toute vraisemblance à l'inventaire de plusieurs sous-groupes de myélome caractérisés chacun par un processus de transformation différent impliquant des oncogènes et des gènes de tumeurs spécifiques. La caractérisation de ces sous-groupes permettra la définition de nouveaux scores pronostics et des traitements propres à chaque sous-groupe. Il faut admettre en effet que les critères pronostiques actuels ne rendent compte que de 20 à 25% de l'hétérogénéité du MM (Shaughnessy et Barlogie, 2001). Il faut remarquer cependant que du fait même de cette hétérogénéité, l'individualisation des sous-groupes biologiques et thérapeutiques dans le MM demandera de grandes cohortes de patients (plusieurs dizaines ou plusieurs centaines). A ce titre, l'équipe de Bart Barlogie a déjà analysé plus de 150 patients et il semble se dégager au moins quatre sous-groupes différents (Shaughnessy et Barlogie, 2001, et Bart Barlogie, communication orale, Heidelberg, 2001). Il sera intéressant également de confronter le transcriptome du myélome avec celui d'autres types tissulaires afin de préciser la spécificité de chacun des gènes surexprimés dans le plasmocyte tumoral. Avant d'atteindre ce but il faudra avoir résolu le problème de la comparaison de données d'expression génique obtenues par puces à ADN entre équipes différentes et également améliorer les outils informatiques nécessaires pour l'analyse de très grandes quantités d'informations (milliers d'échantillons).

La possibilité de comparer pour chaque malade le transcriptome des cellules tumorales par rapport à leur équivalent normal va permettre de progresser rapidement dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'émergence du clone tumoral et donc dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le MM. Le développement des nouvelles molécules anti-cancéreuses citées au début de cette conclusion montre que l'idée que la connaissance de la biologie moléculaire des cancers peut amener à en améliorer le traitement n'est pas un vain concept. Les puces à ADN vont permettre de comprendre les altérations spécifiques de l'expression des gènes du clone tumoral à l'échelle du génome, donc fournir l'information nécessaire pour proposer de nombreux nouveaux médicaments (cf. p 116) (Debouck et Goodfellow, 1999). En fonction de cette information, l'on cherchera des molécules capables de provoquer l'apoptose, interrompre le cycle cellulaire, induire la différenciation ou bloquer les relations de la cellule tumorale plasmocytaire avec son microenvironnement. Les puces à ADN pourront également servir à la validation in vitro de ces nouvelles stratégies thérapeutiques comme nous l'avons indiqué dans l'introduction (cf. p 115) (Marton et al., 1998).

Le profil d'expression deviendra alors la base du raisonnement thérapeutique chez un patient donné. On ne proposera plus une chimiothérapie unique chez tous les patients, mais un traitement « à la carte » du myélome qui ne visera chez un patient donné que des cibles thérapeutiques effectivement présentes dans le clone tumoral. Cette adaptation du traitement à la spécificité de la tumeur d'un patient concernera à la fois la chimiothérapie conventionnelle (par exemple nos données suggèrent que l'ara-C pourrait être efficace dans un sous-groupe de MM surexprimant le gène CBS) et de nouveaux traitements (par exemple notre travail a identifié ErbB1 comme une cible thérapeutique potentielle sur les cellules plasmocytaires malignes qui surexpriment la cytokine HB-EGF). Le traitement « à la carte » sera synonyme d'une plus grande efficacité et d'effets secondaires diminués.

Enfin, il convient de souligner que la chimiothérapie en général, et du STI571 dans la leucémie myéloïde chronique en particulier, pose le problème de l'émergence de clones tumoraux résistant à un médicament utilisé en monothérapie. Parce qu'il n'y a peut-être aucune cible protéique qui ne soit absolument spécifique d'une cellule tumorale donnée, l'utilisation d'un seul médicament anti-tumoral à une dose acceptable d'un point de vue de la toxicité générale sera sans doute insuffisamment efficace et sera suivi d'une rechute à partir d'un clone tumoral devenu

résistant à ce traitement. En couplant plusieurs traitements différents, chacun ciblant un processus biologique spécifique dans la cellule tumorale, la toxicité générale restera limitée car concernera des tissus différents, tandis que seule la cellule tumorale se situera à l'intersection de l'ensemble de ces traitements et sera hautement susceptible à l'effet délétère conjugué de ces traitements. Autrement dit, une cellule maligne sera caractérisée par la surexpression d'un profil distinctif de cibles thérapeutiques qu'il conviendra de déterminer, caractérisation pour laquelle les puces à ADN, et demain les puces à protéines, pourront devenir indispensables.

REFERENCES

Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., and Komiyama, A. (2000). CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 21, 204-6.

Agematsu, K., Nagumo, H., Oguchi, Y., Nakazawa, T., Fukushima, K., Yasui, K., Ito, S., Kobata, T., Morimoto, C., and Komiyama, A. (1998). Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood* 91, 173-180.

Aiuti, A., Tavian, M., Cipponi, A., Ficara, F., Zappone, E., Hoxie, J., Peault, B., and Bordignon, C. (1999). Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol* 29, 1823-31.

Alexanian, R., and Dimopoulos, M. A. (1995). Management of multiple myeloma. *Semin Hematol* 32, 20-30.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-11.

Allouche, M. (1995). Basic fibroblast growth factor and hematopoiesis. *Leukemia* 9, 937-942.

Anderson, P. N., and Potter, M. (1969). Induction of plasma cell tumours in BALB-c mice with 2,6,10,14- tetramethylpentadecane (pristane). *Nature* 222, 994-5.

Andjelic, S., Hsia, C., Suzuki, H., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Liou, H. C. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *J Immunol* 165, 3860-7.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-14.

Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268, 720-722.

Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M., Sotto, J. J., Fuzibet, J. G., Rossi, J. F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335, 91-97.

Avet-Loiseau, H., Brigaudeau, C., Morineau, N., Talmant, P., Lai, J. L., Daviet, A., Li, J. Y., Praloran, V., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., et al. (1999a). High incidence of cryptic translocations involving the Ig heavy chain gene in multiple myeloma, as shown by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 9-15.

Avet-Loiseau, H., Daviet, A., Sauner, S., and Bataille, R. (2000). Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 111, 1116-7.

Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Grosbois, B., and Bataille, R. (1999b). 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res* 59, 4546-50.

Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L., and Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 98, 3082-6.

Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M. J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., et al. (1998). High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 58, 5640-5.

Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Godon, C., Morineau, N., Daviet, A., Harousseau, J. L., Facon, T., and Bataille, R. (1999c). P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol* 106, 717-9.

Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, C., Harousseau, J. L., Grosbois, B., and Bataille, R. (1999d). Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 94, 2583-9.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F., and Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12, 881-922.

Barille, S., Akhoundi, C., Collette, M., Mellerin, M. P., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (1997). Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood* 90, 1649-1655.

Barille, S., Bataille, R., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., and Amiot, M. (1999a). Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 163, 5723-8.

Barille, S., Thabard, W., Robillard, N., Moreau, P., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (1999b). CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. *Br J Haematol* 106, 532-5.

Barlogie, B., Jagannath, S., Desikan, K. R., Mattox, S., Vesole, D., Siegel, D., Tricot, G., Munshi, N., Fassas, A., Singhal, S., et al. (1999). Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 93, 55-65.

Barlogie, B., Jagannath, S., Naucke, S., Mattox, S., Bracy, D., Crowley, J., Tricot, G., and Alexanian, R. (1998). Long-term follow-up after high-dose therapy for high-risk multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 21, 1101-7.

Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z. Y., Rossi, J. F., Lavabre-Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J., and Klein, B. (1995). Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 86, 685-691.

Bataille, R., and Harousseau, J. L. (1997). Multiple myeloma. *N Engl J Med* 336, 1657-1664.

Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X. G., and Klein, B. (1989). Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* 84, 2008-2011.

Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J. L., and Mackay, F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192, 1453-66.

Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y., and Grogan, T. M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59, 728-33.

Bendall, H. H., Sikes, M. L., Ballard, D. W., and Oltz, E. M. (1999). An intact NF-kappa B signaling pathway is required for maintenance of mature B cell subsets. *Mol Immunol* 36, 187-95.

Berenson, J. R., Lichtenstein, A., Porter, L., Dimopoulos, M. A., Bordoni, R., George, S., Lipton, A., Keller, A., Ballester, O., Kovacs, M. J., et al. (1996). Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. *N Engl J Med* 334, 488-93.

Bergsagel, D. E., Wong, O., Bergsagel, P. L., Alexanian, R., Anderson, K., Kyle, R. A., and Raabe, G. K. (1999). Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood* 94, 1174-82.

Bergsagel, P. L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Kirby, S. L., and Kuehl, W. M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13931-13936.

Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5611-22.

Bertrand, F. E., Eckfeldt, C. E., Lysholm, A. S., and LeBien, T. W. (2000). Notch-1 and Notch-2 exhibit unique patterns of expression in human B- lineage cells. *Leukemia* 14, 2095-102.

Bezieau, S., Devilder, M. C., Avet-Loiseau, H., Mellerin, M. P., Puthier, D., Pennarun, E., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Moisan, J. P., and Bataille, R. (2001). High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 18, 212-24.

Billadeau, D., Jelinek, D. F., Shah, N., LeBien, T. W., and Van Ness, B. (1995). Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res* 55, 3640-6.

Bishop, G. A., and Hostager, B. S. (2001). B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 13, 278-85.

Blanchard, F., Duplomb, L., Raher, S., Vusio, P., Hoflack, B., Jacques, Y., and Godard, A. (1999). Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J Biol Chem* 274, 24685-93.

Blanchard, F., Raher, S., Duplomb, L., Vusio, P., Pitard, V., Taupin, J. L., Moreau, J. F., Hoflack, B., Minvielle, S., Jacques, Y., and Godard, A. (1998). The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosylated human leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 273, 20886-93.

Bleul, C. C., Schultze, J. L., and Springer, T. A. (1998). B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med* 187, 753-62.

Bloem, A. C., Lamme, T., de Smet, M., Kok, H., Vooijs, W., Wijdenes, J., Boom, S. E., and Lokhorst, H. M. (1998). Long-term bone marrow cultured stromal cells regulate myeloma tumour growth in vitro: studies with primary tumour cells and LTBMCM-dependent cell lines. *Br J Haematol* 100, 166-175.

Bobbitt, K. R., and Justement, L. B. (2000). Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol* 165, 5588-96.

Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1996). Not all Shc's roads lead to Ras. *TrendsBiochemSci* 21, 257-261.

Brenner, C., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 289, 1150-1.

Brochier, J., Gaillard, C., and Klein, B. (1998). Membrane and soluble IL-6 receptors; tools of diagnosis and targets for immune intervention. *Current Trends in Immunology* 1, 105-121.

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.

Brown, A. G., Ross, F. M., Dunne, E. M., Steel, C. M., and Weir-Thompson, E. M. (1993). Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *NatGenet* 3, 67-72.

Brown, P. O., and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21, 33-7.

Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-6.

Calasanz, M. J., Cigudosa, J. C., Odero, M. D., Ferreira, C., Ardanaz, M. T., Fraile, A., Carrasco, J. L., Sole, F., Cuesta, B., and Gullon, A. (1997). Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 84-93.

Callard, R. E., Herbert, J., Smith, S. H., Armitage, R. J., and Costelloe, K. E. (1995). CD40 cross-linking inhibits specific antibody production by human B cells. *Int Immunol* 7, 1809-15.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-15.

Cerutti, A., Schaffer, A., Shah, S., Zan, H., Liou, H. C., Goodwin, R. G., and Casali, P. (1998). CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40- mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. *Immunity* 9, 247-56.

Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Krett, N., Halgren, R., Rosen, S., Kufe, D., Kharbanda, S., and Anderson, K. (1997). Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 272, 29995-29997.

Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D. J., Morris, M. S., and Fodor, S. P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-4.

Chen, B. J., and Epstein, J. (1996). Circulating clonal lymphocytes in myeloma constitute a minor subpopulation of B cells. *Blood* 87, 1972-1976.

Chen, C. L., Singh, N., Yull, F. E., Strayhorn, D., Van Kaer, L., and Kerr, L. D. (2000). Lymphocytes lacking I kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function. *J Immunol* 165, 5418-27.

Chen, Q., Gong, B., Mahmoud-Ahmed, A. S., Zhou, A., Hsi, E. D., Hussein, M., and Almasan, A. (2001). Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon- induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 98, 2183-92.

Chen, R. H., Chang, M. C., Su, Y. H., Tsai, Y. T., and Kuo, M. L. (1999). Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 274, 23013-9.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Brents, L. A., Smith, C. M., Gerhard, D. S., and Kuehl, W. M. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 88, 674-681.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., and Kuehl, W. M. (1998a). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91, 4457-4463.

Chesi, M., Brents, L. A., Ely, S. A., Bais, C., Robbiani, D. F., Mesri, E. A., Kuehl, W. M., and Bergsagel, P. L. (2001). Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 97, 729-36.

Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W. M., and Bergsagel, P. L. (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16, 260-264.

Chesi, M., Nardini, E., Lim, R. S., Smith, K. D., Kuehl, W. M., and Bergsagel, P. L. (1998b). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92, 3025-34.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A., and Fu, X. Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *MolCell Biol* 17, 5328-5337.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., and Fu, X. Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.

Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J., and Davis, R. W. (1998). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2, 65-73.

Choe, J., and Choi, Y. S. (1998). IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 28, 508-515.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.

Cigudosa, J. C., Rao, P. H., Calasanz, M. J., Odero, M. D., Michaeli, J., Jhanwar, S. C., and Chaganti, R. S. (1998). Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 91, 3007-3010.

Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406, 532-5.

Corradini, P., Inghirami, G., Astolfi, M., Ladetto, M., Voena, C., Ballerini, P., Gu, W., Nilsson, K., Knowles, D. M., and Boccadoro, M. (1994). Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 8, 758-767.

Corradini, P., Ladetto, M., Voena, C., Palumbo, A., Inghirami, G., Knowles, D. M., Boccadoro, M., and Pileri, A. (1993). Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* 81, 2708-2713.

Costes, V., Portier, M., Lu, Z. Y., Rossi, J. F., Bataille, R., and Klein, B. (1998). Interleukin-1 in multiple myeloma: producer cells and their role in the control of IL-6 production. *Br J Haematol* 103, 1152-60.

Cozzolino, F., Torcia, M., Aldinucci, D., Rubartelli, A., Miliani, A., Shaw, A. R., Lansdorp, P. M., and Di Guglielmo, R. (1989). Production of interleukin-1 by bone marrow myeloma cells. *Blood* 74, 380-387.

Cyster, J. G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286, 2098-102.

Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E., and Kienast, J. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95, 2630-6.

Dao, D. D., Sawyer, J. R., Epstein, J., Hoover, R. G., Barlogie, B., and Tricot, G. (1994). Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* 8, 1280-1284.

David, M., Petricoin, E. I., Benjamin, C., Pine, R., Weber, M. J., and Lerner, A. C. (1995). Requirement for MAP Kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269, 1721-1723.

De Vos, J., Couderc, G., Tarte, K., Jourdan, M., Requirand, G., Delteil, M. C., Rossi, J. F., Mechti, N., and Klein, B. (2001). Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood* 98, 771-780.

de Wildt, R. M., Mundy, C. R., Gorick, B. D., and Tomlinson, I. M. (2000). Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol* 18, 989-94.

Debouck, C., and Goodfellow, P. N. (1999). DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* 21, 48-50.

DeFranco, A. L. (1996). The two-headed antigen. B-cell co-receptors. *Curr Biol* 6, 548-50.

Delneri, D., Brancia, F. L., and Oliver, S. G. (2001). Towards a truly integrative biology through the functional genomics of yeast. *Curr Opin Biotechnol* 12, 87-91.

Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., and Fearon, D. T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348-50.

DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., and Trent, J. M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457-60.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-6.

Devireddy, L. R., Teodoro, J. G., Richard, F. A., and Green, M. R. (2001). Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* 293, 829-34.

Dewald, G. W., Kyle, R. A., Hicks, G. A., and Greipp, P. R. (1985). The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 66, 380-90.

Dilworth, D., Liu, L., Stewart, A. K., Berenson, J. R., Lassam, N., and Hogg, D. (2000). Germline CDKN2A mutation implicated in predisposition to multiple myeloma. *Blood* 95, 1869-71.

DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., and de Saint, B. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361, 541-543.

Doody, G. M., Billadeau, D. D., Clayton, E., Hutchings, A., Berland, R., McAdam, S., Leibson, P. J., and Turner, M. (2000). Vav-2 controls NFAT-dependent transcription in B- but not T-lymphocytes. *EMBO J* 19, 6173-84.

Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., et al. (1998). Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 92, 802-809.

Drach, J., Ackermann, J., Kaufmann, H., Konigsberg, R., and Huber, H. (2000). Deletions of the p53 gene in multiple myeloma. *Br J Haematol* 108, 883-888.

Drach, J., Angerler, J., Schuster, J., Rothermundt, C., Thalhammer, R., Haas, O. A., Jager, U., Fiegl, M., Geissler, K., and Ludwig, H. (1995a). Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 86, 3915-3921.

Drach, J., Schuster, J., Nowotny, H., Angerler, J., Rosenthal, F., Fiegl, M., Rothermundt, C., Gsur, A., Jager, U., and Heinz, R. (1995b). Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55, 3854-3859.

Drexler, H. G. (1998). Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 12, 845-59.

Dubois, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fayette, J., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1998). Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 161, 2223-31.

Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Van Kooten, C., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 941-951.

Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., and Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21, 10-4.

Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chissoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Smink, L. J., et al. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402, 489-95.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-8.

Eisenbeis, C. F., Singh, H., and Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* 9, 1377-87.

Eisenberg, D., Marcotte, E. M., Xenarios, I., and Yeates, T. O. (2000). Protein function in the post-genomic era. *Nature* 405, 823-6.

Ewing, B., and Green, P. (2000). Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet* 25, 232-4.

Facon, T., Avet-Loiseau, H., Guillermin, G., Moreau, P., Genevieve, F., Zandecki, M., Lai, J. L., Leleu, X., Jouet, J. P., Bauters, F., et al. (2001). Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97, 1566-71.

Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini, R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., et al. (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 95, 2084-92.

Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., and Lander, E. S. (1999). Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97, 727-41.

Faris, M., Kokot, N., Stahl, N., and Nel, A. E. (1997). Involvement of Stat3 in interleukin-6-induced IgM production in a human B-cell line. *Immunology* 90, 350-357.

Ferlin, M., Noraz, N., Hertogh, C., Brochier, J., Taylor, N., and Klein, B. (2000). Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma

cells through an IL-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol* 111, 626-634.

Fiedler, W., Weh, H. J., and Hossfeld, D. K. (1992). Comparison of chromosome analysis and BCL-1 rearrangement in a series of patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 81, 58-61.

Filla, M. S., Dam, P., and Rapraeger, A. C. (1998). The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J Cell Physiol* 174, 310-21.

Flactif, M., Zandecki, M., Lai, J. L., Bernardi, F., Obein, V., Bauters, F., and Facon, T. (1995). Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. *Leukemia* 9, 2109-2114.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-73.

Fonseca, R., Oken, M. M., and Greipp, P. (2001). The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 98, 1271.

Foote, L. C., Marshak-Rothstein, A., and Rothstein, T. L. (1998). Tolerant B lymphocytes acquire resistance to Fas-mediated apoptosis after treatment with interleukin 4 but not after treatment with specific antigen unless a surface immunoglobulin threshold is exceeded. *J Exp Med* 187, 847-53.

Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87, 1037-47.

Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E. W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Scharon-Kersten, T., Anver, M., et al. (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* 187, 147-59.

Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. (1997). Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 99, 2898-2905.

Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K., and Hirano, T. (1997). An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14, 751-761.

Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449-460.

Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J* 17, 6670-7.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., et al. (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186, 439-48.

Fukuhara, S., Kita, K., Nasu, K., Kannagi, M., Kamezaki, T., Ohno, H., Yamazawa, M., Nishigori, M., Uchino, H., and Yagita, M. (1983). Karyotype evolution in B-cell lymphoid malignancy with an 8;14 translocation. *Int J Cancer* 32, 555-562.

Furlong, E. E., Andersen, E. C., Null, B., White, K. P., and Scott, M. P. (2001). Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development. *Science* 293, 1629-33.

Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59-70.

Gabrea, A., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Shou, Y., and Kuehl, W. M. (1999). Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. *Mol Cell* 3, 119-23.

Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J. A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y. J., Visconti, R., and O'Shea, J. J. (2001). Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 13, 363-73.

Garrett-Sinha, L. A., Su, G. H., Rao, S., Kabak, S., Hao, Z., Clark, M. R., and Simon, M. C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* 10, 399-408.

Gascan, H., Godard, A., Ferez, C., Naulet, J., Praloran, V., Peyrat, M. A., Hewick, R., Jacques, Y., Moreau, J. F., and Souillou, J. P. (1989). Characterization and NH₂-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: leukemia inhibitory factor. Differentiation inhibitory activity secreted by a T lymphoma cell line. *J Biol Chem* 264, 21509-15.

Gavarotti, P., Boccadoro, M., Redoglia, V., Golzio, F., and Pileri, A. (1985). Reactive plasmacytosis. Case report and review of the literature. *Acta Haematol* 73, 108-110.

Ge, N. L., and Rudikoff, S. (2000). Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 96, 2856-61.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-56.

Gernone, A., Iolascon, A., Pietrafesa, A., and Dammacco, F. (1996). p16 gene analysis in multiple myeloma (MM). *Leukemia* 10, 1401.

Giordano, V., De Falco, G., Chiari, R., Quinto, I., Pelicci, P. G., Bartholomew, L., Delmastro, P., Gadina, M., and Scala, G. (1997). Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *J Immunol* 158, 4097-4103.

Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., et al. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-7.

Gonzalez, M., Mackay, F., Browning, J. L., Kosco-Vilbois, M. H., and Noelle, R. J. (1998). The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J Exp Med* 187, 997-1007.

Gonzalez, M., Mateos, M. V., Garcia-Sanz, R., Balanzategui, A., Lopez-Perez, R., Chillon, M. C., Gonzalez, D., Alaejos, I., and San Miguel, J. F. (2000). De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis. *Leukemia* 14, 183-7.

Gough, N. M., Gearing, D. P., King, J. A., Willson, T. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Metcalf, D. (1988). Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2623-7.

Grano, M., Galimi, F., Zambonin, G., Colucci, S., Cottone, E., Zallone, A. Z., and Comoglio, P. M. (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7644-8.

Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-911.

Gugasyan, R., Grumont, R., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., Nestic, D., and Gerondakis, S. (2000). Rel/NF-kappaB transcription factors: key mediators of B-cell activation. *Immunol Rev* 176, 134-40.

Guillerm, G., Gyan, E., Wolowiec, D., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Kuliczowski, K., Bauters, F., Fenaux, P., and Quesnel, B. (2001). p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 98, 244-6.

Guinamard, R., Signoret, N., Masamichi, I., Marsh, M., Kurosaki, T., and Ravetch, J. V. (1999). B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med* 189, 1461-6.

Gutierrez, N. C., Hernandez, J. M., Garcia, J. L., Almeida, J., Mateo, G., Gonzalez, M. I., Hernandez, J., Fernandez-Calvo, J., and San Miguel, J. F. (2000). Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica* 85, 1146-52.

Hacia, J. G. (1999). Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 21, 42-7.

Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C. W., and Grosschedl, R. (1993). Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* 7, 760-73.

Hallek, M., Leif, B. P., and Anderson, K. C. (1998). Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91, 3-21.

Hallek, M., Neumann, C., Schaffer, M., Danhauser-Riedl, S., von Bubnoff, N., de Vos, G., Druker, B. J., Yasukawa, K., Griffin, J. D., and Emmerich, B. (1997). Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp Hematol* 25, 1367-1377.

Han, J. H., Choi, S. J., Kurihara, N., Koide, M., Oba, Y., and Roodman, G. D. (2001). Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood* 97, 3349-53.

Hanissian, S. H., and Geha, R. S. (1997). Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 6, 379-87.

Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y. R., Littman, D. R., and Cyster, J. G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194, 45-56.

Harroch, S., Gothelf, Y., Watanabe, N., Revel, M., and Chebath, J. (1993). Interleukin-6 activates and regulates transcription factors of the interferon regulatory factor family in M1 cells. *J Biol Chem* 268, 9092-9097.

Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Nagai, S., Yamazaki, N., and Matsushima, K. (1999). Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 94, 845-52.

Hatzivassiliou, G., Miller, I., Takizawa, J., Palanisamy, N., Rao, P. H., Iida, S., Tagawa, S., Taniwaki, M., Russo, J., Neri, A., et al. (2001). IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity* 14, 277-89.

Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O. P., et al. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539-48.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334, 297-314.

Hendriks, J., Gravestien, L. A., Tesselaar, K., van Lier, R. A., Schumacher, T. N., and Borst, J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1, 433-40.

Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P. H., and Defrance, T. (2000). Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol* 165, 3023-30.

Heyer, L. J., Kruglyak, S., and Yooseph, S. (1999). Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes. *Genome Res* 9, 1106-15.

Hilbert, D. M., Kopf, M., Mock, B. A., Kohler, G., and Rudikoff, S. (1995). Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* 182, 243-248.

Hinson, R. M., Williams, J. A., and Shacter, E. (1996). Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4885-90.

Hirano, T., Ishihara, K., and Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, 2548-56.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., and et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-6.

Hjertner, O., Torgersen, M. L., Seidel, C., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Borset, M., and Sundan, A. (1999). Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoblasts: a possible role for HGF in myeloma-associated osteolytic bone disease. *Blood* 94, 3883-8.

Ho, P. J., Brown, R. D., Pelka, G. J., Basten, A., Gibson, J., and Joshua, D. E. (2001). Illegitimate switch recombinations are present in approximately half of primary myeloma tumors, but do not relate to known prognostic indicators or survival. *Blood* 97, 490-5.

Hogenesch, J. B., Ching, K. A., Batalov, S., Su, A. I., Walker, J. R., Zhou, Y., Kay, S. A., Schultz, P. G., and Cooke, M. P. (2001). A comparison of the Celera and Ensembl predicted gene sets reveals little overlap in novel genes. *Cell* 106, 413-5.

Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779-90.

Huby, R. D., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1999). Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J Biol Chem* 274, 22591-6.

Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Schelter, J. M., Meyer, M. R., et al. (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19, 342-7.

Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., et al. (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-26.

Iida, S., Rao, P. H., Butler, M., Corradini, P., Boccadoro, M., Klein, B., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1997). Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 17, 226-230.

Irving, R. A., and Hudson, P. J. (2000). Proteins emerge from disarray. *Nat Biotechnol* 18, 932-3.

Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C. F., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Jr., Boguski, M. S., et al. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283, 83-7.

Jego, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (2001). Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 97, 1817-22.

Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94, 701-12.

Jelinek, D. F., and Lipsky, P. E. (1983). The role of B cell proliferation in the generation of immunoglobulin-secreting cells in man. *J Immunol* 130, 2597-2604.

Jensen, G. S., Mant, M. J., Belch, A. J., Berenson, J. R., Ruether, B. A., and Pilarski, L. M. (1991). Selective expression of CD45 isoforms defines CALLA+ monoclonal B-lineage cells in peripheral blood from myeloma patients as late stage B cells. *Blood* 78, 711-9.

Jiang, M., Ryu, J., Kiraly, M., Duke, K., Reinke, V., and Kim, S. K. (2001). Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 218-23.

Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J. F., Wijdenes, J., Brochier, J., and Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 100, 637-646.

Juge-Morineau, N., Harousseau, J. L., Amiot, M., and Bataille, R. (1997). The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 24, 229-237.

Juge-Morineau, N., Mellerin, M. P., Francois, S., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Amiot, M., and Bataille, R. (1995). High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells. *Br J Haematol* 91, 664-667.

Kalakonda, N., Rothwell, D. G., Scarffe, J. H., and Norton, J. D. (2001). Detection of N-Ras codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation. *Blood* 98, 1555-60.

Kapasi, Z. F., Qin, D., Kerr, W. G., Kosco-Vilbois, M. H., Shultz, L. D., Tew, J. G., and Szakal, A. K. (1998). Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol* 160, 1078-84.

Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoka, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., et al. (1988). Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. *Nature* 332, 83-85.

Kawano, M. M., Huang, N., Harada, H., Harada, Y., Sakai, A., Tanaka, H., Iwato, K., and Kuramoto, A. (1993). Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 82, 564-570.

Kawano, M. M., Mihara, K., Huang, N., Tsujimoto, T., and Kuramoto, A. (1995). Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* 85, 487-94.

Kaye, F. J., Kratzke, R. A., Gerster, J. L., and Horowitz, J. M. (1990). A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6922-6.

Kehry, M. R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 156, 2345-8.

Khan, J., Simon, R., Bittner, M., Chen, Y., Leighton, S. B., Pohida, T., Smith, P. D., Jiang, Y., Gooden, G. C., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1998). Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res* 58, 5009-13.

Khan, J., Wei, J. S., Ringner, M., Saal, L. H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C. R., Peterson, C., and Meltzer, P. S. (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7, 673-9.

Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-1254.

Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* 69, 823-31.

Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189, 63-73.

Klein, B., Wijdenes, J., Zhang, X. G., Jourdan, M., Boiron, J. M., Brochier, J., Liautard, J., Merlin, M., Clement, C., and Morel-Fournier, B. (1991). Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood* 78, 1198-1204.

Klein, B., Zhang, X. G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M., and Bataille, R. (1989). Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 73, 517-526.

Klein, B., Zhang, X. G., Lu, Z. Y., and Bataille, R. (1995). Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85, 863-872.

Konigsberg, R., Ackermann, J., Kaufmann, H., Zojer, N., Urbauer, E., Kromer, E., Jager, U., Gisslinger, H., Schreiber, S., Heinz, R., et al. (2000). Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 14, 1975-9.

Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.

Kopf, M., Herren, S., Wiles, M. V., Pepys, M. B., and Kosco-Vilbois, M. H. (1998). Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med* 188, 1895-906.

Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-8.

Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 12, 2662-72.

Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-73.

Kuipers, J., Vaandrager, J. W., Weghuis, D. O., Pearson, P. L., Scheres, J., Lokhorst, H. M., Clevers, H., and Bast, B. J. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis shows the frequent occurrence of 14q32.3 rearrangements with involvement of immunoglobulin switch regions in myeloma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 109, 99-107.

Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., et al. (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621-31.

Kurie, J. M., Morse, H. C. d., Principato, M. A., Wax, J. S., Troppmair, J., Rapp, U. R., Potter, M., and Mushinski, J. F. (1990). v-myc and v-raf act synergistically to induce B-cell tumors in pristane- primed adult BALBC mice. *Oncogene* 5, 577-82.

Kurosaki, T. (2000). Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Opin Immunol* 12, 276-81.

Kyle, R. A. (1993). "Benign" monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo ClinProc* 68, 26-36.

Lai, J. L., Zandecki, M., Mary, J. Y., Bernardi, F., Izydorczyk, V., Flactif, M., Morel, P., Jouet, J. P., Bauters, F., and Facon, T. (1995). Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 85, 2490-2497.

Lam, A., Fuller, F., Miller, J., Kloss, J., Manthorpe, M., Varon, S., and Cordell, B. (1991). Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene* 102, 271-6.

Lander, E. S. (1999). Array of hope. *Nat Genet* 21, 3-4.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Largaespada, D. A., Kaehler, D. A., Mishak, H., Weissinger, E., Potter, M., Mushinski, J. F., and Risser, R. (1992). A retrovirus that expresses v-abl and c-myc oncogenes rapidly induces plasmacytomas. *Oncogene* 7, 811-9.

Lattanzio, G., Libert, C., Aquilina, M., Cappelletti, M., Ciliberto, G., Musiani, P., and Poli, V. (1997). Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. *Am J Pathol* 151, 689-696.

LeBien, T. W. (2000). Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96, 9-23.

Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-41.

Lee, I. S., Liu, Y., Narazaki, M., Hibi, M., Kishimoto, T., and Taga, T. (1997). Vav is associated with signal transducing molecules gp130, Grb2 and Erk2, and is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-6. *FEBS Lett* 401, 133-7.

Lee, P., and Hudson, T. J. (2000). La puce à ADN en médecine et en science. *Médecine et Science* 16, 43-9.

Leo, A., and Schraven, B. (2001). Adapters in lymphocyte signalling. *Curr Opin Immunol* 13, 307-16.

Leonard, W. J., and O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322, 293-322.

Lévy, Y. (1995). Agammaglobulinémie liée à l'X et gène *btk*. *Médecine thérapeutique* 1, 105.

Li, C., and Wong, W. H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 31-6.

Li, W., Hyun, T., Heller, M., Yam, A., Flechner, L., Pierce, J. H., and Rudikoff, S. (2000). Activation of insulin-like growth factor I receptor signaling pathway is critical for mouse plasma cell tumor growth. *Cancer Res* 60, 3909-15.

Li, Z., Zhu, Y. X., Plowright, E. E., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Patterson, B., Hawley, T. S., Hawley, R. G., and Stewart, A. K. (2001). The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. *Blood* 97, 2413-9.

Liang, F., Holt, I., Pertea, G., Karamycheva, S., Salzberg, S. L., and Quackenbush, J. (2000). Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet* 25, 239-40.

Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596-9.

Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, D. M., Daly, M. J., Winchester, E., Lui, W. O., Villapakkam, A., Stanton, S. E., Larsson, C., Hudson, T. J., Johnson, B. E., et al. (2000a). Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 18, 1001-5.

Lindblad-Toh, K., Winchester, E., Daly, M. J., Wang, D. G., Hirschhorn, J. N., Laviolette, J. P., Ardlie, K., Reich, D. E., Robinson, E., Sklar, P., et al. (2000b). Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nat Genet* 24, 381-6.

Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21, 20-4.

Liu, P., Leong, T., Quam, L., Billadeau, D., Kay, N. E., Greipp, P., Kyle, R. A., Oken, M. M., and Van Ness, B. (1996). Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 88, 2699-2706.

Liu, Y. J., de Bouteiller, O., and Fugier-Vivier, I. (1997). Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 9, 256-262.

Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675-80.

Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-36.

Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Lu, Z. Y., Brailly, H., Wijdenes, J., Bataille, R., Rossi, J. F., and Klein, B. (1995). Measurement of whole body interleukin-6 (IL-6) production: prediction of the efficacy of anti-IL-6 treatments. *Blood* 86, 3123-3131.

Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12694-9.

Ma, Q., Jones, D., and Springer, T. A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10, 463-71.

Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J. L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190, 1697-710.

Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M., Wei, C. M., and et al. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9, 2847-53.

Manz, R. A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133-134.

Marshall, A. J., Niiro, H., Yun, T. J., and Clark, E. A. (2000). Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev* 176, 30-46.

Marton, M. J., DeRisi, J. L., Bennett, H. A., Iyer, V. R., Meyer, M. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., et al. (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* 4, 1293-301.

Maruyama, M., Lam, K. P., and Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407, 636-42.

Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H., and Hirano, T. (1995a). Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem* 270, 11037-11039.

Matsuda, T., Takahashi-Tezuka, M., Fukada, T., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Tsukada, S., Mano, H., Hirai, H., Witte, O. N., and Hirano, T. (1995b). Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* 85, 627-633.

Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A., and Yoshimura, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89, 3148-3154.

Matsuuchi, L., and Gold, M. R. (2001). New views of BCR structure and organization. *Curr Opin Immunol* 13, 270-7.

Mazars, G. R., Portier, M., Zhang, X. G., Jourdan, M., Bataille, R., Theillet, C., and Klein, B. (1992). Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines [published erratum appears in *Oncogene* 1993 Apr;8(4):1107]. *Oncogene* 7, 1015-1018.

Mei, R., Galipeau, P. C., Prass, C., Berno, A., Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R. K., Chee, M. S., Reid, B. J., and Lockhart, D. J. (2000). Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res* 10, 1126-37.

Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., and Rolink, A. (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 14, 60-8.

Merville, P., Dechanet, J., Desmouliere, A., Durand, I., de Bouteiller, O., Garrone, P., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1996). Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med* 183, 227-236.

Merwin, R. M., and Algire, G. H. (1959). Induction of plasm cell neoplasms and fibrosarcomas in BALB/c mice carrying diffusion chambers. *Proc Soc Exp Biol Med* 101, 437-439.

Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J. S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., et al. (1996). Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379, 645-648.

Migliazza, A., Bosch, F., Komatsu, H., Cayanis, E., Martinotti, S., Toniato, E., Guccione, E., Qu, X., Chien, M., Murty, V. V., et al. (2001). Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97, 2098-104.

Milner, L. A., and Bigas, A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93, 2431-48.

Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Wang, Y. H., Cooper, M. D., Campana, D., and Conley, M. E. (1998). Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med* 187, 71-7.

Mittrucker, H. W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T. M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P. S., and Mak, T. W. (1997).

Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540-3.

Morimoto, S., Kanno, Y., Tanaka, Y., Tokano, Y., Hashimoto, H., Jacquot, S., Morimoto, C., Schlossman, S. F., Yagita, H., Okumura, K., and Kobata, T. (2000). CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* 164, 4097-104.

Morio, T., Hanissian, S. H., Bacharier, L. B., Teraoka, H., Nonoyama, S., Seki, M., Kondo, J., Nakano, H., Lee, S. K., Geha, R. S., and Yata, J. (1999). Ku in the cytoplasm associates with CD40 in human B cells and translocates into the nucleus following incubation with IL-4 and anti-CD40 mAb. *Immunity* 11, 339-48.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-6.

Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-1810.

Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L. C., Nose, M., Noda, T., and Sugamura, K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* 191, 365-74.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-8.

Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2305-9.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., et al. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.

Neri, A., Baldini, L., Trecca, D., Cro, L., Polli, E., and Maiolo, A. T. (1993). p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 81, 128-135.

Ng, M. H., Chung, Y. F., Lo, K. W., Wickham, N. W., Lee, J. C., and Huang, D. P. (1997). Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* 89, 2500-2506.

Ngo, V. N., Tang, H. L., and Cyster, J. G. (1998). Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 188, 181-91.

Nishida, K., Tamura, A., Nakazawa, N., Ueda, Y., Abe, T., Matsuda, F., Kashima, K., and Taniwaki, M. (1997). The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* 90, 526-534.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., and Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147-57.

Nordan, R. P., and Potter, M. (1986). A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science* 233, 566-9.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-62.

Nutt, S. L., Morrison, A. M., Dorfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J* 17, 2319-33.

Ochman, H., and Jones, I. B. (2000). Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J* 19, 6637-43.

Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help- dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13263-8.

Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S. P., Urashima, M., Schlossman, R. L., and Anderson, K. C. (1997). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159, 2212-2221.

Ohya, K., Kajigaya, S., Yamashita, Y., Miyazato, A., Hatake, K., Miura, Y., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K., and Mano, H. (1997). SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 272, 27178-27182.

Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K., and Kurosaki, T. (2000). BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* 13, 817-27.

Okamoto, T., Suzuki, T., and Yamamoto, N. (2000). Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 18, 438-41.

O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (2000). Transcriptional regulation of early B-lymphocyte differentiation. *Immunol Rev* 175, 94-103.

Pals, S. T., Taher, T. E., van der Voort, R., Smit, L., and Keehnen, R. M. (1998). Regulation of adhesion and migration in the germinal center microenvironment. *Cell Adhes Commun* 6, 111-6.

Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11816-21.

Paul, S. R., Bennett, F., Calvetti, J. A., Kelleher, K., Wood, C. R., O'Hara, R. M., Jr., Leary, A. C., Sibley, B., Clark, S. C., and Williams, D. A. (1990). Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7512-7516.

Pearse, R. N., Sordillo, E. M., Yaccoby, S., Wong, B. R., Liao, D. F., Colman, N., Michaeli, J., Epstein, J., and Choi, Y. (2001). Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11581-6.

Pellat-Deceunynck, C., Barille, S., Puthier, D., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (1995). Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res* 55, 3647-3653.

Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., and Chien, K. R. (1995). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1142-1146.

- Pennisi, E.** (2001). So many choices, so little money. *Science* 294, 82-5.
- Perez-Simon, J. A., Garcia-Sanz, R., Taberero, M. D., Almeida, J., Gonzalez, M., Fernandez-Calvo, J., Moro, M. J., Hernandez, J. M., San Miguel, J. F., and Orfao, A.** (1998). Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91, 3366-71.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., et al.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52.
- Petro, J. B., and Khan, W. N.** (2001). Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF- kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 1715-9.
- Pettersson, M., Jernberg-Wiklund, H., Larsson, L. G., Sundstrom, C., Givol, I., Tsujimoto, Y., and Nilsson, K.** (1992). Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 79, 495-502.
- Pfeffer, L. M., Mullersman, J. E., Pfeffer, S. R., Murti, A., Shi, W., and Yang, C. H.** (1997). STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* 276, 1418-1420.
- Piskurich, J. F., Lin, K. I., Lin, Y., Wang, Y., Ting, J. P., and Calame, K.** (2000). BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 1, 526-32.
- Portier, M., Moles, J. P., Mazars, G. R., Jeanteur, P., Bataille, R., Klein, B., and Theillet, C.** (1992). p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* 7, 2539-2543.
- Portier, M., Rajzbaum, G., Zhang, X. G., Attal, M., Rusalen, C., Wijdenes, J., Mannoni, P., Maraninchi, D., Piechaczyk, M., Bataille, R., and et al.** (1991). In vivo interleukin 6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma. *Eur J Immunol* 21, 1759-62.
- Potter, M., and Boyce, C.** (1962). Induction of plasma cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature* 193, 1086-1087.
- Potter, M., Morrison, S., Wiener, F., Zhang, X. K., and Miller, F. W.** (1994). Induction of plasmacytomas with silicone gel in genetically susceptible strains of mice. *J Natl Cancer Inst* 86, 1058-65.

Potter, M., and Wiener, F. (1992). Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis* 13, 1681-97.

Preudhomme, C., Facon, T., Zandecki, M., Vanrumbeke, M., Lai, J. L., Nataf, E., Loucheux-Lefebvre, M. H., Kerckaert, J. P., and Fenaux, P. (1992). Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *BrJ Haematol* 81, 440-443.

Primig, M., Williams, R. M., Winzeler, E. A., Tevzadze, G. G., Conway, A. R., Hwang, S. Y., Davis, R. W., and Esposito, R. E. (2000). The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* 26, 415-23.

Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., and de Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3730-4.

Puthier, D., Derenne, S., Barille, S., Moreau, P., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (1999). Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br J Haematol* 107, 392-5.

Qin, D., Wu, J., Vora, K. A., Ravetch, J. V., Szakal, A. K., Manser, T., and Tew, J. G. (2000). Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J Immunol* 164, 6268-75.

Quesnel, B., Preudhomme, C., Philippe, N., Vanrumbeke, M., Dervite, I., Lai, J. L., Bauters, F., Wattel, E., and Fenaux, P. (1995). p16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85, 657-63.

Radl, J., Croese, J. W., Zurcher, C., Van den Enden-Vieveen, M. H., and de Leeuw, A. M. (1988). Animal model of human disease. Multiple myeloma. *Am J Pathol* 132, 593-7.

Radl, J., Punt, Y. A., van den Enden-Vieveen, M. H., Bentvelzen, P. A., Bakkus, M. H., van den Akker, T. W., and Benner, R. (1990). The 5T mouse multiple myeloma model: absence of c-myc oncogene rearrangement in early transplant generations. *Br J Cancer* 61, 276-8.

Ramsay, A. J., Husband, A. J., Ramshaw, I. A., Bao, S., Matthaei, K. I., Koehler, G., and Kopf, M. (1994). The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 264, 561-563.

Randall, T. D., Heath, A. W., Santos-Argumedo, L., Howard, M. C., Weissman, I. L., and Lund, F. E. (1998). Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8, 733-742.

Rawat, R., Rainey, G. J., Thompson, C. D., Frazier-Jessen, M. R., Brown, R. T., and Nordan, R. P. (2000). Constitutive activation of STAT3 is associated with the acquisition of an interleukin 6-independent phenotype by murine plasmacytomas and hybridomas. *Blood* 96, 3514-21.

Raychaudhuri, S., Stuart, J. M., and Altman, R. B. (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*, 455-66.

Rebouissou, C., Wijdenes, J., Autissier, P., Tarte, K., Costes, V., Liautard, J., Rossi, J. F., Brochier, J., and Klein, B. (1998). A gp130 interleukin-6 transducer-dependent SCID model of human multiple myeloma. *Blood* 91, 4727-4737.

Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., et al. (2001). Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nat Genet* 27, 332-6.

Reiman, T., Seeberger, K., Taylor, B. J., Szczepek, A. J., Hanson, J., Mant, M. J., Coupland, R. W., Belch, A. R., and Pilarski, L. M. (2001). Persistent pre-switch clonotypic myeloma cells correlate with decreased survival: evidence for isotype switching within the myeloma clone. *Blood* 98, 2791-9.

Reimold, A. M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D. S., Zhang, J., Horton, H. F., Scott, A., Orkin, S. H., Byrne, M. C., et al. (2000). An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev* 14, 152-7.

Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., and Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-7.

Reimold, A. M., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., David, C. S., Strominger, J. L., and Glimcher, L. H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* 183, 393-401.

Ren, B., Chee, K. J., Kim, T. H., and Maniatis, T. (1999). PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev* 13, 125-37.

Richelda, R., Ronchetti, D., Baldini, L., Cro, L., Viggiano, L., Marzella, R., Rocchi, M., Otsuki, T., Lombardi, L., Maiolo, A. T., and Neri, A. (1997). A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 90, 4062-4070.

Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5- deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-6.

Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S. S., Van de Rijn, M., Waltham, M., et al. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24, 227-35.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-42.

Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., and Teixido, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin- mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97, 346-51.

Sarma, V., Lin, Z., Clark, L., Rust, B. M., Tewari, M., Noelle, R. J., and Dixit, V. M. (1995). Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 270, 12343-6.

Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Thomas, E. L., Swanson, C. M., Goosen, L. S., Sammartino, G., Gilliland, J. C., Munshi, N. C., Tricot, G., Shaughnessy, J. D., Jr., and Barlogie, B. (2001). Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol* 112, 167-74.

Sawyer, J. R., Waldron, J. A., Jagannath, S., and Barlogie, B. (1995). Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 82, 41-49.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.

Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., Andrews, D. T., et al. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24, 236-44.

Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulgamorskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M. L. (2001). An essential role for bcl-6 in the normal development of b cells through a bcma-independent pathway. *Science* 293, 2111-4.

Scholl, P. R., and Geha, R. S. (1994). MHC class II signaling in B-cell activation. *Immunol Today* 15, 418-22.

Schubart, K., Massa, S., Schubart, D., Corcoran, L. M., Rolink, A. G., and Matthias, P. (2001). B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1. *Nat Immunol* 2, 69-74.

Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-7.

Seidel, C., Hjertner, O., Abildgaard, N., Heickendorff, L., Hjorth, M., Westin, J., Nielsen, J. L., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A., and Borset, M. (2001). Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 98, 2269-71.

Selinger, D. W., Cheung, K. J., Mei, R., Johansson, E. M., Richmond, C. S., Blattner, F. R., Lockhart, D. J., and Church, G. M. (2000). RNA expression analysis using a 30 base pair resolution Escherichia coli genome array. *Nat Biotechnol* 18, 1262-8.

Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., et al. (1999). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11458-63.

Serafini, T. (1999). Of neurons and gene chips. *Curr Opin Neurobiol* 9, 641-4.

Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., and Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.

Shaughnessy, J., Jr., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Bergsagel, P. L., and Kuehl, M. (2001). Cyclin D3 at 6p21

is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 98, 217-23.

Shaughnessy, J. D., and Barlogie, B. (2001). Developmental therapeutics for multiple myeloma--a road map for the future. *Semin Hematol* 38, 295-7.

Shaw, A. C., Swat, W., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F. W. (1999). Activated Ras signals developmental progression of recombina- activating gene (RAG)-deficient pro-B lymphocytes. *J Exp Med* 189, 123-9.

Shchepinov, M. S., Case-Green, S. C., and Southern, E. M. (1997). Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 25, 1155-61.

Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M., Shima, D. T., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709-19.

Shoemaker, D. D., Schadt, E. E., Armour, C. D., He, Y. D., Garrett-Engle, P., McDonagh, P. D., Loerch, P. M., Leonardson, A., Lum, P. Y., Cavet, G., et al. (2001). Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature* 409, 922-7.

Shou, Y., Martelli, M. L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L. A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I. R., Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M. (2000). Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c- myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 228-33.

Sigvardsson, M., O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1997). EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* 7, 25-36.

Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., et al. (1999). Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341, 1565-71.

Slifka, M. K., and Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 10, 252-258.

Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8, 363-372.

Smadja, N. V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., and Fruchart, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98, 2229-38.

Snapper, C. M., Marcu, K. B., and Zelazowski, P. (1997). The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". *Immunity* 6, 217-23.

St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289, 1197-202.

Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., and Pellegrini, S. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92-95.

Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., and Yancopoulos, G. D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Stevenson, F., Sahota, S., Zhu, D., Ottensmeier, C., Chapman, C., Oscier, D., and Hamblin, T. (1998). Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 162:247-59, 247-259.

Stewart, A. K., Vescio, R., Schiller, G., Ballester, O., Noga, S., Rugo, H., Freytes, C., Stadtmauer, E., Tarantolo, S., Sahebi, F., et al. (2001). Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 19, 3771-9.

Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H. P., and Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507-21.

Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7547-7551.

Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1992). Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 232-235.

Szcepek, A. J., Bergsagel, P. L., Axelsson, L., Brown, C. B., Belch, A. R., and Pilarski, L. M. (1997). CD34+ cells in the blood of patients with multiple myeloma express CD19 and IgH mRNA and have patient-specific IgH VDJ gene rearrangements. *Blood* 89, 1824-33.

Szcepek, A. J., Seeberger, K., Wizniak, J., Mant, M. J., Belch, A. R., and Pilarski, L. M. (1998). A high frequency of circulating B cells share clonotypic Ig heavy-chain VDJ rearrangements with autologous bone marrow plasma cells in multiple myeloma, as measured by single-cell and in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 92, 2844-55.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-4.

Taga, T., Hibi, M., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-581.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15, 797-819.

Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 18, 4109-17.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A., and Reed, J. C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-84.

Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J., Zhu, Q., Kitareewan, S., Dmitrovsky, E., Lander, E. S., and Golub, T. R. (1999). Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2907-12.

Tan, J. E., Wong, S. C., Gan, S. K., Xu, S., and Lam, K. P. (2001). The adaptor protein BLNK is required for b cell antigen receptor- induced activation of nuclear factor-kappa B and cell cycle entry and survival of B lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 20055-63.

Taniwaki, M., Nishida, K., Takashima, T., Nakagawa, H., Fujii, H., Tamaki, T., Shimazaki, C., Horiike, S., Misawa, S., and Abe, T. (1994). Nonrandom chromosomal rearrangements of 14q32.3 and 19p13.3 and preferential deletion of 1p in 21 patients with multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Blood* 84, 2283-2290.

Tarlinton, D. M., and Smith, K. G. (2000). Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol Today* 21, 436-41.

Tasaka, T., Asou, H., Munker, R., Said, J. W., Berenson, J., Vescio, R. A., Nagai, M., Takahara, J., and Koeffler, H. P. (1998). Methylation of the p16INK4A gene in multiple myeloma. *Br J Haematol* 101, 558-64.

Tasaka, T., Berenson, J., Vescio, R., Hirama, T., Miller, C. W., Nagai, M., Takahara, J., and Koeffler, H. P. (1997). Analysis of the p16INK4A, p15INK4B and p18INK4C genes in multiple myeloma. *Br J Haematol* 96, 98-102.

Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K., and Qin, D. (2001). Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol* 22, 361-7.

Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I. D., Mullen, C., et al. (2001). Baff-r, a newly identified tnfr receptor that specifically interacts with baff. *Science* 293, 2108-11.

Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an antiinflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-118.

Toronen, P., Kolehmainen, M., Wong, G., and Castren, E. (1999). Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS Lett* 451, 142-6.

Tricot, G., Barlogie, B., Jagannath, S., Bracy, D., Mattox, S., Vesole, D. H., Naucke, S., and Sawyer, J. R. (1995). Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 86, 4250-4256.

Tricot, G., Vesole, D. H., Jagannath, S., Hilton, J., Munshi, N., and Barlogie, B. (1996). Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 87, 1196-1198.

Troppmair, J., Potter, M., Wax, J. S., and Rapp, U. R. (1989). An altered v-raf is required in addition to v-myc in J3V1 virus for acceleration of murine plasmacytomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9941-5.

Tu, Y., Gardner, A., and Lichtenstein, A. (2000). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 60, 6763-70.

Turner, C. A., Mack, D. H., and Davis, M. M. (1994). Blimp-1, a Novel Zinc Finger-Containing Protein That Can Drive the Maturation of B Lymphocytes into Immunoglobulin- Secreting Cells. *Cell* 77, 297-306.

Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D., and Anderson, K. C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82, 3712-3720.

Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H., Kita, T., and Kosek, H. (1997). Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *J Immunol* 158, 3197-204.

Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M., Ria, R., Albini, A., Bussolino, F., and Dammacco, F. (1999). Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 93, 3064-73.

Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., Ranieri, G., Serio, G., Silvestris, F., and Dammacco, F. (1994). Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *BrJ Haematol* 87, 503-508.

van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-52.

Van Riet, I., De Greef, C., Aharchi, F., Woischwill, C., De Waele, M., Bakkus, M., Lacor, P., Schots, R., and Van Camp, B. (1997). Establishment and characterization of a human stroma-dependent myeloma cell line (MM5.1) and its stroma-independent variant (MM5.2). *Leukemia* 11, 284-293.

Van Snick, J., Cayphas, S., Szikora, J. P., Renauld, J. C., Van Roost, E., Boon, T., and Simpson, R. J. (1988). cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur J Immunol* 18, 193-7.

Van Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulie, P. G., Rubira, M. R., and Simpson, R. J. (1986). Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9679-83.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-7.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51.

Wagner, E. F., Hanna, N., Fast, L. D., Kouttab, N., Shank, P. R., Vazquez, A., and Sharma, S. (2000). Novel diversity in IL-4-mediated responses in resting human naive B cells versus germinal center/memory B cells. *J Immunol* 165, 5573-9.

Wagner, E. F., Hleb, M., Hanna, N., and Sharma, S. (1998). A pivotal role of cyclin D3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4-, or IL-10-mediated human B cell proliferation. *J Immunol* 161, 1123-31.

Wang, E., Miller, L. D., Ohnmacht, G. A., Liu, E. T., and Marincola, F. M. (2000). High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 18, 457-9.

Wang, J. H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B. A., and Georgopoulos, K. (1998). Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 9, 543-53.

Ward, A. C., Touw, I., and Yoshimura, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19-29.

Wen, W. H., Bernstein, L., Lescallett, J., Beazer-Barclay, Y., Sullivan-Halley, J., White, M., and Press, M. F. (2000). Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* 60, 2716-22.

Wen, X. Y., Stewart, A. K., Sooknanan, R. R., Henderson, G., Hawley, T. S., Reimold, A. M., Glimcher, L. H., Baumann, H., Malek, L. T., and Hawley, R. G. (1999). Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 15, 173-8.

Winzeler, E. A., Richards, D. R., Conway, A. R., Goldstein, A. L., Kalman, S., McCullough, M. J., McCusker, J. H., Stevens, D. A., Wodicka, L., Lockhart, D. J., and Davis, R. W. (1998). Direct allelic variation scanning of the yeast genome. *Science* 281, 1194-7.

Yaccoby, S., and Epstein, J. (1999). The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host. *Blood* 94, 3576-82.

Yamasaki, T., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) receptor. *Science* 241, 825-828.

Yan, M., Brady, J. R., Chan, B., Lee, W. P., Hsu, B., Harless, S., Cancro, M., Grewal, I. S., and Dixit, V. M. (2001). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11, 1547-52.

Yoshida, S., Nakazawa, N., Iida, S., Hayami, Y., Sato, S., Wakita, A., Shimizu, S., Taniwaki, M., and Ueda, R. (1999). Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia* 13, 1812-6.

Zandecki, M., Bernardi, F., Genevieve, F., Lai, J. L., Preudhomme, C., Flactif, M., Cosson, A., Bauters, F., and Facon, T. (1997a). Involvement of peripheral blood cells in multiple myeloma: chromosome changes are the rule within circulating plasma cells but not within B lymphocytes. *Leukemia* 11, 1034-9.

Zandecki, M., Facon, T., Preudhomme, C., Vanrumbeke, M., Vachee, A., Quesnel, B., Lai, J. L., Cosson, A., and Fenaux, P. (1995a). The retinoblastoma gene (RB-1) status in multiple myeloma: a report on 35 cases. *Leuk Lymphoma* 18, 497-503.

Zandecki, M., Lai, J. L., and Facon, T. (1996). Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 94, 217-227.

Zandecki, M., Lai, J. L., Genevieve, F., Bernardi, F., Volle-Remy, H., Blanchet, O., Francois, M., Cosson, A., Bauters, F., and Facon, T. (1997b). Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood* 90, 3682-3690.

Zandecki, M., Obein, V., Bernardi, F., Soenen, V., Flactif, M., Lai, J. L., Francois, M., and Facon, T. (1995b). Monoclonal gammopathy of undetermined

significance: chromosome changes are a common finding within bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 90, 693-696.

Zhang, J., Roschke, V., Baker, K. P., Wang, Z., Alarcon, G. S., Fessler, B. J., Bastian, H., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001a). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166, 6-10.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-72.

Zhang, S., Ramsay, E. S., and Mock, B. A. (1998). Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2429-34.

Zhang, X., Li, L., Jung, J., Xiang, S., Hollmann, C., and Choi, Y. S. (2001b). The distinct roles of T cell-derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. *J Immunol* 167, 49-56.

Zhang, X. G., Gaillard, J. P., Robillard, N., Lu, Z. Y., Gu, Z. J., Jourdan, M., Boiron, J. M., Bataille, R., and Klein, B. (1994a). Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83, 3654-3663.

Zhang, X. G., Gu, Z. J., Lu, Z. Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G. D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., and Klein, B. (1994b). 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* 179, 1337-1342.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., and Levine, A. J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-93.

Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., et al. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293, 2101-5.

Ziauddin, J., and Sabatini, D. M. (2001). Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 411, 107-10.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-7.

Zong, W. X., Edelstein, L. C., Chen, C., Bash, J., and Gelinas, C. (1999).
The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB
that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 382-7.

Erratum

Les numéro de page 165 à 173 n'ont pas été utilisés.

Les numéro de page 318 à 323 ont été utilisés deux fois.

Analyse moléculaire du myélome : vers de nouvelles perspectives thérapeutiques

Le myélome multiple (MM) est une néoplasie hématopoïétique chimiosensible. Si une chimiothérapie intensive associée à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques permet de doubler la médiane de survie, la rechute reste cependant inéluctable et ce cancer est incurable à l'heure actuelle.

Plusieurs exemples ont montré récemment qu'une connaissance précise de la physiopathologie d'un cancer pouvait conduire à l'élaboration de traitements spécifiques. Ces nouveaux traitements anti-cancéreux ciblant un sous-groupe de tumeurs caractérisées par une altération moléculaire commune sont une voie de développement thérapeutique prometteuse.

Mon travail de thèse a consisté à étudier la biologie du MM dans une perspective de ciblage pharmacologique de la cellule plasmocytaire maligne. L'utilisation d'anticorps anti-gp130 agonistes a permis de montrer que l'activation de la signalisation par la chaîne gp130 du récepteur de l'interleukine-6 (IL-6) est indispensable à la survie et la prolifération des cellules de MM. En corollaire, l'interruption de cette voie de signalisation par la tyrphostin AG490, inhibiteur de la kinase JAK2, bloque la croissance et induit une apoptose dans les plasmocytes tumoraux. Des membranes comportant les ADNc de 268 gènes nous ont permis de rechercher l'expression des gènes d'autres cytokines et récepteurs de cytokines pouvant jouer un rôle dans la physiopathologie du MM. Nous avons mis en évidence dans des lignées de MM une boucle autocrine, cruciale pour la survie du plasmocyte tumoral, qui implique la cytokine HB-EGF et son récepteur ErbB1. Le développement d'un modèle de génération in vitro de plasmocytes normaux purifiés a permis ensuite la comparaison du transcriptome de plasmocytes tumoraux avec leur contrepartie normale par des puces à ADN analysant l'expression de 6800 gènes différents. De nombreux gènes sont différentiellement exprimés entre ces deux populations cellulaires et certains gènes surexprimés dans les cellules myélomateuses codent pour des protéines qui sont des cibles thérapeutiques potentielles, telles que ABL, CBS, RAR α ou RhoC.

La possibilité de comparer pour chaque malade le transcriptome des cellules tumorales par rapport à leur équivalent normal va permettre de progresser rapidement dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'émergence du clone tumoral et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette approche pourrait aboutir sur la mise en place d'un traitement « à la carte » du MM basé sur l'examen du transcriptome du clone tumoral de chaque patient.

Mots-Clés : Myélome multiple, plasmocyte, cytokine, puce à ADN

Discipline : Hématologie

Laboratoire : INSERM U475 – 99, rue Puech Villa, 43 197 Montpellier Cedex 5