HAL
open science

Rôle du système IGF-1/insuline dans le Myélome Multiple

Anne Catherine Sprynski

To cite this version:

Anne Catherine Sprynski. Rôle du système IGF-1/insuline dans le Myélome Multiple. Immunologie. Université Montpellier I, 2009. Français. NNT : . tel-00464235

HAL Id: tel-00464235

https://theses.hal.science/tel-00464235v1

Submitted on 16 Mar 2010

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.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

Rôle du système IGF-1/insuline dans le Myélome Multiple

Thèse pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé
Formation doctorale : Biologie-Santé
Spécialité : Immunologie

Soutenue le 30 Novembre 2009 par :

Anne Catherine Sprynski

JURY

Pr Bernard Klein, PU-PH, Faculté de Médecine de Montpellier	Président et Directeur
Pr Karin Tarte, PU-PH, Faculté de Médecine de Rennes	Rapporteur
Pr Régis Bataille, PU-PH, Faculté de Médecine de Nantes	Rapporteur
Dr Stéphane Dalle, CR1, Faculté de Médecine de Montpellier	Examinateur

Publications

Bret C, Hose D, Reme T, **Sprynski A. C**, Mahtouk K, Schved J. F, Quittet P, Rossi J. F, Goldschmidt H, Klein B.
"Expression of genes encoding for proteins involved in heparin sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells"
British Journal of Haematology, 2009, 145, 350–368

Sprynski A. C, Hose D, Caillot L, Reme T, Shaughnessy J. D. Jr, Barlogie B, Seckinger A, Moreaux J, Hundemer M, Jourdan M, Meissner T, Jauch A, Mahtouk K, Kassambara A, Bertsch U, Rossi J. F, Goldschmidt H, Klein B.
"The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor"
Blood, 2009, 113: 4614-4626.

Moreaux J, **Sprynski A. C**, Dillon S. R, Mahtouk K, Jourdan M, Ythier A, Moine P, Robert N, Jourdan E, Rossi J. F, Klein B.
"APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop"
European Journal of Haematology, 2009, 83 (119–129).

Sprynski A. C, Hose D, Kassambara A, Vincent L, Jourdan M, Rossi J. F, Goldschmidt H, Klein B.
"Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin receptor/IGF-1 receptor activation" soumis

Sprynski A. C, Moreaux J, Hose D Klein B.
"The BAFF/APRIL inhibitor - TACI-Fc – induces the survival and the proliferation of myeloma cell lines, promoting an autocrine IGF-1/IGF-1R loop" soumis.

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par une accumulation de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Les cellules de MM (MMC) présentent de nombreuses anomalies cytogénétiques qui ne sont pas suffisantes pour induire la survie et la croissance de ces cellules qui sont dépendantes de l'environnement médullaire. Ce microenvironnement expriment des molécules d'adhésion et synthétisent des cytokines indispensables à la croissance du clone myélomateux. Dix principales familles de facteurs de croissance sont identifiées dans le MM (MGF) mais leur rôle respectif dans cette pathologie n'est pas établi. Ces facteurs de croissance sont produits soit par l'environnement tumoral ou soit par les cellules elle-même. La multiplicité de ces facteurs de croissance rend difficile la compréhension de la biologie du MM et l'émergence du clone tumoral in vivo.

L'étude sur la coopération des 5 MGF les plus documentés nous a permis d'identifier l'IGF-1 comme un facteur de croissance majeur du MM : un inhibiteur d'IGF-1R bloque la croissance de 7/8 lignées de MM (HMCL) et la boucle autocrine de l'IGF-1 essentielle à l'activité de croissance de l'IL-6, d'HB-EGF et d'HGF. De plus, nous avons identifié que la présence d'IGF-1R (présent dans 44% des MMC) était un facteur de mauvais pronostic. L'IL-6 qui est le deuxième MGF majeur induit la croissance de 7/8 lignées. L'IL-6R, exprimé dans toutes les MMC, est aussi un facteur de mauvais pronostic quand il a une fortement exprimé dans les MMC de patients.

Par la suite, nous avons étudié l'effet de l'insuline, cytokine de forte homologie avec l'IGF-1. Nous avons montré que l'insuline avait le même effet que l'IGF-1. Son activité nécessite l'activation d'IGF-1R qui est transduit par la présence du récepteur hétérodimère IGF-1R/INSR (hybrid-R) à la surface des MMC. L'insuline ne pouvant pas activer l'homodimère IGF-1R à des concentrations physiologiques, ce qui montre que l'hybrid-R confère à l'insuline la capacité à activer l'IGF-1R donc de devenir un MGF.

Un inhibiteur ciblant l'IGF-1R mais également l'Hybrid-R en association avec un anti-IL-6 semblerait donc être un traitement prometteur dans la pathologie du MM pour les 44% des patients exprimant l'IGF-1R.

TABLE DES MATIERES

Liste des abbréviations…….……..3

INTRODUCTION

I. Les généralités du Myélome Multiple (MM) 5

I.1. L'origine de la cellule tumorale myélomateuse 5

I.2. Les anomalies cytogénétiques du MM 8

I.2.1. Le premier évènement oncogénique 8
I.2.2. Le deuxième évènement oncogénique 10
I.2.3. La classification du MM et valeurs pronostiques.....12

I.3. Les traitements du MM 15

I.3.1. Le système de l'ISS.....15
I.3.2. Les traitements standards et les nouvelles drogues 15

II. L'environnement médullaire du MM.....20

II.1. L'adhésion des cellules de MM aux cellules stromales et aux protéines de la matrice extracellulaire 20

II.2. Le rôle des cytokines et des facteurs de croissance dans le MM..... 22

II.2.1 L'interleukine-6 (IL-6) 22
II.2.2 L'insulin-like growth factor-1 (IGF-1).....23
II.2.3 Le vascular endothelial growth factor (VEGF) 23
II.2.4 Le tumor necrosis factor α (TNF-α) 24
II.2.5 L'interféron-α (IFN-α) 24
II.2.6 L'hepatocyte growth factor (HGF).....25
II.2.7 Les membres de la famille epidermal growth factor (EGF) 25
II.2.8 B cell activating factor of the TNF family/a proliferation-inducing ligand (BAFF/APRIL) 26
II.2.9 SDF-1α 27
II.2.10 Les ligands de Notch : JAG1 et JAG2 27
II.2.11 Les Wnt (wingless integration site) 28
II.2.12 Le fibroblast growth factor-2 (FGF-2).....29
II.2.13 Le transforming growth factor β (TGF-β) 29
II.2.14 L'interleukine-15 et -21 (IL-15 et IL-21).....30
II.2.15 Les inhibiteurs des voies de signalisation activées dans le MM.....30

II.3. La niche vasculaire de la MO et l'angiogenèse tumorale 33

II.3.1. La cellule endothéliale de MM (MMEC) 33
II.3.2. Le rôle des MMC dans l'angiogenèse.....35
II.3.3. Les inhibiteurs de l'angiogenèse 36

II.4. La niche ostéoblastique et les lésions osseuses dans le MM..... 36

II.4.1. Les ostéoclastes 37
II.4.2. Les ostéoblastes 38

III. L'étude du transcriptome dans le MM. 41
III.1. Les généralités sur les puces à ADN..... 41
III.2. L'application au MM 42
III.2.1. La nouvelle classification du MM à partir des puces à ADN.....42
III.2.2. Dans l'avancée d'une meilleure compréhension de la biologie des cellules tumorales.....43
III.2.3. Etudier le rôle du microenvironnement dans le MM 45
III.3. Les objectifs de la thèse 48

RESULTATS ET DISCUSSION

I. La présentation du système insuline/IGF.....49
I.1. Les généralités 49
I.2. La structure des ligands et des récepteurs de la famille insuline/IGF 50
I.2.1. L'INSR et l'IGF-1R.....50
I.2.2. L'IGF-2R 52
I.2.3. L'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 52
I.2.4. La superfamille des IGFBP.....54
I.2.5. Les affinités du système insuline/IGF 55
I.3. Le rôle des ligands et récepteurs de la famille insuline/IGF 57
I.3.1. La fonction physiologique du système insuline/IGF 57
I.3.2. La transduction du signal insuline/IGF.....61
I.3.3. Les fonctions biologiques du système insuline/IGF 63
I.4. Le système insuline/IGF dans les cancers 71
I.4.1. L'IGF/IGF-1R dans les cancers 71
I.4.2. L'insuline/INSR dans les cancers 80
I.4.3. Le récepteur hybride INSR/IGF-1R dans les cancers 85
I.4.4. Le système insuline/IGF dans le MM.....86
II. Résultats et discussion.....90
II.1. Article 3 90
"The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor" Blood, 2009, 113: 4614-4626.
II.2. Article 4 93
"The BAFF/APRIL inhibitor - TACI-Fc – induces the survival and the proliferation of myeloma cell lines, promoting an autocrine IGF-1/IGF-1R loop" soumis.
II.3. Article 5 93
"Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin receptor/IGF-1 receptor activation" soumis
II.4. Discussion 97
III. Discussion générale 103

Bibliographie……..113

Liste des principales abréviations

aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ALS	Acid labil subunit
APRIL	A proliferating-inducing ligand
AREG	Amphiregulin
BAFF	B-cell activating factor
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	B cell receptor
BMPC	Plasmocyte mature (Bone marrow plasma cell)
BMSC	Bone marrow stromal cell
CAM-DR	Cell adhesion mediated drug resistance
CCR	Chemokine, CC motif, receptor
CD	Cluster of differentiation
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CXCR	CXC chemokine Receptor
CRP	C-reactive protein
DKK-1	Dickkopf-1
EC	Endothelial cell
EGF	Epidermal growth factor
EFS	Event-free survival
ErbB	Epidermal growth factor receptor (EGFR) family
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FDA	Food & administration USA
FDG	Fluorodéoxyglucose
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
Frzb	Frizzled-related protein
GH	Growth Hormone
GHR	GH receptor
GHRH	GH releasing hormone
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMCL	Human myeloma cell line
HRD	hyperdiploïde
HSPC	Hematopoietic stem progenitor cell
Hybrid-R	Récepteur hybride INSR/IGF-1R
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig, IgH, IgL	Immunoglobuline, heavy Ig, light Ig
IGF	Insulin like growth factor
IGF-R	Récepteur à l'IGF
IGFBP	IGF binding protein
IGFBPrP	IGFBP related protein
IL, IL-R	Interleukine, récepteur d'interleukine
INSR	Récepteur à insuline
INSRR	INSR related
IRS	Insulin receptor substrate

ISS	International staging system
JAK	Janus kinase
KO	Knock out
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MGUS	Monoclonal gammapathy of unknown signification
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MM	Myélome Multiple
MMC	Myélome Multiple cell
MMP	Metalloproteinase
MO	Moelle osseuse
MSC	Mesenchymal stem cell
mTOR	Mammalian target of rapamycine
NHRD	Non hyperdiploïde
NRG	Neuregulin
NF-κB	Nuclear factor κB
OB	Ostéoblastes
OC	Ostéoclaste
OAS	Overall survival
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	OPG ligand
PCL	Plasma cell leukaemia
PCLI	Plasma cell labeling index
PI-3K	Phasphatidylinositol-3 kinase
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RB	Retinoblastome
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SDF-1	Stromal cell Derived Factor-1
sFRP-2	Secreted frizzled-related protein 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACI	Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA	very late antigen
Wnt	Wingless integration site

INTRODUCTION

I. Les généralités du Myélome Multiple

Le myélome multiple (MM) est une néoplasie B caractérisée par la prolifération d'un clone plasmocytaire tumoral dans la moelle osseuse. Chaque année, environ 15000 nouveaux cas sont diagnostiqués en Europe et 15000 aux Etats Unis. Cette pathologie représente environ 1% des cancers et 10 à 15% des hémopathies malignes. L'âge moyen de diagnostic du myélome est 67 ans. Le tableau clinique se caractérise par des lésions osseuses, une anémie, des infections récurrentes et une atteinte rénale. Ces différents symptômes sont liés à l'envahissement médullaire par des plasmocytes tumoraux myélomateux sécrétant une immunoglobuline (Ig) monoclonale et à une forte production de cytokines pro inflammatoires, en particulier l'interleukine 6 (IL-6). Le MM reste une maladie pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif.

I.1. L'origine de la cellule tumorale myélomateuse

La différenciation du lymphocyte B (LB) normal comprend 4 grands stades corrélés avec le réarrangement des gènes d'immunoglobulines (Ig). (1) **la cellule pro-B** (progéniteur B) présente dans la moelle osseuse subit des réarrangements des gènes du locus de la chaîne lourde des Ig (IgH pour « Heavy Ig ») : d'abord une recombinaison entre un segment D et J, puis un second réarrangement entre un segment V et le complexe DJ. Elle devient alors une **cellule pré-B** (précurseur B) (2) qui exprime un pré-BCR (B cell receptor). Ces précurseurs pré-B prolifèrent, permettant d'expandre ce compartiment. Les cellules pré-B sont ensuite soumises à un réarrangement du locus (locus κ ou λ) de la chaîne des Ig légères (IgL pour « Light Ig »), ce qui conduit à des **cellules B immatures** (3) possédant un BCR fonctionnel sous forme d'IgM. Le stade de **cellule B mature** (4) est caractérisé par une co-expression membranaire de l'IgM et IgD. Ces LB matures naïfs quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes pour poursuivre leur différenciation, après contact avec l'antigène (Ag). Dans les organes lymphoïdes secondaires, l'activation des LB de manière T-dépendante va déclencher leur division.

Une partie de ces cellules B se différencie en plasmocytes sécrétant des anticorps IgM de faible affinité (plasmocytes à courte durée de vie). Certains LB actifs vont après dans un follicule pour créer le centre germinatif. Les cellules seront soumises à des hypermutations somatiques au niveau des régions variables réarrangées de l'Ig, permettant de sélectionner les LB avec une forte affinité pour l'Ag. L'affinité de liaison du BCR pour l'Ag (stade centroblaste) sera alors modifiée. Ce processus permet de sélectionner uniquement les cellules exprimant un BCR de forte affinité pour l'Ag (stade centrocyte). Les centrocytes sélectionnés de façon positive vont ensuite subir une commutation isotypique qui engendrera un changement de classe de l'IgM vers IgG, IgA ou IgE membranaire. Ces LB générés vont se différencier soit en LB mémoires soit en plasmablastes qui rejoindront la moelle osseuse ou les muqueuses où ils termineront leur différentiation en plasmocytes matures, synthétisant des Ig en grandes quantités (plasmocytes à longue durée de vie). Cette dernière étape de différentiation intramédullaire des plasmablastes en plasmocytes reste peu connue (Figure 1).

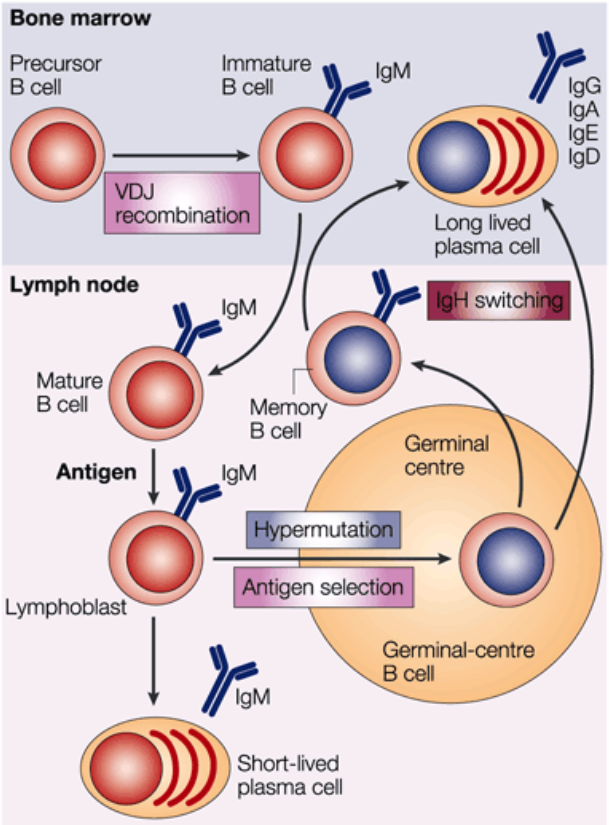


Figure 1 : La différenciation plasmocytaire selon Kuehl et al.[12] Les cellules B précurseur (pro-B puis pré-B), présentes dans la moelle osseuse, subissent des réarrangements des gènes du locus de la chaîne lourde des IgH (segments VDJ) et de ceux de la chaine des IgL, ce qui conduit à des cellules B immatures. Les cellules exprimant un BCR fonctionnel de type IgM (cellules B matures) quittent la moelle osseuse et vont dans la circulation périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes. Après contact avec un antigène, ces cellules vont soit se différencier en plasmocytes à courte durée de vie ou soit former un centre germinatif où seulement les lymphocytes B de forte affinité seront sélectionnés (mécansimes d'hypermutation et de sélection des antigènes). A l'issu de ce processus, les lymphocytes sélectionnés vont se différencier soit en lymphocytes B mémoires soit en plasmablastes qui rejoindront la moelle osseuse où ils termineront leur différentiation en plasmocytes à longue durée de vie.

L'analyse des séquences des régions variables des Ig des cellules de myélome a mis en évidence l'existence de mutations au niveau des chaînes d'Ig, sans variation intra-clonale, majoritairement sur les chaînes lourdes [1,2]. Cette observation démontre que le plasmocyte tumoral est issu d'une cellule qui a été sélectionné par l'Ag au cours d'une réaction dans un centre germinatif [3].

Le phénotype du plasmocyte tumoral est un intermédiaire entre le stade plasmablastique et plasmocytaire mature : son index de prolifération est notamment inférieur à celui des plasmablastes (moins de 1%), par ailleurs, il sécrète des taux d'Ig très inférieurs aux plasmocytes matures [4].

L'oncogenèse du MM a été décrite comme étant un modèle multi-étape comprenant 5 stades [5]: genèse à partir d'une **cellule B du centre germinal**, apparition d'une **gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS)** pouvant évoluer vers un **MM intramédullaire** (incidence de 1% par an [6]), lequel peut progresser vers une forme de **MM extramédullaire** (les leucémies à plasmocytes : PCL ou autre localisations), stade à partir duquel les **lignées de MM** (HMCLs) sont obtenues [7].

I.2. Les anomalies cytogénétiques du MM

Au cours du MM, de multiples anomalies cytogénétiques s'accumulent. Elles peuvent être détectées par des techniques d'hybridation *in situ* (FISH) sur des cellules non proliférantes [8]. Ces anomalies sont résumées dans la Table 1 et dans la Figure 2.

Table 1 : Classification moléculaire cytogénétique proposée par l'International Myeloma Working Group (Fonseca et al. [9])

	% patients	Principales caractéristiques
Hyperdiploïde	**45**	meilleur pronostic, patients agés, IgG-κ
Non Hyperdiploïde	**40**	aggresif, IgA-λ, patients plus jeunes
translocation cycline D	18	
t(11 ;14)	16	surexpression de la cycline D1, bon pronostic, lésions osseuses.
t(6 ;14)	2	
t(12 ;14)	< 1	rare
translocation MMSET	15	
t(4 ;14)	15	surexpression MMSET, surexpression de FGFR3 dans 75% des cas, mauvais pronostic avec thérapies conventionnelles, lésions osseuses moins fréquentes
translocation MAF	8	aggresif
t(14 ;16)	5	
t(14 ;20)	2	
t(8 ;14)	1	
non classé	**15**	divers sous types

I.2.1. Le premier évènement oncogénique

1) La translocation de l'IgH

La principale anomalie cytogénétique décrite au cours de MM (40% des cas) est une **translocation au niveau des gènes codant pour l'IgH sur le locus 14q32**. Cette translocation est due à une erreur dans le processus de réarrangement des Ig durant la commutation isotypique. La translocation de l'IgH (locus 14q32) entraîne une dérégulation d'un oncogène par juxtapositon d'une région proche d'un élément activateur de la transcription : l'Ig enhancer, ce qui conduit à la transcription de ces oncogènes. 3 partenaires chromosomiques récurrents sont le plus souvent associés à cette translocation [10-12] :

- le chromosome 11q13, engendrant une dérégulation de la cycline D1,

- le chromosome 4p16, marqué par une dérégulation de l'expression de MMSET et de FGFR3,
- le chromosome 16q22-23, associé à une surexpression de c-maf.

2) Les trisomies

Une autre anomalie chromosomique observée dans 30% des cas n'implique pas de translocation au niveau d'un locus Ig mais résulte de **multiples trisomies impliquant les chromosomes 3, 5, 7, 11, 15, 19 et 21 [13].** Ce mécanisme est peu connu.

3) La classification en 2 voies de pathogénèse

Les anomalies cytogénétiques issues du premier évènement oncogénique permettent d'identifier 2 voies de pathogenèse différentes qui se rejoignent partiellement :

- Cas des **MM non hyperdiploïdes** (NHRD), associés principalement à une **translocation récurrente de l'IgH** (> 85%)
- Cas des **MM hyperdiploïdes** (HRD) associés, majoritairement à des **trisomies multiples** et une incidence de translocation de l'IgH plus faible (< 30%) [14].

4) La dérégulation des cyclines D

Ces anomalies chromosomiques décrites (translocation IgH et trisomies) sont également observées dans les cellules de patients atteints de MGUS [15,16]. Ce premier évènement oncogénique commun au MGUS et MM aurait pour conséquence de déréguler les cyclines D, gènes favorisant le cycle cellulaire : ce constat est surprenant dans la mesure où les cellules de MGUS et de MM sont non proliférantes, au même titre que le plasmocyte normal. Rappelons que l'index de prolifération cellulaire (PCLI pour « plasma cell labeling index ») d'un MM est d'environ 1% (médiane) et celui du MGUS est inférieur à 0,2%, contrairement aux plasmablastes hautement prolifératifs (plus de 30% de cellules en phase S). En effet, les translocations de l'IgH créent une dérégulation directe de la *cycline D1* (11q13) et de la *cycline D3* (6p21) ou indirecte de la cycline D2 *via MAF* (16q23) ou *MAFB* (20q11) qui code pour un facteur de transcription ciblant le gène de la *cycline D2*. Les cellules tumorales caractérisées par la translocation t(4 ;14) ciblant *MMSET/FGFR3* expriment le même niveau de cycline D2 que le plasmablaste [17]. Les MM HRD (les multiples trisomies des chromosomes) expriment la cycline D1, qui est absente des

plasmablastes et des plasmocytes normaux, sans pour autant présenter une translocation t(11 ;14). Ce mécanisme est peu connu.

Une faible proportion des patients atteints de MM n'exprime pas les gènes codant pour les cyclines D. Une explication serait une absence ou une faible expression de la protéine du rétinoblastome RB1, « frein » du cycle cellulaire qui est la cible des cyclines D, et donc une expression de cycline D ne serait plus nécessaire [18].

La translocation IgH et les trisomies (qui ont des incidences plus faibles chez les patients de MGUS) ont une fréquence qui augmente avec la progression de maladie. Ainsi chez 50% des patients atteints de cas de MGUS, 55-75% des cas de MM intramédullaire, 85% des cas de PCL et dans plus de 90% des HMCLs une translocation de l'IgH est observé [19]. Cela suggère que ces changements cytogénétiques sont des événements précoces qui progressent durant l'évolution de la maladie.

De plus, les MGUS ont un risque de 1% par an d'évoluer vers un MM [6], ce qui laisse à penser que les cellules de MGUS sont des « pré-MM ». Néanmoins, la cellule myélomateuse se distingue de la cellule de MGUS par une sécrétion plus importante d'Ig monoclonale, un index de prolifération plus élevé et une occupation de la moelle osseuse plus importante (> 10%) [20]. Le premier évènement, commun au MGUS et MM, permet donc d'initier l'oncogenèse qui va progresser par le biais d'autres aberrations chromosomiques.

I.2.2. Le deuxième évènement oncogénique

1) Les anomalies du chromosome 13

La **délétion de bras court du chromosome 13 (del13)** ou moins fréquemment la translocation du locus 13q14 est retrouvée chez 50 % des cas. La del13 est généralement associée avec les translocations de l'IgH (70%) et majoritairement avec la t(4 ;14) puisque 90% des t(4 ;14) sont caractérisées par une del13 [21,22]. Les anomalies du chromosome 13 sont plus rarement retrouvées en présence des trisomies (40%) [23]. Le rôle du chromosome 13 est méconnu.

2) La dérégulation de MYC

Les **anomalies de *Myc*** sont absentes ou rares dans les MGUS mais sont décrites dans 15% des cas de MM intramédullaire, 45% des formes de MM extramédullaire et presque 90% des HMCLs [24]. La dérégulation de myc représente donc un évènement

très tardif de la progression. Les réarrangements de c-myc sont les plus fréquents (N-myc et L-myc sont plus rarement concernés). Ces anomalies sont très hétérogènes mais sont majoritairement des réarrangements complexes ou **insertions** impliquant 3 chromosomes différents [12]. Comme vu précédemment, le locus IgH peut être mis en jeu dans ces translocations dans 40 à 60% des cas. Ces anomalies liées à Myc engendrent une forme plus agressive et proliférante de la maladie [25].

3) Les mutations de RAS ou de FGFR3

Les mutations de ***N-ras* ou de *K-ras*** concernent environ 30 à 40% des cas de MM au diagnostic et cette fréquence varie très peu au cours de la maladie. N-Ras et K-Ras, qui sont des oncogènes, induisent une transformation maligne [26]. La fréquence de ces maladie étant de 5% dans les cellules de MGUS [27], les mutations de *RAS* pourraient contribuer à la transition MGUS à MM. Les mutations activatrices de *RAS* entraînent les mêmes effets que la surexpression de *FGFR3*, induite par la t(4 ;14), c'est-à-dire une activation constitutive de la voie MAP-Kinase [28].

4) L'activation de la voie NF-κB

Il a été décrit que **l'activation de la voie NF-κB** joue un rôle important dans l'oncogenèse du MM. Une activation constitutive de cette voie a été identifiée dans 20% des MMC et 50% des HMCLs. La principale mutation touche le gène ***TRAF3*** chez 13% des patients. Des mutations de ***TRAF2, cIAP1/2 et CYLD*** ont aussi été identifiées. Il existe également des translocations chromosomiques conduisant à une activation de cette voie tels que ***NIK, CD40, LTBR, TACI, NFKB1 et NFKB2*** [29,30].

5) La voie du rétinoblastome (RB) : p16, p18

En plus des cyclines D, d'autres acteurs de la voie RB sont également dérégulés [31]. Rappelons que la protéine Rb bloque la transition G1/S du cycle cellulaire et que la phosphorylation de Rb lève cette inhibition. L'inhibition de la protéine Rb peut être entraînée soit par la surexpression des cyclines D (mécanismes majoritaires dans le MM), soit par l'inactivation de protéines inhibitrices (p16, p15, p18) des complexes cyclines D/CDK (kinases dépendantes des cyclines) ou soit par délétion ou mutation du gène du Rb. Dans le MM, la **délétion du gène du Rb** n'est pas fréquente (moins de 10% MM et HMCLs) et aucune mutation n'a été identifiée [32]. Les gènes **p16** et

plus rarement p15 sont retrouvés méthylés dans 30% des MMC et HMCLs alors que **p18** est inactivé par délétion bi-allélique dans 10% des MMC et 30% des HMCLs [8].

6) L'inactivation de la p53 ou del17

La p53, gène de suppresseur de tumeur, bloque l'entrée du cycle cellulaire.

Les **mutations de la *p53*** sont relativement rares dans les MM au diagnostic (5%) mais cette fréquence semble augmenter avec la progression tumorale et est retrouvée dans 30% des PCL et 65% des HMCLs [33]. Il en est de même pour les **délétions de *p53*** qui se produisent dans 10% des MM et environ 40% des PCL et HMCLs [34]. Une autre délétion, **la del17,** touche également la voie de la p53 soit par une inactivation épigénétique de p53 ou soit par une augmentation de l'expression de MDM2 (protéine destructrice de p53) [34]. La del 17 est une des anomalies cytogénétiques les plus importantes associée à un facteur de mauvais pronostic [35].

7) Le gain du chromosome 1q21

Un **gain du chromosome 1q21** est retrouvé dans 30 à 40% des cellules de MM [36]. Ce gain, qui est principalement associé avec les translocations t(4;14) ou t(14;16), entraîne un fort pouvoir de prolifération. La surexpression de *CKS1B,* cible du gain 1q21, serait l'origine de cette augmentation de prolifération [37].

8) La mutation de PTEN

PTEN est un gène de suppresseur de tumeur impliqué dans la voie PI3K/AKT. Une **mutation inhibitrice de PTEN**, qui se produit dans 6% des MMC, 20% des PCL et HMCLs, bloque la croissance des cellules [38].

Contrairement à la translocation de l'IgH qui se produit majoritairement dans les MM de type NHRD, le second évènement (perte 17p ou mutation p53, mutations de RAS, et anomalies de MYC) se produit avec une prévalence similaire entre les MM HRD et NHRD.

I.2.3. La classification du MM et valeurs pronostiques

Ces différentes aberrations cytogénétiques entraînent des progressions plus ou moins rapides de la maladie et, de ce fait, des survies différentes.

Il a été observé que les MM extramédullaires et les HMCLs présentent le plus souvent un phénotype de MM NHRD. Il a ainsi été proposé que les MM NHRD seraient moins dépendants du stroma que les MM HRD. Cette hypothèse serait renforcée par le fait que les MM NHRD ont un plus mauvais pronostic que les MM HRD [39].

Par la suite, des études ont été menées en vue d'établir un lien entre la survie et les anomalies génétiques. La del13 a été la première anomalie chromosomique décrite comme étant associée à un mauvais pronostic. Récemment, l'équipe de Avet-Loiseau [35] a publié une étude sur les incidences des principales aberrations chromosomiques (del13, t(11 ;14), t(4 ;14), hyperdiploïdie, translocation de MYC et del17) sur la survie des patients atteints de MM. Dans cette étude, seules la del13, t(4 ;14), l'absence d'hyperdiploïdie et la del17 sont des facteurs de mauvais pronostic alors que la t(11 ;14) et les translocations de MYC n'ont aucune incidence sur la survie. Il est à noter que la valeur pronostique de la del13 n'est significative que lorsque cette anomalie est associé à la t(4 ;14) ou la del17. Considérée de manière isolée, la del13 n'a en effet aucun impact sur la survie.

2 grandes classifications ont été établies dans le MM :

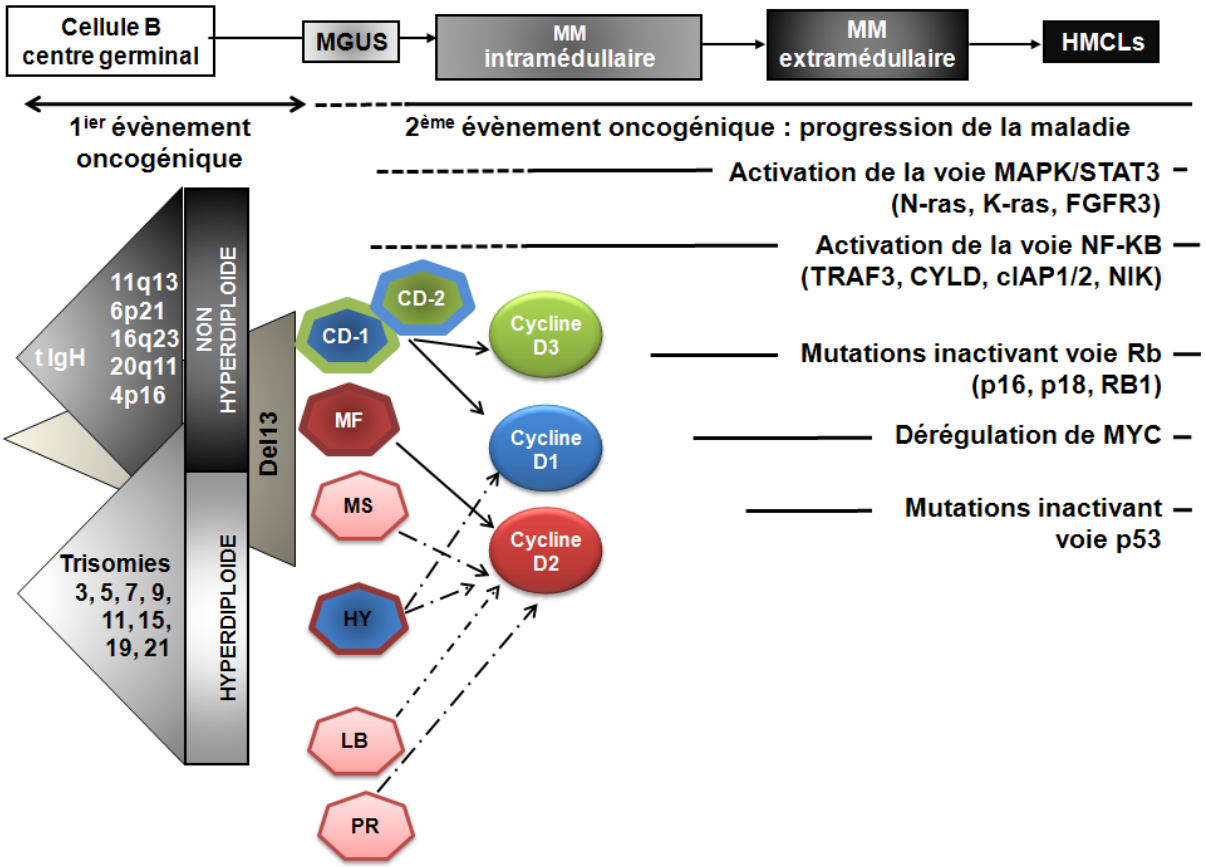
- la classification « **cycline D et translocation » (TC)** subdivisée en 8 groupes en fonction de l'expression des cyclines D et de la présence des 4 translocations récurrentes ciblant *MMSET, cycline D1, cycline D3* et *MAF* [18]. En plus des groupes **MMSET, cycline D1, cycline D3 et MAF**, cette classification fait également mention de deux groupes de **MM HRD** exprimant soit **uniquement la cycline D1** ou soit les **cyclines D1 et D2**, d'un autre groupe exprimant la **cycline D2 sans une translocation t(14 ;16)** et d'un dernier groupe n'exprimant **aucune cycline D.**
- la **classification moléculaire** définissant 7 groupes à partir de l'analyse au diagnostic des profils d'expression de gènes (GEP) de plus de 400 patients traités par la suite par chimiothérapie intensive associée à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) [40].

Ces 2 classifications basées sur des 2 approches différentes sont concordantes sur de nombreux aspects [41]. 5 groupes correspondant à l'hyperdiploïdie et aux principaux oncogènes dérégulés sont retrouvés en commun : les groupes **MS (MMSET), MF (MAF), CD-1 et CD-2 (cycline D1 et cycline D3) et HY (MM HRD).** Les 2 groupes divergents sont le groupe **LB (low bone disease)** qui concerne

majoritairement les dérégulations de la cycline D2 sans la t(14 ;16) de TC et le groupe **PR** (**prolifération)** qui rassemblent le reste de la classification de TC (un mélange des différents groupes non concordants).

En analysant la survie des patients atteints de MM, la classification moléculaire a permis de répartir les 7 groupes en groupes de bon ou de mauvais pronostic. Ainsi les groupes **HY, CD-1, CD-2, LB sont définis de « faible risque »** et les groupes **PR, MS, MF de « haut risque »** [40]**.** Cette classification moléculaire du MM a « simplifié » la vision de cette maladie hétérogène en la divisant en 7 groupes associés à la notion de pronostic en terme de survie. Elle constitue une avancée dans la compréhension de cette pathologie avec également des applications cliniques potentielles.

Figure 2 : L'oncogenèse moléculaire du MM. Les évènements oncogéniques du MM sont représentés en fonction des stades de la maladie et de la classification moléculaire [40]. Le premier évènement oncogénique, précoce dans la pathologie, est commun au MGUS et MM. Il comprend 2 catégories : les translocations de l'IgH (t IgH) ou les trisomies. La délétion du chromosome 13 (del13) peut se produire dans les 2 groupes. Le second évènement (translocations secondaires IgH et c-myc, mutation RAS et p53…), présent majoritairement dans les MM, a la même prévalence dans les 2 groupes du premier évènement. La classification moléculaire divise 7 groupes de MM en fonction des anomalies caryotypiques survenues à l'issue du premier évènement oncogénique. Ces groupes convergent dans leur conséquence : la dérégulation des gènes des cyclines D qui sont les « initiateurs » de l'oncogenèse du MM.



I.3. Les traitements du MM

I.3.1. Le système de l'ISS

Le MM est diagnostiqué par la mise en évidence d'une Ig monoclonale dans le sérum ou dans l'urine, détecté par une électrophorèse du sérum, une immunofixation et un myélogramme. Les différents stades de la maladie étaient auparavant classés selon le système Salmon-Durie [42]. Depuis 2005, les critères établis par « the International Myeloma Working Group » sont utilisés. Ce nouveau « international staging system » (ISS) répartit les patients atteints de MM en 3 groupes en fonction de la concentration sérique de β2-microglobuline et d'albumine. Cette classification permet de distinguer les MM asymptomatiques (MM smouldering) qui n'ont pas besoin de traitement dans l'immédiat et les MM symptomatiques ou actifs qui nécessitent un traitement [43].

Table 2 : le système de l'ISS

Stades	Concentrations sériques (mg/L)	Médiane de survie (mois)
Stade I	β2-microglobuline < ou = 3.5 mg/L et albumine > ou = 35 mg/L	62 mois
Stade II	β2-microglobuline < 3.5 mg/L et albumine < 35 mg/L ou β2-microglobuline compris entre 3.5 et 5.5 mg/L	44 mois
Stade III	β2-microglobuline > ou = 5.5 mg/L	29 mois

Ce système permet d'évaluer le pronostic de la maladie en complément d'autres facteurs biologiques tels que l'âge, le PCLI, la protéine C réactive (CRP), la créatininemie, le taux d'hémoglobine, la calcémie, le taux sérique de lactate déshydrogénase (LDH), le pourcentage de plasmocytes circulants, la sous-classe d'Ig …

I.3.2. Les traitements standards et les nouvelles drogues

La première approche thérappeutique ayant conduit à des résultats satisfaisants est la combinaison du **melphalan** (agent alkylant) et de la **prednisone** (glucocorticoïde). Le traitement du MM a été amélioré par l'utilisation d'une **chimiothérapie intensive**

associée à une autogreffe de cellules souches hématopoiétiques du sang périphérique (CSP) prélevées après mobilisation**.** L'autogreffe de CSP a permis d'élever significativement la médiane de survie, qui était de 3-4 ans avec un traitement conventionnel, à 5-7 ans avec une chimiothérapie à haute dose combinée avec une autogreffe de CSP [44]. Les traitements du MM sont évalués par des critères de réponses définis dans la Table 3.

Table 3 : Les critères de réponse aux traitements [45]

Rémission complète	- disparition complète de l'Ig monoclonale sérique et urinaire - < 5% plasmocytes dans MO
Rémission partielle	- diminution du taux d'Ig monoclonale sérique de plus de 50% - diminution du taux d'Ig monoclonale urinaire de plus de 90% - absence de nouvelle lésion ostéolytique et calcémie normale - correction au moins partielle des douleurs osseuses et de l'anémie
Échec	- variation du taux d'Ig monoclonale ne dépassant pas 25% - variation du taux de protéinurie monoclonale ne dépassant pas 50% - stabilité des autres paramètres
Progression (Rechute)	Présence ou évolution de plus de 25% (ou de 50%) d'un ou plusieurs des signes suivants : - augmentation du taux d'Ig monoclonale sérique et urinaire - apparition ou développement de lésions ostéolytiques et de localisations plasmocytaires extra osseuses - >10% plasmocytes dans la MO - l'hypercalcémie (anémie ou élévation de la créatininémie)

Deux études récentes montrent que les patients ayant des réponses complètes ont une meilleure survie que ceux qui n'en ont pas (médiane de survie : 6,2 ans *versus* 2,3 ans). Cependant, la durée de la réponse complète est le paramètre le plus important, ce qui peut nécéssiter de poursuivre des traitements de maintenance [46,47].
Les nouveaux traitements utilisés seuls ou en combinaison avec les précédents ont permis de prolonger la survie des patients atteints de MM et sont principalement :

- la **thalidomide,** utilisée dans les traitements de cancer pour son effet anti-angiogénique [48]
- le **lénalidomide,** analogue de la thalidomide décrit comme étant plus efficace et moins toxique [49]
- le **bortezomib**, inhibiteur du protéasome qui bloque la dégradation des protéines intracellulaires et donc entraîne un arrêt du cycle cellulaire, un effet anti-angiogénique, une induction de la réponse au stress et l'apoptose [50].

1) Le cas du MM au diagnostic

Différentes études ont montré que les patients traités avec une de ces drogues combinée à la dexaméthasone avant l'autogreffe des CSP et/ou en traitement de maintien obtenaient significativement un meilleur taux de réponse et une meilleure progression sans évènement que ceux qui avaient reçu la dexaméthasone seule [51,52 53].

Suite à ces résultats, d'autres études de combinaison thérapeutiques ont été menées. Ainsi, une étude a montré que l'association « bortezomib + thalidomide + dexaméthasone » conduisait à un meilleur taux de réponse que la combinaison « thalidomide + dexaméthasone » (réponse complète = 38% *versus* 7% - réponse partielle = 60% *versus* 25%) et contrecarrait l'effet potentiel de mauvais pronostic des anomalies cytogénétiques [54]. Une deuxième étude a montré également de bons résultats en associant « lénalidomide + bortezomib + dexaméthasone » avec 71% réponse partielle et 36% réponse complète en première ligne de traitement [55].

Ces résultats suggèrent la supériorité de ces nouvelles drogues en combinaison avec la dexaméthasone en comparaison avec les approches conventionnelles basées sur un traitement d'induction avant l'autogreffe des CSP. En revanche, un recul est nécessaire afin d'évaluer leuur effet à long terme et l'impact sur la survie globale.

Pour les patients qui ne peuvent pas recevoir d'autogreffe de CSP (âge > 65 ans en particulier), le traitement standard est l'association du **melphalan**, de la **prednisone** et de la **thalidomide**. Des études ont aussi été menées sur la combinaison des nouvelles drogues avec ces traitements standards. La combinaison de « melphalan + prednisone » avec le lénalidomide ou le bortezomib sont en cours d'évaluation.

Une autre étude confirme les données sur le bortezomib et souligne qu'il peut contrecarrer également la notion de mauvais pronostic associé aux anomalies cytogénétiques telles que la t(4 ;14), la del17 ou la del13 [56]. Cependant, ces études concernent un petit nombre de malades présentant ces anomalies et doivent être confirmées.

Ces résultats montrent, tout comme dans le cas de la chimiothérapie intensive couplée à l'autogreffe des CSP, que les nouvelles drogues ont contribué à une avancée dans la prise en charge des patients atteints de MM.

2) Le cas des MM en rechute, en progression ou réfractaire

La dexaméthasone fut le premier traitement administré aux patients en rechute ou réfractaires aux traitements [57]. Des combinaisons de « dexaméthasone + **doxorubicine** (agent intercalant de l'ADN) + **vincristine** (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) » (VAD) ont augmenté la réponse des patients résistants aux drogues alkylantes (réponse = 65% *versus* 21%) [58].

Un autre traitement repose sur l'autogreffe de CSP. Plusieurs études ont montré un bénéfice de l'autogreffe de CSP administrée à des patients en rechute ou réfractaires avec une EFS et survie globale (OAS) prolongées malgré certains effets toxiques, voire mortels, dus au traitement [59,60]. Dans le cas des patients en rechute (après plus de 3 ans) et ayant déjà reçu une autogreffe des CSP, le bénéfice d'une seconde transplantation a été démontré sur l'EFS mais pas sur l'OAS [61,62].

Une autre possibilité est **l'allogreffe** de cellules souches hématopoïétiques et de lymphocytes T afin d'éliminer les cellules tumorales mais ce traitement engendre une mortalité et une morbidité sévères, dues à l'effet de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) et à la pancytopénie induite par le traitement myéloablatif [63].

Les alternatives sont l'administration de nouvelles drogues en combinaison avec la dexaméthasone. Ainsi, l'association de la dexaméthasone avec la thalidomide, le lénalidomide ou le bortezomib ont amélioré le taux de réponse des patients [64 65,66]. Des études ont montré que le lénalidomide ou le bortezomib associé à la dexaméthasone conduisait à un taux de réponse élevé (jusqu'à 65%) ainsi qu'à une augmentation de l'OAS en comparaison avec l'administration de dexaméthasone seule (OAS prolongée de 6 mois) [67,68]. Le bortezomib, qui est la première drogue à engendrer un fort taux de réponse sur des patients de MM en rechute, possède la propriété de sensibiliser les MMC aux chimiothérapies [69].

Ces études suggèrent que les nouvelles drogues ont également apporté un bénéfice chez les patients réfractaires ou en rechute. Cependant, ces options thérapeutiques doivent être adaptées selon les lignes de traitements administrées antérieurement et le contexte clinique.

La thalidomide, le lénalidomide et le bortezomib ont amélioré la durée et le taux de réponse, l'EFS et l'OAS des patients atteints de MM nouvellement diagnostiqués, en rechute ou réfractaires. Pour les patients nouvellement diagnostiqués, des études cliniques devraient évaluer la survie à long terme de ces nouveaux traitements ainsi

que le bénéfice de l'autogreffe de CSP. Pour les patients réfractaires, des études cliniques sur la combinaison de ces nouveaux traitements sont menées avec comme objectif d'augmenter l'efficacité, de s'opposer à la chimiorésistance et de réduire les effets secondaires.

En conclusion, depuis 5 ans, de nouvelles molécules ont été utilisées : le bortezomib, la thalidomide et le lénalidomide et sont maintenant approuvées par la FDA (USA Food & Administration) pour le traitement du MM. Malgré ces progrès thérapeutiques, le MM reste une pathologie incurable avec une faible amélioration de survie globale et une rechute inéluctable d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies ciblées. De plus en plus de nouveaux inhibiteurs sont testés dans des essais précliniques et cliniques avec une efficacité variable. Ces avancées sont la conséquence d'une meilleure compréhension de la biologie du MM qui ne cesse d'évoluer, ouvrant la voie vers un large panel de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

II. L'environnement médullaire du MM

Le microenvironnement médullaire comprend une population hétérogène de cellules et un compartiment extracellulaire, le tout étant organisé en une architecture complexe. Les MMC, localisées au sein de la moelle osseuse, coexistent et interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire et le compartiment non hématopoïétique caractérisé par les cellules stromales (BMSC) contenant les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoclastes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les adipocytes. Les autres composantes de la moelle sont issus du compartiment hématopoïétique composé par les monocytes, les polynucléaires et les lymphocytes [70]. Rappelons que le cycle cellulaire des MMC est dérégulé (avec en particulier une expression élevée de cyclines D). Cette dérégulation du cycle n'est cependant pas suffisante à engendrer la survie et la prolifération des MMC : en dehors de l'environnement médullaire, les MMC meurent rapidement par apoptose. Ces différents acteurs moléculaires et cellulaires jouent ainsi un rôle essentiel dans le développement et la progression du MM. Par ailleurs, certaines données indiquent que l'environnement myélomateux contribue aux phénomènes de résistance à la chimiothérapie.

II.1. L'adhésion des cellules de MM aux cellules stromales et aux protéines de la matrice extracellulaire

L'expression de **CXCR4** par les plasmocytes et la présence de la chimiokine **SDF-1α** dans la MO permet le recrutement des MMC dans la MO [71]. Ces cellules vont ensuite adhérer aux protéines de la matrice extracellulaire (telles que le collagène, la fibronectine, la laminine et la vitronectine) et aux cellules stromales grâce à l'expression de molécules d'adhésion.

Les MMC expriment 3 principales molécules d'adhésion qui permettent une liaison des MMC impliquées dans ces interactions :

- **VLA-4 et VLA-5** (very-late-activating antigens 4 et 5), qui se lient à la **fibronectine** et à la **laminine** de la matrice extracellulaire ou à **VCAM-1** présent sur les cellules stromales [72].

- **LFA-1,** qui se lie à **ICAM-1** présent sur les cellules stromales [73].
- **Syndecan-1** qui se lie au **collagène de type I** de la matrice extracellulaire [74].

Ces adhésions sont renforcées par la présence de cytokines présentes dans le milieu. SDF-1α modulerait ainsi l'expression de VLA-4 par les MMC [71] et le TNF-α induirait, par un mécanisme dépendant de la voie nuclear factor kappa-B (NF-κB) une augmentation à la surface des cellules de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1.
Ces différentes adhésions entre MMC, protéines de la matrice extracellulaire et cellules stromales ne permettent pas seulement la localisation de ces cellules dans la moelle, mais favorisent également la survie et la croissance des MMC. **L'adhésion des MMC à la fibronectine par VLA-4 et VLA-5 inhibe l'apoptose** induite par FAS *via* une activation de la caspase 8 [75]. Cette interaction confère une protection des cellules contre l'apoptose induites par les traitements conventionnels [76]. Cette résistance aux drogues (CAM-DR) est liée par une augmentation de l'expression de la protéine p27 et à un arrêt du cycle cellulaire [77].
De plus, les interactions des MMC avec les BMSC induisent une activation des voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération des MMC :

- la voie **Ras/Raf/mitogen-activated protein (MAPK) kinase (MEK),** qui engendre une prolifération des cellules de MM,
- la voie **janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3),** qui bloque l'apoptose des MMC,
- la voie **NF-κB,** qui active le cycle cellulaire et inhibe l'apoptose,
- la voie **phosphatidynol-3 kinase (PI3K)/Akt,** qui favorise le cycle cellulaire, une migration et un effet anti-apoptotique (*via* NF-κB).

Ces mécanismes induits soit par contact direct avec les cellules stromales soit indirectement par une sécrétion de facteurs solubles entraînent une induction des cyclines D, des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1) et une activité télomérase dans les MMC [14].

II.2. Le rôle des cytokines et des facteurs de croissance dans le MM

L'interaction entre les cellules myélomateuses et l'environnement médullaire favorise la production de cytokines par les cellules tumorales elles-mêmes et par les cellules de l'environnement. Ces facteurs, présents à de fortes concentrations dans la MO, vont permettre la progression du clone tumoral. Plus d'une quinzaine de facteurs de croissance myélomateux ont été identifiés.

II.2.1 L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 a un rôle majeur dans la survie et la prolifération des plasmocytes tumoraux [78,79]. Ce facteur de croissance est produit majoritairement par les BMSC et peu par les cellules de MM [80]. Sa sécrétion est régulée dans les cellules de MM par une activation de CD40 [81] et dans les cellules stromales soit par des cytokines (TNF-α, VEGF, FGF-2 et IL-1β) [82-84], soit par l'adhésion avec les MMC. L'interaction des MMC avec les BMSC induit une activation de NF-κB, qui active elle-même la transcription du gène codant pour l'IL-6 puis la sécrétion de cette cytokine. A l'inverse, une inhibition de cette voie entraîne une régulation négative de la sécrétion d'IL-6 [85]. La production des facteurs de croissance engendrée par l'interaction MMC/BMSC crée des boucles de stimulation réciproque entre BMSC et MMC. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le TNF-α entraînent la sécrétion d'IL-6 par les BMSC et l'IL-6 produite va induire la production de VEGF et de TNF-α par les MMC [86,87].

La liaison de l'IL-6 à son récepteur l'IL-6R (gp80), entraîne une phosphorylation et une homodimérisation de la gp130. Ceci a pour conséquence une activation des voies MAPK, JAK/STAT et PI3K/AKT. L'activation de l'IL-6R favorise donc la croissance, la survie (par l'induction de la protéine anti-apoptotique Mcl-1[88]) et la résistance aux drogues [89-92]. Des études ont montré que l'IL-6 engendrait une prolifération des cellules de MM exprimant la phosphatase CD45. L'IL-6 entraîne la translocation de cette phosphatase dans les « rafts » lipidiques membranaires et une prolifération *via* l'activation de la lyn kinase [93,94]. D'autres cytokines utilisant la chaîne gp130 telles que le ciliary neutrophin factor (CTNF), l'oncostatine M (OSM), l'IL-11 ou le leukemia inhibitor factor (LIF) peuvent stimuler la croissance des cellules de MM *in*

vitro mais ces facteurs sont très faiblement produits dans l'environnement médullaire [95].

L'IL-6 a un rôle capital dans le MM car elle permet la croissance *in vitro* de plasmocytes tumoraux en phase extra-médullaire et l'obtention de lignées de MM [7]. Ces cellules de MM sont dépendantes de l'IL-6. Une déprivation en IL-6 ou l'ajout d'un anticorps (Ac) anti-IL-6 bloque leur prolifération et entraîne leur apoptose [96,97]. L'administration d'un Ac anti-IL-6 a des effets anti-tumoraux chez des patients atteints de MM mais ne permet pas de bloquer à long terme l'IL-6 produite en grande quantité [98-100]. De plus, le taux sérique d'IL-6 et de son récepteur soluble est plus élevé chez les patients atteints de MM et de PCL en comparaison avec les patients mesurés chez les patients atteints de MGUS ou chez les sujets normaux [101,102]. Cette augmentation, corrélée à l'évolution de la maladie, est un facteur de mauvais pronostic [103]. De ce fait, la protéine C-réactive (CRP), produite en réponse à l'IL-6 par le foie, est utilisée comme facteur pronostic du MM [104,105].

II.2.2 L'insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est un autre facteur paracrine de l'environnement médullaire qui favorise la prolifération et la survie des cellules de MM *via* l'activation de la voie MAPK et PI3K. Son rôle sera détaillé dans la partie suivante.

II.2.3 Le vascular endothelial growth factor (VEGF)

Le VEGF est un facteur présentant une activité angiogénique vis-à-vis des tumeurs solides et hématologiques [106]. Le taux de VEGF est augmenté dans la MO des patients atteints de MM. Ce facteur contribue à l'augmentation de l'angiogénèse, qui correspond elle-même à un facteur de mauvais pronostic [107,108 109]. Cependant, le lien direct entre le taux de VEGF et le pronostic des patients n'est pas décrit. Comme vu précédemment, le VEGF est produit par les MMC et par les BMSC. Ce facteur induit la phosphorylation de Flt-1 (VEGF-R1) et une activation des voies de signalisation de type MAPK et PI3K/PKC dans les HMCL et MMC. Ceci induit une modeste prolifération mais majore le potentiel de migration des cellules [110,111]. Le VEGF, au même titre que l'IL-6, induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 [112]. Des études ont montré que des Ac anti-VEGF ou des inhibiteurs du VEGFR induisent l'apoptose (inhibition Mcl-1) et bloquent la prolifération et la migration des cellules de MM ainsi que la sécrétion d'IL-6 et du VEGF *in vitro* [113].

Cette inhibition a été confirmée *in vivo* dans un modèle murin avec une réduction de la tumeur associée à une augmentation de l'apoptose, une diminution de l'angiogenèse ainsi qu'une prolongation de la survie [114,115].

II.2.4 Le tumor necrosis factor α (TNF- α)

Le TNF- α est un facteur de croissance du MM [116]. Il est produit par les BMSC et par les MMC [117]. Le taux de TNF-α, augmenté au cours de la maladie, est un facteur de mauvais pronostic [118,119]. Comme l'IL-6, le TNF-α active la voie JAK/STAT3 [116]. Ce facteur peut induire l'apoptose des cellules *via* une activation de la caspase 8 par FAS mais aussi la survie *via* l'activation de NF-κB et la régulation des protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL, XIAP, IAP) [120,121]. Le TNF-α sécrété par les MMC stimule fortement la sécrétion paracrine d'IL-6 en se fixant directement sur une région située sur le promoteur du gène codant pour cette cytokine, induisant la transcription de ce gène puis la sécrétion de L'IL-6 par les cellules stromales [83]. De plus, la production de VEGF par les MMC augmente l'expression des protéines d'adhésion (LFA-1, ICAM-1, VCAM-1 et VLA-4) sur les MMC et BMSC par un mécanisme dépendant de NF-κB [83]. Ceci renforce la liaison des MMC aux BMSC avec également un phénomène de CAM-DR [122].

II.2.5 L'interféron-α (IFN-α)

L'effet de l'IFN- α dans le MM est controversé car il est décrit soit comme un facteur de survie ou soit comme un facteur pro-apoptotique en fonction des cellules de MM étudiées [123]. Des études ont montré que l'IFN- α favorise la survie des HMCL en activant la voie JAK/STAT, cet effet pouvant être dû en partie à l'induction d'une boucle autocrine d'IL-6 [124,125]. A l'inverse, d'autres études ont montré que l'IFN-α bloque la croissance des HMCL IL-6-dépendantes en diminuant la boucle autocrine d'IL-6 *via* une diminution de l'expression de l'IL-6R à la surface des cellules et de la sécrétion d'IL-6 [126,127]. Une explication de l'effet opposé de l'IFN-α serait une induction de la cycline D2 dans les lignées stimulées par l'IFN-α et une diminution de l'expression de la p19 dans les lignées inhibées par cette cytokine [128]. *In vivo*, l'effet de l'IFN-α a eu les mêmes résultats. L'utilisation de l'IFN- α comme traitement de MM a conduit soit à des effets anti-tumoraux ou soit à des développements de PCL chez les patients [129,130].

II.2.6 L'hepatocyte growth factor (HGF)

Le taux sérique d'HGF est plus élevé chez les patients atteints de MM que chez les sujets sains. Ce taux augmente avec l'évolution de la maladie (stade I-II vs III) et est associé à un facteur de mauvais pronostic [131-133]. Dans l'environnement médullaire, l'HGF est produit soit par les MMC, soit par les BMSC [134]. L'expression de son récepteur, c-Met, suggère la présence de boucles autocrines dans les cellules de MM. Derksen *et al.* ont montré que l'HGF est un facteur de survie et de prolifération des cellules de MM en activant les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK. Cette signalisation HGF/c-Met est médiée par syndecan-1 qui lie l'HGF [135,136]. De plus, il est décrit que l'HGF est activé dans le milieu extracellulaire par la protéase HGF-A (HGF activator) produite par les MMC [137], ce qui suggère que l'activation de l'HGF par les MMC joue un rôle important dans la signalisation et la boucle autocrine HGF/c-Met. L'HGF stimule également l'adhésion des HMCL à la fibronectine ainsi que la migration des cellules [138,139]. Une publication récente décrit une synergie entre l'HGF et l'IL-6 dans la prolifération et la migration des cellules de MM [140]. Une étude sur un inhibiteur de c-Met utilisé sur un modèle murin montre une inhibition de la croissance des tumeurs ainsi qu'une réduction de l'angiogenèse [141].

II.2.7 Les membres de la famille epidermal growth factor (EGF)

Grâce à une analyse de comparaison d'expression de gènes codant pour des molécules intracellulaires entre des MMC et des lignées lymphoblastoïdes autologues, l'HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) a été retrouvé surexprimé dans les HMCLs [142]. Mahtouk *et al.* ont ainsi pu identifier l'HB-EGF et d'autres membres de la famille EGF tels que l'amphireguline (AREG) et la neuréguline-1 (NRG-1) comme facteurs de croissance du MM [143-145]. Ces 3 facteurs sont produits par les cellules de l'environnement. Les MMC et les plasmocytes normaux produisent également l'AREG et le NRG-1 à des concentrations plus élevées que les cellules B ou plasmablastiques. Les cellules de MM expriment les récepteurs des membres de la famille EGF : ErbB1, ErbB2, ErbB3 ou ErbB4. Par ces études, l'HB-EGF en présence d'une concentration faible en IL-6, favorise la croissance des cellules en activant la voie PI3K [143]. L'AREG a une fonction double : il stimule la croissance des cellules stromales en favorisant leur sécrétion en IL-6 et il agit comme un facteur autocrine des MMC [144]. Il est également montré que la NRG-

1 est un facteur de croissance des cellules de MM. Ces 3 facteurs ont une propriété commune : un domaine de liaison à l'héparine qui permet de se fixer à syndecan-1. Ce protéoglycane spécifique des cellules plasmocytaires est essentiel à l'activation des membres de la famille ErbB car des inhibiteurs de la fixation à syndecan-1 (héparine, héparitinase) abolissent les effets de prolifération de l'HB-EGF, de l'AREG et de la NRG1. Ces données sont confirmées avec un inhibiteur spécifique d'ErbB qui entraîne une apoptose des MMC cultivées *in vitro* dans leur environnement.

II.2.8 B cell activating factor of the TNF family/a proliferation-inducing ligand (BAFF/APRIL)

BAFF et APRIL, 2 membres de la superfamille TNF, jouent un rôle essentiel dans le développement des cellules B et leur survie à long terme [146,147]. Ces facteurs de croissance ont été identifiés grâce à leurs récepteurs : BCMA (B cell maturation antigen) et TACI (transmembrane activator and CAML interactor). En effet, une comparaison de profils d'expression de gènes entre plasmocytes tumoraux et normaux par rapport aux cellules B normales a révélé une surexpression de BCMA et TACI dans les plasmocytes [148]. BAFF et APRIL sont produits par les ostéoclastes et leurs récepteurs TACI, BCMA et BAFF-R (BAFF receptor) sont présents dans les cellules de MM. BAFF et APRIL favorisent la croissance des cellules de MM en activant les voies PI3K, MAPK et NF-κB [148,149]. Les taux sériques de BAFF et d'APRIL sont plus élevés chez les patients atteints de MM [148]. Il a été démontré qu'un inhibiteur de BAFF et d'APRIL, TACI-Fc induisait l'apoptose des HMCL *in vitro* et engendrait une inhibition de la croissance des MMC *ex vivo* dans un modèle murin [148,150]. Un essai thérapeutique basé sur l'utilisation d'un inhibiteur de BAFF/APRIL vient d'être publié. Cet inhibiteur de BAFF/APRIL a permis de stabiliser la croissance de la tumeur chez les patients atteints de MM avec une réduction des Ig sériques [151].

Par la suite notre équipe a voulu déterminer si l'effet de BAFF/APRIL dans la croissance des cellules de MM était médié par syndecan-1.

(Article 1)

"APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop" European Journal of Haematology, 2009, 83 (119–129)

Notre équipe a démontré qu'APRIL, contrairement à BAFF, se fixait à la surface des HMCL exprimant syndecan-1 ainsi que sur les cellules primaires de MM. TACI, à l'inverse de BCMA et BAFF-R, se fixe aussi à la surface des HMCLs exprimant syndecan-1 et des cellules primaires de MM. Les fixations d'APRIL et de TACI à la surface des cellules de MM sont bloquées par l'héparine et l'héparitinase et confirment donc qu'APRIL et TACI se fixent à syndecan-1. De plus, cette inhibition de la fixation d'APRIL due à la présence d'héparine ne favorise plus la croissance des cellules de MM, ceci montre que syndecan-1 concentre APRIL (produit par les ostéoclastes) et TACI au voisinage des cellules de MM. Ce travail a permis d'identifier syndecan-1 comme co-répepteur d'APRIL et de TACI à la surface des MMC permettant une activation de la voie APRIL/TACI nécessaire à la survie et à la croissance de ces cellules.

II.2.9 SDF-1α

SDF-1α est le ligand du récepteur de chimiokines CXCR4 permettant la migration et le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la MO [152]. Comme vu précédemment, SDF-1α favorise l'adhésion cellulaire en augmentant l'expression de VLA-4 dans les MMC présents dans l'environnement médullaire. Il induit également une modeste prolifération et une protection contre l'apoptose induite par les drogues des cellules de MM en activant les voies de signalisation ERK, PI3K et NF-κB [71]. SDF-1α est régulé par le TGF-β [153] et il est inducteur de la sécrétion de l'IL-6 et du VEGF par les BMSC. Une étude a montré que le taux circulant de SDF-1α était corrélé à l'angiogenèse et à la présence de lésions osseuses [154,155]. Un inhibiteur de CXCR4 bloque la formation des ostéoclastes stimulée par les cellules de MM, ceci confirme que SDF-1α joue un rôle dans le recrutement et l'activité des ostéoclastes dans la MO [155]. Des études sur un autre inhibiteur de CXCR4, AMD3100, ont montré un rôle majeur de SDF-1α/CXCR4 dans la migration et le « homing » des MMC. L'AMD3100 bloque la migration des MMC *in vitro* mais également *in vivo* en augmentant la mobilisation des MMC dans la circulation sanguine et donc pourrait palier à la résistance aux drogues des MMC [156,157].

II.2.10 Les ligands de Notch : JAG1 et JAG2

Des études ont montré que la voie jagged/notch joue un rôle important dans la biologie du MM. Les récepteurs Notch-1 et 2 sont exprimés par les cellules de MM et les ligands de Notch, JAG1 et JAG2, par les cellules de MM et les cellules stromales. L'activation de la voie Notch par JAG1 dans les cellules de MM engendre la croissance des MM. L'interaction des MMC avec les BMSC active la voie Notch dans les MMC, ce qui confére aux MMC une protection contre l'apoptose induite par les chimiothérapies *via* une régulation positive de la p21 [158,159]. Une autre étude a montré que les MMC et les HMCLs surexpriment JAG2 qui interagit avec Notch présent sur les cellules stromales et cette activation induit une sécrétion d'IL-6, d'IGF-1 et de VEGF par les BMSC [160]. La surexpression de JAG2 a été récemment expliquée par une acétylation aberrante du promoteur de JAG2 dans les MMC et les HMCLs due à une diminution de l'expression du corépresseur de HDAC, SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors). Une restauration de l'expression de SMRT crée une diminution de l'expression de JAG2 et une apoptose des cellules de MM [161]. Une inhibition de Notch induit l'apoptose des MMC et les cellules stromales ne protègent plus les cellules de MM de l'apoptose induite par les chimiothérapies. Cet effet cytotoxique est dû à une diminution de Hes1 (Hairy and enhancer of split 1) et une augmentation de la protéine pro-apoptotique Noxa [162]. L'effet anti-tumoral et la levée de la protection des MMC aux drogues médiés par l'inhibiteur de Notch est confirmé sur un modèle murin [162]. Une publication récente montre que la signalisation Notch est aussi impliquée dans l'activation des ostéoclastes médiée par une interaction directe avec des lignées de myélome. Cette activation par les cellules de MM est bloquée par un inhibiteur de Notch [163].

II.2.11 Les Wnt (wingless integration site)

Les Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées comprenant 19 membres qui se fixent aux récepteurs frizzled. L'activation des Wnt entraîne une inhibition de l'activité GSK-3β et un blocage de la phosphorylation et de la dégradation par le protéasome de la β-caténine accumulée dans le cytoplasme. La β-caténine est ensuite transloquée dans le noyau pour activer ses gènes cibles.

Derksen *et al.* décrivent une surexpression de la β-caténine dans les cellules de MM due à une activation de la voie Wnt qui entraîne une prolifération des cellules de MM [164]. Deux inhibiteurs de la β-caténine (SDX-308 et PKF115–584) qui bloquent sa

translocation dans le noyau entraînent l'apoptose des MMC et confèrent une sensibilité des cellules aux drogues *in vitro* et *ex vivo* en ciblant l'interaction MMC/BMSC [165]. *In vivo*, dans un modèle murin, l'inhibiteur de la β-caténine diminue la croissance de la tumeur, cette observation étant associée à une survie prolongée [166]. Deux autres études, offrent un point de vue contradictoire. L'activation de la Wnt possède 2 effets *in vivo.* Il favorise la croissance des cellules de MM dans les niches endostéales. A l'inverse, au niveau de l'os, la signalisation médiée par Wnt3a entraîne une inhibition des lésions osseuses ainsi qu'une diminution du volume de la tumeur [167,168].

II.2.12 Le fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

Le FGF-2 est un facteur angiogénique au cours du MM [169]. Les cellules de MM sont la source principale de FGF-2 dans l'environnement et les récepteurs FGFR1 à FGFR4 sont présents dans les BMSC de patients atteints de MM ou de sujets normaux [170]. La stimulation des BMSC par le FGF-2 entraîne une sécrétion d'IL-6 et la stimulation des MMC par l'IL-6 provoque une sécrétion de FGF-2 [87]. Ces boucles de stimulation réciproque entre BMSC et MMC suggèrent un rôle de FGF-2 dans la néovascularisation mais aussi dans la croissance des cellules tumorales dans la MO [87]. Dans le MM, la surexpression de FGFR3 induite par la translocation t(4 ;14) implique un rôle de FGFR3 dans la progression de la maladie et est associée à la notion de mauvais pronostic [28,171,172]. Des inhibiteurs ou des anticorps pour cibler FGFR3 ont été développés. Plusieurs études ont montré qu'une inhibition de FGFR3 entraîne une diminution de la prolifération des MMC *in vitro* et *in vivo* (modèle murin), principalement sur des cellules présentant une translocation t(4 ;14) [173-177].

II.2.13 Le transforming growth factor β (TGF-β)

Le TGF- β est sécrété par les MMC et entraîne la production d'IL-6 par les BMSC [178]. Il augmente aussi la croissance des MMC médiée par l'IL-6. Un inhibiteur de TGF- β, SD-208, n'inhibe pas seulement la transcription et la sécrétion d'IL-6 et de VEGF par les BMSC mais également l'adhésion des MMC aux BMSC. De plus, le SD-208 diminue la croissance de la tumeur médiée par l'adhésion MMC/BMSC, ce qui suggère que le TGF- β a un rôle dans la croissance, la survie, la résistance aux drogues et la migration des MMC dans l'environnement médullaire [179].

II.2.14 L'interleukine-15 et -21 (IL-15 et IL-21)

L'IL-15 et l'IL-21 ont été décrites comme étant des facteurs de survie et de prolifération des MMC.

Le taux sérique de l'IL-15 est plus élevé chez les patients atteints de MM que chez les sujets sains, ce taux augmentent lors de la progression de la maladie (I-II vs III) [180]. Le récepteur de l'IL-15 (IL-15R) est présent sur les cellules de MM et la cytokine est sécrétée soit par les cellules elles-mêmes, soit par les cellules de l'environnement. L'activation de l'IL-15R par l'IL-15 produite de manière paracrine ou autocrine protège les MMC de l'apoptose et induit leur prolifération. Un Ac anti-IL-15 engendre l'apoptose spontanée des cellules de MM de façon similaire à l'effet observé lors de l'utilisation d'un Ac anti-IL-6. Ceci suggère que la boucle autocrine de l'IL-15 peut se substituer à celle de l'IL-6 [181,182].

L'IL-21 induit la prolifération des lignées de myélome. L'IL-21 agit en synergie avec le TNF-α qui augmente l'expression de son récepteur (IL-21R) à la surface des cellules [183]. Une publication récente montre que l'effet de l'IL-21 passerait par une boucle autocrine d'IGF-1 [184].

II.2.15 Les inhibiteurs des voies de signalisation activées dans le MM

De nombreux facteurs de croissance myélomateux activent principalement 4 voies de signalisation : MAPK, JAK/STAT, NF-κB et PI3K/AKT. Ces voies activées qui entraînent la survie et la prolifération des MMC font donc figure de cibles thérapeutiques potentielles.

1) L'inhibition de la voie JAK/STAT

Dans le MM, la voie de signalisation JAK/STAT est majoritairement activée par l'IL-6 [185]. La gp130 de l'IL-6R active les JAK qui activent à leur tour les facteurs de transcription STAT1 et STAT3. Ils forment alors des hétérodimères STAT1/STAT3 ou STAT3/STAT3 qui migrent dans le noyau et activent des gènes cibles [186]. Un inhibiteur de JAK2, l'AG490, inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées de MM IL-6-dépendantes. Il bloque également *via* IL-6 l'activation de JAK2, ERK2 et STAT3 [187]. D'autres inhibiteurs des JAK (la pyridone 6 et l'INCB20) ont par la suite été publiés. La pyridone 6 est décrite comme étant plus spécifique dans la mesure où elle inhibe uniquement l'activation de STAT et non d'ERK2 [188]. Ces inhibiteurs

induisent de la même façon l'apoptose et l'inhibition de la croissance des lignées en présence d'IL-6 ou en présence de BMSC [188,189].

Un autre type d'inhibiteur a été étudié par la suite : l'atiprimod, un inhibiteur de STAT3. L'atiprimod inhibe la croissance des MMC et induit l'apoptose *via* l'activation des caspases 3. Il bloque la phosphorylation de JAK/STAT médiée par l'IL-6 et celle de NF-κB médiée par le TNF-α. Il diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 [190,191]. *In vitro*, l'atiprimod inhibe la sécrétion de l'IL-6 et du VEGF par les BMSC et a un effet anti-angiogénique. L'inhibition de l'interaction entre BMSC et MMC a été confirmée *in vivo* dans un modèle murin par une diminution du taux sérique d'IL-6R soluble [192].

2) L'inhibition de la voie PI3K/AKT

Dans le MM, la voie PI3K/AKT qui est activée par l'IL-6, l'IGF-1, le VEGF, SDF-1α et BAFF/APRIL confère une résistance des cellules de MM aux chimiothérapies conventionnelles [92,148,193-196]. La phosphorylation d'AKT par ces différents facteurs de croissance va activer diverses protéines en aval qui participent à la progression du cycle cellulaire et au blocage de l'apoptose, en particulier mTOR, GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β), P70S6-kinase et FKHR (forkhead) [197].

La perifosine (alkylphospholipid) inhibe l'activation d'AKT engendrée par l'IL-6 ou l'IGF-1, possède un effet cytotoxique, y compris vis-à-vis des lignées de myélome en coculture avec les BMSC. Il contrecarre donc l'effet CAM-DR [198]. La perifosine augmente l'effet de plusieurs thérapeutiques tels que le bortezomib, la dexaméthasone, la doxorubicine et le melphalan [198]. Cet inhibiteur d'AKT induit l'apoptose des cellules de MM en activant c-jun N-terminal kinase (JNK) qui active les caspases 8/9 et le clivage de PARP (poly (ADP)-ribose polymerase cleavage) [198]. Dans un modèle murin, l'effet anti-tumoral de la perifosine a été observé *via* une régulation négative de l'activation d'AKT. Cet inhibiteur diminue également la survivine, une protéine régulatrice du cycle cellulaire et de l'apoptose. La synergie entre la perifosine et le bortezomib serait expliquée par le fait que la perifosine inhibe la survivine induite par le bortezomib. L'induction de la survivine par le bortezomib serait une cause de la résistance des MMC à cette drogue.

Une autre cible de la voie PI3K/AKT a été étudiée : mTOR (mammalian target of rapamycin) qui est activé par AKT. CCI-779, un inhibiteur de mTor, induit l'apoptose des MMC *in vitro* [199] et dans un modèle murin [200]. *In vivo*, son effet anti-tumoral est

associé à une inhibition de la prolifération et de l'angiogenèse, à une induction de l'apoptose et à une réduction de la taille de la tumeur en relation avec une diminution du taux de cycline D1 et de c-myc et une augmentation de l'expression de la p27 [200]. Un essai clinique de phase II dans lequel le CCI-779 a été administré chez des patients de MM en rechute ou réfractaire a été récemment publié. Cet inhibiteur a des effets peu concluants : 38% de réponse totale (1 partielle et 5 mineures) et de nombreux effets secondaires malgré une réduction maximale de la phosphorylation de mTOR [201].

3) L'inhibition de la voie Ras/MAPK

MAPK activé va engendrer l'activation de Ras (*via* le complexe Shc/Grb2/SOS) puis une activation de la cascade des MAPK que sont Raf, MEK-1 et ERK1/2. C'est ERK1/2 phosphorylé qui induit les facteurs de transcription [197]. Un inhibiteur d'ERK1/2 a été étudié. ERK1/2 est activé par les facteurs de croissance (tels que l'IL-6, l'IGF-1, l'HGF, le VEGF et BAFF/APRIL) ou par l'interaction des MMC aux BMSC associée à la sécrétion de cytokines. Un inhibiteur d'ERK1/2 bloque la prolifération et la survie des MMC induites par les facteurs de croissance de l'environnement et par l'adhésion aux BMSC. De plus, l'inhibition d'ERK1/2 a un effet anti-angiogénique en diminuant la sécrétion du VEGF [202]. *In vivo*, un inhibiteur d'ERK1/2 (l'AZD6244) bloque la croissance de la tumeur dans un modèle de souris et prolonge la survie [202]. L'AZD6244 diminue également l'expression et la sécrétion des facteurs activant les ostéoclastes par les MMC. Il bloque ainsi la différenciation des ostéoclastes et leurs fonctions [203].

4) L'inhibition de la voie NF-κB

La famille NF-κB comprend NF-κB1 (ou p50), RelA (ou p65), c-Rel, NF-κB2 (ou p52) and RelB qui constituent des facteurs de transcriptions dimériques induisant la voie canonique (p50, p65 et/ou c-Rel) ou alternative (p52, RelB) [204]. Dans la voie canonique, le complexe IκB kinase (IKK) comprenant IKKα et IKKβ est recruté et activé. Le complexe IKK va alors dissocier l'association IκB-NF-κB en phosphorylant et dégradant IκB. NF-κB migre alors dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles. La voie alternative implique seulement des homodimères d'IKKα. Plusieurs inhibiteurs d'IKKβ ont été étudiés dans le MM : ils engendrent l'apoptose et l'arrêt de la croissance des cellules de MM en induisant des protéines pro-

apoptotiques bax et caspase 3 [205,206]. Comme vu précédemment, le TNF-α, sécrété par les MMC, active la voie NF-κB par les BMSC, ceci conduit à la sécrétion d'IL-6. Le TNF-α active également NF-κB dans les MMC et régule les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des MMC et BMSC. Il favorise ainsi l'interaction MMC/BMSC. Dans un modèle murin, un inhibiteur de IKKβ bloque les effets du TNF-α et diminue la croissance de la tumeur, la sécrétion d'IL-6 par les BMSC et l'adhésion des MMC avec les BMSC [206].

II.3. La niche vasculaire de la MO et l'angiogenèse tumorale

La niche vasculaire médullaire est une barrière entre le compartiment hématopoïétique et la circulation périphérique. Cette niche, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et des cellules stromales réticulaires [207], permet le transfert des cellules du sang matures vers la circulation périphérique. La niche vasculaire sert aussi de support à la différentiation et à la maturation des progéniteurs hématopoïétiques à travers la production et la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance. Les cellules hématopoïétiques peuvent aussi maintenir la survie des cellules endothéliales par la production d'un facteur de survie de ces cellules : le VEGF. Le rôle de la niche vasculaire médullaire dans le MM est à ce jour peu étudié : seules les cellules endothéliales ont été explorées dans cette pathologie.

II.3.1. La cellule endothéliale de MM (MMEC)

L'angiogenèse dans le MM est corrélée à l'expansion de la tumeur. L'augmentation de la densité des microvaisseaux dans la MO de patients atteints de MM est corrélée avec la progression de la maladie. Il s'agit d'un facteur de mauvais pronostic [109,208].

Les cellules endothéliales (EC) de l'environnement tumoral sont différentes de celles des sujets sains (dites EC normales). Les EC des tumeurs ont une prolifération importante et accompagnent la progression tumorale (croissance, invasion, métastase) [209]. De plus, le profil d'expression des molécules d'adhésion des EC issues de tumeurs sont aussi différents des EC issues de sujets sains : les interactions matrice extracellulaire/cellules tumorales ou des cellules entre elles sont réduites afin de faciliter leur migration et leur prolifération [210].

Dans le MM, les EC ont également fait l'objet d'étude. Vacca *et al.* ont réalisé une comparaison des MMEC et des EC normales. Les MMEC expriment fortement VEGFR-2, FGFR-2, Tie2/Tek, VEGF, FGF-2 et Angiopoiétine-2 (Ang-2). Les **MMEC possèdent ainsi un haut pouvoir angiogénique** par rapport aux EC normales : elles prolifèrent plus vite grâce aux boucles autocrines VEGF/VEGFR-2 [211] et FGF-2/FGFR-2 et forment des vaisseaux plus rapidement grâce à la boucle autocrine Ang-2/Tie2 [212]. De plus, les MMEC expriment fortement l'intégrine β3 qui empêche l'apoptose de ces cellules et favorise l'adhésion cellulaire grâce à ses liaisons à la matrice extracellulaire (fibronectine et vitronectine), la prolifération et la migration [213]. La néovascularisation est également facilitée par une augmentation de l'aquaporine-1 [214], une baisse d'expression de la thrombospondine (inhibiteur de l'angiogenèse) et d'expression de la VE-cadhérine, à l'origine de solides jonctions intercellulaires [210,215,216]. L'interaction des cellules de myélome et des MMEC se trouve aussi facilitée par la surexpression de la E-selectine et l'endogline par les MMEC, ce qui va induire l'expression de CD31, le ligand de CD38 [217]. Cette interaction des plasmocytes tumoraux avec les nouveaux vaisseaux formés va permettre leur dissémination. Les MMEC possèdent également un phénotype différent (appareil golgi complexe, mitochondries nombreuses, structures « lysomes-like », hyperplasie du réticulum endoplasmique, fins microfilaments). Ces caractéristiques suggèrent un métabolisme actif. De cette étude, il résulte que la cohabitation des MMC et des EC dans la moelle osseuse reprogramme l'EC en MMEC pour avoir un phénotype et une fonction angiogénique où le « crosstalk » des facteurs solubles joue un rôle important. Les MMEC expriment le CD133 (marqueur du progéniteur endothélial) mais faiblement le facteur VIII-RA (related antigen) (VIII-RA induit durant la différenciation endothéliale), ce qui suggère que la MMEC s'est dédifférenciée à partir de l'EC normale [218].

Dans le groupe de Vacca, la différenciation des cellules souches progénitrices hématopoiétiques (HSPC) issues de patients atteints de MM en EC a été étudiée. Ce phénomène est observé à partir des HSPC issues de patients de MGUS. En effet, en présence de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF-2 et IGF-1), les HSPC circulantes ($CD133^{+}$, $VEGF\text{-}R2^{faible}$, $VE\text{-}cadherin^{-}$) sont capables de se différencier *in vitro* en cellules ayant un phénotype d'EC matures qui possèdent une expression diminuée du CD133 et qui ont acquis l'expression de 2 marqueurs spécifiques de l'EC mature : VEGF-R2 et VE-cadhérine. Des biopsies de moelle osseuse révèlent la

présence d'HSPC à l'intérieur des néo-vaisseaux chez les patients atteints de MM, ce qui n'est pas le cas chez ceux atteints de MGUS. On peut donc supposer que dans le MM, les MMC envoient des *stimuli* angiogéniques qui recrutent les HSPC dans la tumeur et qui induisent leur différenciation en cellules endothéliales matures. Ceci permet de formuler l'hypothèse des HSPC en tant que cellules précurseurs d'EC du MM [219].

II.3.2. Le rôle des MMC dans l'angiogenèse

Les principales cellules productrices des facteurs pro-angiogéniques (**FGF-2, VEGF, MMP2, Ang1, Ang2**, TGF-β, HGF, IL-8) sont les cellules de myélome [82,131,169,212,220-222]. Comme vu précédemment, l'IL-6 joue également un rôle indirect dans l'angiogenèse. L'IL-6 produite par les BMSC entraîne en effet la sécrétion de VEGF, de TNF-α et de FGF-2 par les MMC [86,87]. La production d'IL-6 par les BMSC est par ailleurs due en partie à l'effet des facteurs angiogéniques (TNF-α, VEGF, TGF-β) [82,83].

L'expression du VEGF, du FGF-2 et de leurs récepteurs est similaire lors de la comparaison des taux obtenus à partir de cellules de MGUS et de MM. Cependant, *in vitro*, plus de 60% des cellules de MM stimulent l'angiogenèse *in vitro* et seulement 7% seulement des cellules de MGUS. Inversement, plus de 60% des cellules de MGUS inhibent l'angiogenèse et seulement 4% des cellules de MM. Il en résulte que le **« switch » MGUS vers MM serait lié à une baisse de l'activité inhibitrice de l'angiogenèse** [223]. Hose *et al.* ont confirmé récemment que les MMC présentent une diminution de l'expression des gènes anti-angiogéniques (*TIMP1, TIMP2*) et une expression aberrante de gènes pro-angiogéniques (*VEGF, ADM, IGF-1*), ce qui entraîne un augmentation des *stimuli* angiogéniques et donc favorise l'angiogenèse médullaire dans les patients atteints de MM [224].

Plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF-2 et l'HGF voient leur taux augmenter dans l'environnement médullaire. La présence, dans le sérum des patients atteints de MM, des facteurs précédemment cités est le signe de progression de la maladie en relation avec un phénomène d'angiogenèse [107]. L'angiogenèse est aussi associée à l'augmentation de la sécrétion des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (les métalloprotéinases (MMP)) par les cellules de MM : les MMP favorisent la migration et la prolifération des cellules endothéliales. MMP-2 qui est augmentée dans les cellules de MM par rapport aux

cellules de MGUS est connue pour jouer un rôle dans la prolifération et la migration des EC [169].

L'expression de l'Ang1 est corrélée à une angiogenèse élevée chez les patients atteints de MM. Son rôle a été démontré *in vitro :* du milieu conditionné de lignées de myélome produisant Ang-1 stimule la formation de vaisseaux. De plus, les cellules de MM sensibilisent les cellules endothéliales à l'Ang-1 en induisant son récepteur Tie2 par ces cellules [220,225].

Une étude récente montre un rôle important de syndecan-1 dans l'angiogenèse : son inhibition entraîne une diminution de la croissance de la tumeur mais aussi de la vascularisation *in vivo* dans un modèle murin [226].

II.3.3. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

Les inhibiteurs des différents facteurs pro-angiogéniques ont déjà été évoqués précédemment. Le rôle majeur de l'angiogenèse dans le MM a conduit à l'utilisation de la thalidomide comme traitement thérapeutique pour ses propriétés anti-angiogéniques. La thalidomide inhibe la sécrétion de VEGF, de FGF-2 et d'HGF ainsi que la prolifération des cellules endothéliales et la formation des capillaires sanguins [227]. Des études démontrent ainsi que la diminution de la densité des microvaisseaux se produit uniquement chez les patients répondeurs à la thalidomide, suggérant que l'angiogenèse médullaire est une cible thérapeutique du MM [223].

Le bortezomib a également été décrit comme inhibiteur de l'angiogenèse en bloquant la prolifération des MMEC. Le bortezomib bloque la liaison des cellules de myélome avec les MMEC, ainsi que la sécrétion du VEGF et de l'IL-6 [228]. L'inhibition de l'angiogenèse par le bortezomib a été confirmée *in vivo* sur un modèle murin [229]. Le mécanisme reste encore méconnu.

II.4. La niche ostéoblastique et les lésions osseuses dans le MM

Les lésions osseuses sont une des principales manifestations cliniques du MM. L'os est un tissu en renouvellement constant. A l'état normal, le remodelage osseux résulte d'un **équilibre entre les ostéoclastes (OC),** responsables de la résorption osseuse et les **ostéoblastes (OB)** qui reconstituent la matrice osseuse. Ces lésions

osseuses dans le MM sont dues à un **déséquilibre de la balance ostéoclastes/ostéoblastes** qui provoque une lyse osseuse. Les cellules de MM entraînent une augmentation de la formation et de l'activité des ostéoclastes et une inhibition et une diminution du nombre des ostéoblastes.

II.4.1. Les ostéoclastes

L'augmentation de l'activité des OC est médiée par divers facteurs activant les OC (OAF) produits par les MMC et les BMSC. Ces facteurs sont **MIP-1α** (macrophage inflammatory protein-1α), un ligand du récepteur NF-κB (**RANKL** aussi nommé TRANCE : TNF-related activation-induced cytokine ou OPGL : osteoprotegerin ligand), le **VEGF,** le **TNF-α, l'IL-1β, le PTHrP** (parathyroid hormone-related protein), l'**HGF** et **l'IL-6**. L'activité des OC module également la croissance et la survie des MMC [230,231]. Il en résulte que des inhibiteurs de résorption osseuse, tels que le pamidronate ou l'acide zolédronique, peuvent aussi avoir des effets anti-tumoraux [232,233].

MIP-1α appartient à la famille des chimiokines RANTES (related on activation normal T-cell expressed and secreted) et se lie à CCR1, CCR5 et CCR9. Il agit directement sur les progéniteurs ostéoclastiques et sur les ostéoclastes matures. MIP-1α est exprimé et sécrété par les cellules de MM et induit la formation des OC *via* le PTHrP, RANKL et l'IL-6 [234]. Les MMC de patients ayant une surexpression de FGFR3 due à un translocation t(4 ;14) expriment fortement MIP-1α. Il s'agit de la première association décrite entre une translocation IgH et le phénomène de lyse osseuse dans le MM [235]. L'inhibition de MIP-1α, par un Ac anti- MIP-1α, un anti-CCR5 (récepteur de MIP-1α) ou un anti-sens MIP-1α, réduit la résorption osseuse [236-238].

RANKL est exprimé par les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les MMC et les cellules stromales. RANKL induit la différenciation, la fusion et la survie des pré-OB et active les OC pour résorber l'os *via* RANK exprimé sur les OC précurseurs et matures [239,240]. A l'état normal, un équilibre est requis entre RANKL et **OPG, un récepteur antagoniste de RANKL** sécrété par les OB et les cellules stromales [241,242]. Dans le MM, ce ratio est perturbé. Plusieurs études démontrent une régulation positive de RANKL dans des systémes de co-culture de MMC avec BMSC ou pré-OB [243,244] et une production diminuée d'OPG [245,246]. De plus, les héparanes sulfates, en particulier syndecan-1, séquestrent l'OPG, ce qui conduit à son internalisation et à sa dégradation [247]. Un inhibiteur de RANK (RANKL-Fc) ou la protéine recombinante

OPG entraîne une diminution de l'ostéolyse ainsi qu'un effet anti-tumoral [246,248,249]. De plus, une étude clinique de phase I avec la protéine recombinante OPG (l'AMGN-0007) montre des résultats encourageants avec une rapide et profonde suppression de la résorption osseuse chez des patients atteints de MM [250].

II.4.2. Les ostéoblastes

Les lésions osseuses sont aussi liées au nombre réduit d'ostéoblastes associé à la diminution de la formation de l'os. Cet effet est engendré par la dérégulation de plusieurs molécules incluant **Runx2/Cbfa1, Wnt et IL-3**.

Les cellules de MM bloquent l'activité et la fonction des facteurs de transcription **Runx2/Cbfa1** dans les progéniteurs ostéoblastiques à travers l'interaction directe VLA-4/VCAM-1 ou la sécrétion d'IL-7 [251]. Runx2 augmente également l'ostéoclastogenèse par l'induction de la sécrétion d'OPG par les cellules progéniteurs d'ostéoblastes [252].

L'antagoniste de la signalisation Wnt (**DKK-1** : dickkopf-1), est un inhibiteur de la différenciation des OB. Il est significativement surexprimé chez les patients atteints de MM présentant des lésions osseuses. L'inhibition des précurseurs ostéoblastiques par DKK-1 favorise le déséquilibre vers une augmentation des OC. Ceci bloque la prolifération des cellules souches hématopoïétiques dépendant des OB. De plus, DKK-1 contribue à l'immunosuppresion et la survenue d'une anémie des patients. D'après ces données, l'administration d'un Ac anti-DKK-1 améliore la morbidité relative aux lésions osseuses des patients atteints de MM [253].

Le bortezomib a un effet négatif sur la lyse osseuse : il réduit les taux sériques de DKK-1 et de RANKL conduisant à un remodelage de l'os dans les patients atteints de MM en rechute [254].

sFRP-2 (secreted frizzled-related protein 2) est un inhibiteur naturel de la voie Wnt qui favorise également l'ostéolyse. sFRP-2 est sécrété par les MMC qui suppriment la formation de l'os. La déplétion de sFRP-2 empêche la liaison de Wnt sur son récepteur et restaure la minéralisation osseuse *in vitro* [255].

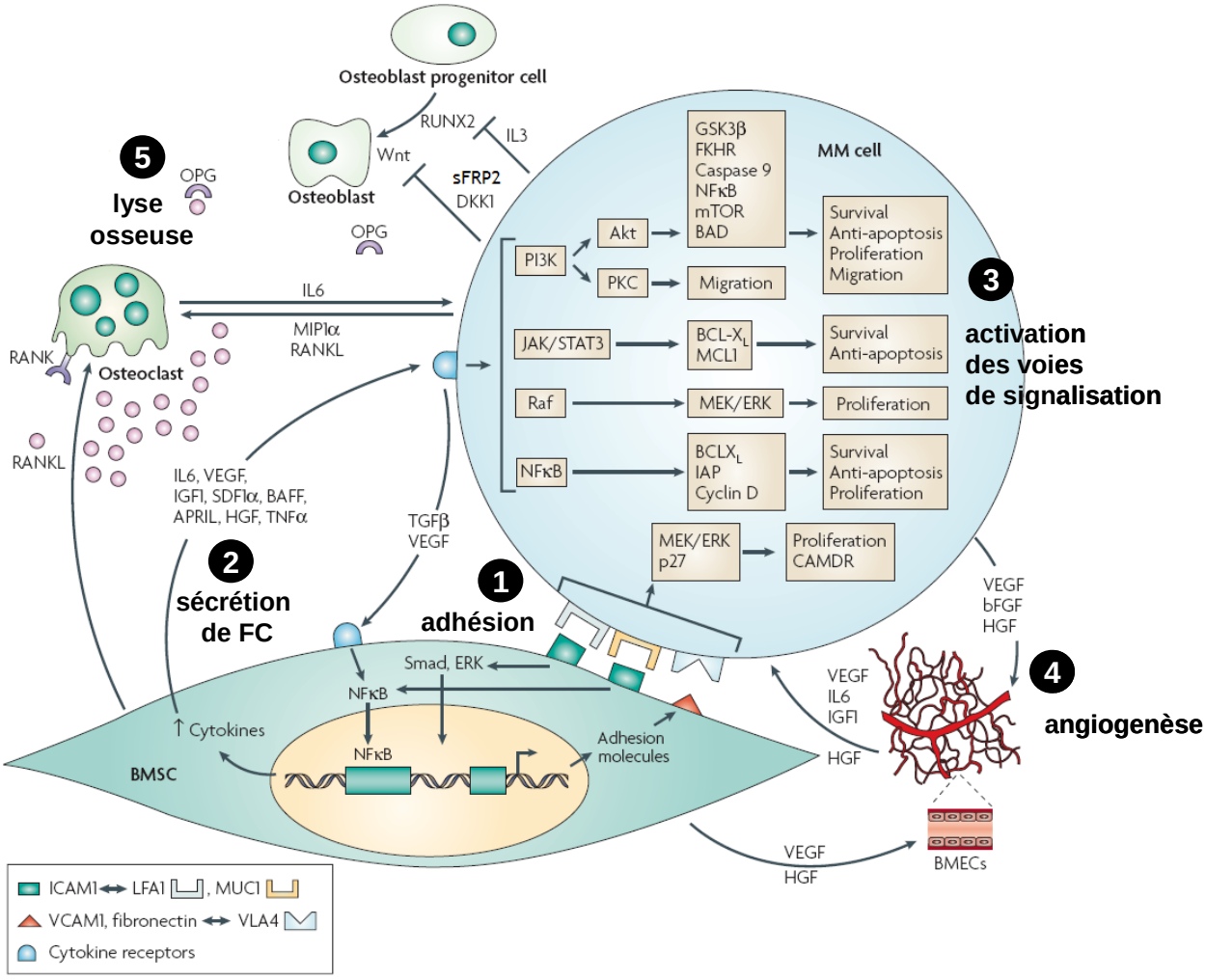
Une autre composante cellulaire de l'environnement médullaire ayant un rôle dans l'inhibition des OB sont les lymphocytes T CD3 qui ont été récemment identifiés comme la principale source d'**IL-3** chez les patients atteints de MM. L'IL-3 est associée à une augmentation de la formation des OC et un blocage de la différenciation des pré-OB en OB matures [256-258]. Un rôle critique des cellules T CD3

dans les lésions de l'os est supporté par leur production augmenté de RANKL qui favorise l'ostéoclastogenèse et bloque la différenciation de OB [259,260].

L'environnement médullaire, et les ostéoblastes en particulier, sont requis pour le développement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) [261,262]. Les CSH résident soit près des OB qui leur apportent un environnement de maintenance (l'état quiescent) soit de façon adjacente aux cellules endothéliales, en interagissant avec les cellules stromales réticulaires riches en SDF-1α, qui engendrent leur différenciation et leur mobilisation dans le sang périphérique. Par conséquent, la niche des cellules souches régule l'autorenouvellement cellulaire et la différenciation des cellules selon différentes conditions physiologiques [263,264]. **L'enjeu des recherches futures serait d'identifier la cellule souche du MM et de définir le rôle de la niche ostéoblastique/endostéale et de la niche vasculaire dans le développement, la prolifération et la survie de la cellule souche myélomateuse.**

En conclusion, l'environnement médullaire en interaction avec les cellules myélomateuses a une grande importance dans la biologie du MM. Au sein de la moelle osseuse, les cellules de MM vont activer les autres composantes de la MO et créer un environnement favorable à leur migration, survie et prolifération (Figure 3). Du fait de ces interactions, de nombreux facteurs de croissance vont être produits et impliqués dans la progression du clone tumoral. D'une part, la grande diversité de ces facteurs de croissance rend la biologie du MM complexe. D'autre part, le MM est une maladie hétérogène caractérisée par de nombreuses anomalies cytogénétiques qui possèdent, de ce fait, des profils d'expression de gènes différents entre patients. Dans ce contexte, les puces à ADN ont permis de multiples avancées dans la compréhension du MM.

Figure 3 : Les interactions des cellules de MM avec leur environnement médullaire d'après Hideshima *et al.* [265]
(1) l'adhésion des cellules de MM avec les BMSC entraîne la résistance aux drogues des MMC et la (2) sécrétion de facteurs de croissance (FC) qui augmentent l'expression des molécules d'adhésion et favorisent des boucles de stimulation réciproque de facteurs de croissance entre MMC et BMSC. (3) Les facteurs de croissance activent les voies de signalisation dans les MMC qui entraînent leur survie, prolifération, migration. (4) La sécrétion des facteurs de croissance par les MMC et les BMSC stimule également l'angiogenèse. (6) RANKL et MIP-1α produits par les BMSC et MMC activent l'ostéoclastogenèse. L'ostéoblastogenèse est inhibée par la sécrétion de DKK-1, sFRP-2 et IL-3 par les MMC et une baisse de la sécrétion des OPG par les BMSC. Cette activation des ostéoclastes et cette inhibition des ostéoblastes provoquent la lyse osseuse.



III. L'étude du transcriptome dans le MM.

III.1. Les généralités sur les puces à ADN

Les puces à ADN constituent une meilleure compréhension de la biologie du MM. Cette technologie permet de mesurer simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Cet outil a apporté un nouvel élan dans l'étude de la biologie des cellules cancéreuses.

Les puces à ADN sont un support solide sur lequel des milliers d'oligonucléotides ou fragments d'ADNc sont déposés de façon géométrique. Chacun des fragments étant représenté par un point sur le support. Le dépôt d'ADNc sur une membrane de nylon est appelé « macroarrays « tandis que le dépôt d'ADNc ou la synthèse in situ d'oligonucléotides (technologie Affymetrix) sur un support de verre de petite taille sont appelés « microarrays ». Les ADNc/oligonucléotides servent de sondes sur lesquelles vont s'hybrider de façon très spécifique les fragments de gènes complémentaires (cibles), présents dans les échantillons biologiques à tester. L'hybridation peut être mise en évidence par des techniques optiques sous éclairage fluorescent ou par détection de radioactivité, un système de marquage de l'échantillon au moyen de traceurs fluorescents ou radioactifs ayant été réalisé préalablement. La quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont ensuite rendus possible au moyen d'un système d'acquisition d'image puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques spécialement conçus à cet effet. Les résultats obtenus sont ensuite validés sur le plan statistique et interprétés dans un contexte biologique.

De nouvelles classifications des tumeurs et de nouveaux modèles pronostiques ont été développés en se basant sur les données des puces à ADN dans de nombreux cancers. Cette approche a conduit à de nombreux progrès dans la compréhension de la biologie des tumeurs lymphoïdes humaines [266].

III.2. L'application au MM

III.2.1. La nouvelle classification du MM à partir des puces à ADN

Comme nous l'avons vu, le MM est une maladie hétérogène caractérisée par de nombreuses anomalies cytogénétiques. L'analyse du profil d'expression de gènes (GEP) par puces à ADN permet d'identifier, facilement, les patients dont les cellules tumorales présentent des translocations, en mettant en évidence uns surexpression de gènes dérégulés tels que *MMSET/FGFR3*, *cycline D1*, *cycline D3*, *MAF* et *MAFB*. Cela permet de définir des entités de patients présentant des pronostics différents.
Comme nous l'avons précédemment évoqué, cette approche a été améliorée par la classification moléculaire du groupe américain de John Shaughnessy qui, à partir de l'analyse du transcriptome, a stratifié la pathologie du MM en 7 groupes et ainsi défini des groupes de bon ou de mauvais pronostic [40].
Ces 7 groupes sont également caractérisés par la surexpression de gènes spécifiques résumés dans la Table 4.

Table 4 : Les caractéristiques moléculaires de la classification du groupe de Shaughnessy selon Zhou *et al.* [267]

Groupe	% patients	Caractéristiques génétiques	Gènes surexprimés	Risque	Détails
MS (M**MS**ET)	17	t(4 ;14)	*FGFR3, MMSET, CCND2, IL-6R*	élevé	Surexpression MMSET associée à FGFR3 (dans 70% des cas), lésions osseuses rares
MF (**M**A**F**/**M**A**F**B)	6	t(14 ;16) ou t(14 ;20)	*MAF* ou *MAFB, CCND2, IL-6R*	élevé/ modéré	Expression élevée de CCND2, lésions osseuses rares, DKK1 faible, signature importante de NF-κB, faible signature des gènes TNF-α
CD-1 (**C**CN**D**1 ou **C**CN**D**3)	6	t(11 ;14) ou t(6 ;14)	*CCND1* ou *CCND3*	faible	Quelques cas expriment CCDN2 en l'absence de CCND1 ou CCND3, expression DKK1 élevée
CD-2 (**C**CN**D**1 ou **C**CN**D**3) avec expression de CD**2**0	12	t(11 ;14) ou t(6 ;14)	*CCND1 ou CCND3, CD20, VPREB3*	faible	Quelques cas expriment CCDN2 en l'absence de CCND1 ou CCND3
HY (**HY**perdiploide)	31	Trisomies +3, +5, +9, +11, +15, +19	*GNG11, DKK1, FRZB*	modéré	Faible expression ectopique de CCND1, del13 et gain 1q rares, expression élevée des gènes de l'IFN
LB (**L**ow **B**one disease)	12	Trisomies de HY ; exceptions de del13, gain 1q ou rarement gain du chromosome 11	*CCND2, CST6, ARHE, IL-6R*	faible	Expression de CCND2, faible taux de DKK1, FRZB, CCR2, HIF1A, SMAD1, expression faible des gènes de l'IFN
PR (**PR**oliferation)	10	Composé de tous les autres groupes	*CCNB1, CCNB2, PCNA, MKI67, TOP2A, TYMS*	élevé	Surexpression des gènes 1q

III.2.2. Dans l'avancée d'une meilleure compréhension de la biologie des cellules tumorales

Plusieurs approches ont été adoptées pour mieux comprendre la biologie des cellules de MM [268]. La comparaison du transcriptome des cellules plasmocytaires normales et tumorales permet d'avoir une vue d'ensemble des changements qui amènent une cellule à devenir cancéreuse et ainsi de dresser un portrait moléculaire caractérisant sa transformation en cellule maligne. Les premiers travaux ont été initiés par le groupe de John Shaughnessy et le nôtre [269,270] et ont permis d'identifier

de nombreux gènes dérégulés dans les MMC codant pour des molécules impliquées dans des signaux de communication intercellulaire (facteurs de croissance, chimiokines et molécules d'adhésion), des signaux de transduction et des protéines pro- et anti-apoptotiques [271]. Cette approche a ainsi pu permettre d'identifier par notre équipe de nouveaux facteurs de croissance myélomateux que sont les membres de la famille EGF et BAFF/APRIL [143,144,148]. Récemment, notre équipe a publié un article sur une analyse de comparaison de gènes pro et anti-apoptotiques entre les cellules B normales et les MMC et montre un changement de ces gènes durant la différenciation plasmocytaire ainsi qu'une régulation négative de gènes pro-apoptotiques dans les MMC [272].

Par la suite, une comparaison de plasmocytes tumoraux et normaux à partir de moelle osseuse de jumeaux génétiquement identiques a permis de mettre en évidence la surexpression de gènes impliqués dans la survie (Mcl-1, facteurs de transcription, gènes liés à la réponse au stress et la voie du protéasome) dans les MMC du jumeau atteint de MM [273].

Dans une autre étude, une comparaison entre les plasmocytes normaux et tumoraux de patients atteints de MGUS et de MM ont permis de démontrer que les différences entre MGUS et de MM sont plus faibles que celles trouvées entre les plasmocytes normaux et ceux de MM ou entre les plasmocytes normaux et ceux de MGUS. Cette étude a permis aussi de mettre en évidence les protéines impliquées dans le passage MGUS vers MM, telles que des oncogènes (RB1), des facteurs de transcription (XBP-1, forkhead), des gènes de voies signalisation (membre de MAPK et de NF-κB) [274].

Une autre approche utilisée est l'analyse des voies de signalisation activées dans les cellules de MM dans différentes conditions et de comprendre comment les gènes impliqués peuvent être induits et affecter la croissance tumorale. Croonquist *et al.* ont ainsi comparé le GEP d'une lignée de MM cultivée en présence d'IL-6 ou en présence de BMSC et ont déterminé les voies de signalisation activées (communes ou non), les éventuelles cibles et les signatures de gènes spécifiques de chaque condition [275].

Les GEP ont permis également d'analyser les mécanismes moléculaires liés à l'activité anti-tumorale de drogues ciblant les HMCLs. L'équipe de Kenneth Anderson a identifié les signatures de gènes des 2 drogues approuvées par la FDA, la dexaméthasone et le bortezomib et ainsi déterminé les gènes qui conféraient aux

MMC une résistance aux drogues [276-278]. Un des objectifs de ce type d'analyse est de permettre la mise en place de combinaison de drogues efficaces pour traiter le MM.
Par la suite, cette équipe a identifié grâce au GEP les signatures de plusieurs drogues telles que le 2-méthoxyestradiol (2ME2)[279], SAHA et VPA (2 inhibiteurs de déacétylase)[280,281], un inhibiteur de l'IL-6R [282] et un inhibiteur de la voie Wnt [166].
Récemment, les GEP ont permis d'étudier *in vivo* la réponse aux drogues des patients. En comparant les GEP avant et après 48 heures de traitement avec le lénalidomide, la thalidomide ou la dexaméthasone, Burington *et al.* ont trouvé que les gènes différentiellement exprimés après traitement sont associés à un pronostic. Les gènes altérés par la thalidomide sont aussi la cible du lénalidomide (un analogue à la thalidomide) et la diminution de ces gènes entraîne également une meilleure réponse sans événement. Ces données suggèrent que les gènes cibles de ces 2 drogues sont des biomarqueurs puissants qui peuvent prédire la réponse aux traitements et aussi déterminer le mécanisme d'action de ces drogues [283].
Les GEP ont également permis d'identifier chez 76% des patients après traitement au bortezomib 113 gènes altérés étant principalement une diminution des gènes du protéasome. Cette signature de gènes diminués par le bortezomib est associée à une survie de plus de 3 ans dans plus de 80% des cas contrairement aux patients qui expriment les gènes du protéasome dont la survie ne dépasse pas 2 ans. Ces données montrent que le statut d'activation des gènes du protéasome peut prédire la survie des patients atteints de MM et que le bortezomib améliore leur survie en ciblant ces gènes.

III.2.3. Etudier le rôle du microenvironnement dans le MM

L'environnement médullaire joue un rôle majeur dans la progression du clone tumoral grâce aux interactions des MMC avec les différentes composantes médullaires qui confèrent un environnement optimal aux MMC pour leur survie et leur prolifération.
L'analyse des GEP de patients présentant des lésions osseuses *versus* ceux qui n'en présentent pas a permis d'identifier seulement 4 gènes qui sont 4 marqueurs prédictifs de lésions osseuses dont DKK-1 [253].
La comparaison du GEP de cellules de l'environnement médullaire normal *versus* tumoral a permis de confirmer que les BMSC de patients atteints de MM étaient

différentes des BMSC de sujets sains : les BMSC de MM surexpriment 195 gènes dont l'IL-6 et DKK-1 [284]. Ces données confirment une place importante du microenvironnement dans la pathologie du MM qui constituent une niche très efficace pour promouvoir la croissance des cellules tumorales et les protéger de l'apoptose induite par les chimiothérapies.

Vacca *et al.* ont utilisé les GEP pour étudier les cellules endothéliales de l'environnement médullaire de patients atteints de MGUS et de MM en compraison avec les cellules HUVEC. Ils ont montré dans un premier travail une surexpression de gènes pro-angiogéniques dans les cellules de MGUS et de MM tels que VEGF, FGF-2, HGF, IGF-1 [227]. Récemment, cette équipe a comparé les GEP de cellules endothéliales de MGUS et de MM et a montré dans les MMEC une surexpression des gènes impliqués dans la régulation de la formation de l'os et de la matrice extracellulaire, dans l'adhésion cellulaire, dans le chimiotactisme, l'angiogenèse, dans la résistance à l'apoptose et dans la régulation du cycle cellulaire [285].

L'étude de l'interaction entre ostéoclastes et MMC a été réalisée par Ge *et al.* dans un système de culture ex vivo. Ils ont identifié que les MMC entraînaient une surexpression de 28 gènes chez les ostéoclastes dont FAP (fibroblast activation protein), une sérine protéase qui semble être critique dans l'environnement médullaire [286].

L'analyse de GEP de l'ensemble des cellules de la moelle osseuse de patients atteints de MM a permis d'identifier un certain nombre de gènes surexprimés dans l'environnement médullaire dont l'héparanase qui dégrade syndecan-1. Cette dégradation de syndecan-1 par l'héparanase est associée à l'angiogenèse et à la formation de métastases [287].

Suite à cette étude, notre équipe a publié un article sur la comparaison des GEP des gènes impliqués dans les chaînes héparane sulfate et condroïtine sulfate, qui sont les 2 éléments bioactifs de syndecan-1, entre les cellules B normales et les MMC.

(Article 2)

"Expression of genes encoding for proteins involved in heparin sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells" British Journal of Haematology 2009 , 145, 350–368

Cet article décrit une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des chaînes héparane sulfate et condroïtine sulfate durant la différenciation plasmocytaire en parallèle avec l'augmentation de l'expression de syndecan-1. 16 gènes différencient les cellules plasmocytaires normales et tumorales dont 4 sont associés à un pronostic. Ces données suggèrent un rôle des chaînes héparane sulfate et condroïtine sulfate dans la pathologie du MMC

Les puces ont démontré leur intérêt pour avancer dans la compréhension de la physiopathologie du MM [268]. Cela permet d'identifier de nouvelles protéines impliquées et donc de nouvelles cibles en vue de nouveaux traitements mais aussi d'apporter un nouvel outil de diagnostic.

III.3. Les objectifs de la thèse

Comme nous l'avons constaté, plus d'une quinzaine de facteurs de croissance sont déjà connus dans le MM mais des questions se posent sur l'importance de chacun d'eux et sur leur rôle respectif dans la pathologie. Quels sont les facteurs de croissance essentiels ? Quels sont les facteurs autocrine importants ? Agissent-ils en synergie ? De plus, on peut se poser la question sur leur relevance biologique réelle étant donné que l'effet de ces facteurs de croissance est étudié *in vitro* sur des lignées de myélome à un stade extramédullaire donc différent du stade intramédullaire.

Dans un premier temps, une étude sur la coopération des facteurs de croissance a été réalisée. Pour cela, un milieu de culture complètement défini a été developpé. Le milieu de culture habituellement utilisé (milieu RPMI + 10% sérum de voeuf fœtal + IL-6) pour les lignées de myélome contient des facteurs de croissance apportés par le sérum (tels que l'IGF-1, les membres de la famille EGF, l'insuline …). Pour étudier exclusivement les facteurs de croissances exogènes et leurs coopérations, la mise en place d'un milieu de culture sans sérum a donc été nécessaire. Nous avons étudié l'effet de 5 facteurs de croissance les plus documentés dans la littérature (IL-6, IGF-1, HGF, HB-EGF et APRIL) sur des lignées de myélome dans un milieu dépourvu de sérum et nous avons identifié l'IGF-1 comme facteur de croissance majeur du MM et la présence de son récepteur IGF-1R dans les cellules de patients atteints de MM comme facteur de mauvais pronostic.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'inhibiteur de BAFF/APRIL, TACI-Fc, favorisait la croissance des cellules de myélome en milieu sans sérum grâce à une boucle autocrine IGF-1/IGF-1R.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation de l'IGF-1R et plus particulièrement à l'effet de l'insuline qui possède une forte homologie avec l'IGF-1.

I. La présentation du système insuline/IGF

I.1. Les généralités

Le récepteur à l'insuline (INSR) et le récepteur à l'insulin-like growth factor (IGF-1R) sont des récepteurs à domaine tyrosine kinase (**RTK**) qui possèdent une **forte homologie de séquence** (60%). Cette homologie et une structure très conservée peuvent s'expliquer par un récepteur ancestral commun qui est impliqué dans le métabolisme, la taille des organismes et la longévité. Même si ces récepteurs ont beaucoup de similitudes, notamment dans leurs voies de signalisation, l'INSR et l'IGF-1R ont des fonctions distinctes, principalement grâce au domaine tyrosine kinase qui leur confère des rôles spécifiques. L'INSR est plus impliqué dans la régulation du **métabolisme glucidique** et l'IGF-1R dans le **contrôle de la prolifération** [288].

La famille insuline possède un ligand : l'insuline et 2 récepteurs sont connus : **INSR** existant sous 2 isoformes (**INSR-A et INSR-B**) et INSRR (INSR related receptor) n'ayant pas de ligand et de fonction connues.

La famille IGF est plus complexe. Il existe 2 ligands : **IGF-1 et IGF-2** et 2 récepteurs : **IGF-1R et IGF-2R** (n'ayant pas de domaine tyrosine kinase). De plus, il existe **6 IGFBP** (IGF binding protein), **4 IGFBPrP** (IGFBP related protein) et des **IGFBP protéases**. L'activité biologique des IGF est modulée par les IGFBP pour lesquels ils ont une grande affinité et les IGFBP protéases.

L'INSR et l'IGF-1R diffèrent des autres RTK car ils sont dimériques sans nécessité une liaison avec leur ligand. A l'inverse, les autres RTK se dimérisent grâce à la liaison d'un ligand qui entraîne une transphosphorylation du récepteur.

La famille insuline/IGF est soumise à des **« cross-talk »** du fait de leurs similitudes. D'une part, l'insuline peut se fixer à l'IGF-1R et inversement, les IGF à l'INSR. D'autre part, il existe un récepteur hybride (**Hybrid-R**) qui est composé d'un monomère d'IGF-1R et d'un monomère d'INSR, présent sous 2 isoformes en fonction de l'isoforme de l'INSR impliqué : **Hybrid-R^{A} et Hybrid-R^{B}**. Son affinité pour les ligands et sa fonction sont sujets à controverse.

I.2. La structure des ligands et des récepteurs de la famille insuline/IGF

I.2.1. L'INSR et l'IGF-1R

L'INSR et l'IGF-1R sont des RTK transmembranaires qui sont tous les 2 synthétisés sous forme d'un précurseur ayant une unique chaîne polypeptidique (180 kDa). Ce précurseur est glycosylé, dimérisé et soumis à des clivages protéolytiques afin de séparer les chaînes α (135 kDa) et β (95 kDa) qui s'assemblent pour former un récepteur mature dimérique $\alpha 2\beta 2$. Les domaines de liaison des ligands sont situés majoritairement dans les sous-unités α qui sont extracellulaires [289].

L'INSR et l'IGF-1R possède respectivement 22 exons et 21 exons. L'exon 11 (12 aa) de l'INSR peut être soumis à un épissage alternatif constituant ainsi les 2 isoformes : l'isoforme A (INSR-A : $INSR^{-exon11}$) et l'isoforme B (INSR-B : $INSR^{+exon11}$). Seulement 12 aa diffèrent ces 2 formes. Il n'existe pas d'équivalence de l'isoforme A dans les récepteurs à l'IGF [290,291].

La figure 4 représente la structure moléculaire de ces récepteurs caractérisée par 11 domaines ayant 41 à 84% d'homologie de séquence entre eux selon le domaine concerné (domaine TK est le domaine le plus similaire).

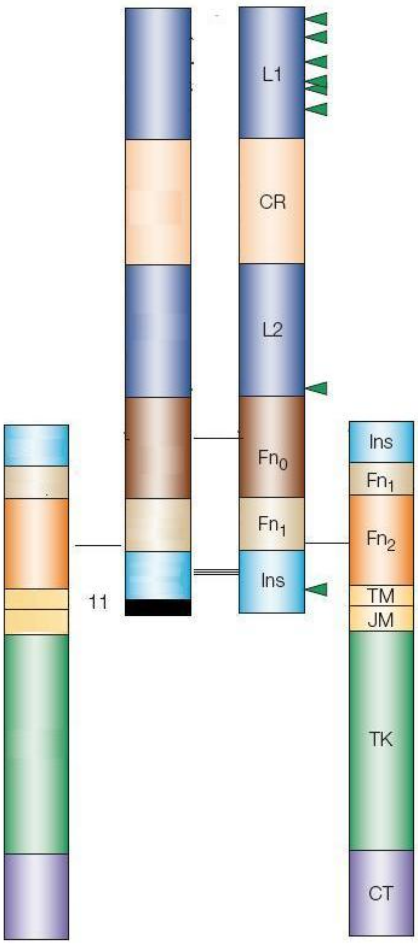


Figure 4 : La structure moléculaire de l'INSR et l'IGF-1R d'après De Meyts *et al.* [289] L'INSR et l'IGF-1R possèdent les mêmes domaines de structure. L1 et L2 : large domaine (répétitions riches en leucines) ; CR : domaine riche en cystéines ; Fn0, Fn1 et Fn2 : domaine fibronectine de type III ; Ins : domaine insert dans Fn1; TM : domaine transmembranaire ; JM : domaine juxtamembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase ; CT : extrémité carboxy-terminal. Les flèches vertes indiquent les sites de liaisons au ligand définis « hot spots ». Les 2 sous-unités α sont reliées par 4 ponts disulfures : 1 se trouvent dans le domaine Fn0 et 3 dans Fn1. Un seul pont disulfure relie les sous-unités α et β entre Fn1 et Fn2. Exon 11 : exon codant pour l'INSR qui différencie les 2 isoformes A et B.

L'INSR et l'IGF-1R contiennent dans l'extrémité N-terminale de la chaîne α 2 domaines homologues successifs dit « globulaires » (L1 et L2) séparés par une région riche en cystéine (CR). Ces 3 domaines (L1, L2 et CR) forment une large cavité qui va permettre la liaison du ligand sur son récepteur. Après le domaine L2 se trouvent 3 domaines de fibronectine de type III (Fn0, Fn1 et Fn2). Le Fn1 est coupé en 2 par un domaine insert (Ins) de 124 acides aminés. Ce site insert est situé à l'extrémité C-terminale de la chaîne α et l'extrémité N-terminale de la chaîne β. La portion intracellulaire de la chaîne β contient un domaine tyrosine kinase, entouré de 2 régions régulatrices : un domaine JM (juxtamembranaire) qui est impliqué dans l'encrage des substrats de ces récepteurs (IRS-1 à 4 (insulin receptor substrat) et SHC) et dans l'internalisation du récepteur et un domaine C-terminal qui contient 2 sites de liaison aux phosphotyrosines.

Des expériences de mutagenèse ont révélé que les sites de liaison de l'insuline à INSR se trouvaient dans **le domaine de L1 et dans la partie C-terminale** de la chaîne α (domaine insert). Le domaine L1 et la partie C-terminale de la chaîne α de

l'IGF-1R sont également critiques dans sa liaison avec l'IGF-1 et l'IGF-2. Le **domaine CR** est uniquement important pour lier l'IGF-1 [289].

Le récepteur hybride (Hybrid-R) qui est un hétérodimère IGF-1R/INSR doit avoir les mêmes sites de liaisons de l'INSR et de l'IGF-1R avec leurs ligands (similaires entre ces 2 récepteurs). Les ligands de ce récepteur hybride sont sujets à controverse et sa fonction est mal connue.

I.2.2. L'IGF-2R

L'IGF-2R est beaucoup moins étudié. Ce récepteur monomérique transmembranaire fait 300 kDa et ne possède pas de domaine tyrosine kinase. Il comprend 3 domaines : un domaine extracellulaire contenant 15 domaines de séquences répétées d'environ 147 aa, un domaine transmembranaire de 23 aa et une partie C-terminale de 163 aa. L'IGF-2R a une **forte affinité pour l'IGF-2** et une très **faible affinité pour l'IGF-1**. Il est décrit que les domaines 11 et 13 sont impliqués dans la liaison de l'IGF-2 à ce récepteur [292]. Comme ce récepteur n'a pas de capacité à transduire de signal, l'IGF-2R est connu comme un **inhibiteur d'IGF-2** puisque l'IGF-2R séquestre, internalise et dégrade l'IGF-2 qui n'est plus disponible pour activer l'IGF-1R [293]. L'IGF-2R est également le récepteur du mannose-6-phosphate [292].

I.2.3. L'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2

L'IGF-1 et l'IGF-2 possèdent 70 et 67 aa respectivement sur une unique chaîne polypeptidique qui est répartie en **4 domaines nommées B, C, A et D** (dans l'ordre de N vers C-terminal) [293].

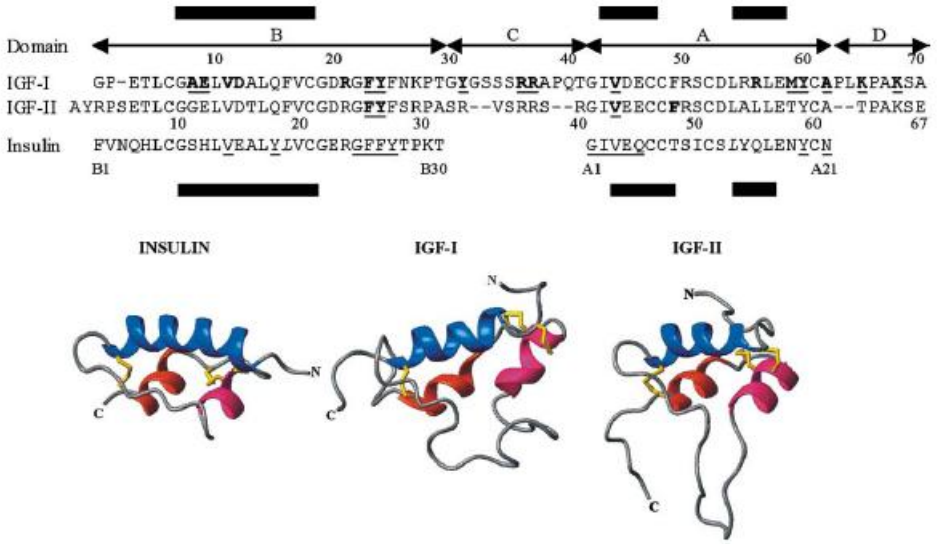
L'insuline est un monomère comprenant 2 chaînes reliées par 2 ponts disulfures : les **chaînes A et B** possèdent 21 et 30 aa. A forte concentration (µM), l'insuline peut former un dimère voire même un hexamère [290].

Les domaines A et B de l'IGF-1 et de l'IGF-2 ont une homologie de séquence de 50% avec l'insuline. La structure majeure de ces 3 ligands est 3 hélices α où 2 sont situées dans le domaine A et l'autre dans le domaine B. Ces ligands possèdent également 3 ponts disulfures qui forment la structure 3D dont 2 relient le domaine A et B et l'autre est situé dans le domaine A (Figure 5).

Figure 5 : Les alignements de séquences et configuration de l'insuline, de l'IGF-1 et de l'IGF-2 selon Denley *et al.* [293]

Les rectangles noirs représentent les hélices α. Les aa en gras et/ou soulignés sont les aa importants pour la liaison à leur récepteur respectif.

L'hélice α bleu se situe dans le domaine B et les 2 hélices α rouges dans le domaine A.



Comme vu dans la figure 5, les aa importants pour les liaisons des ligands aux récepteurs ont été identifiés par mutations, délétions, multiples mutations et chimères des différents ligands. Le **domaine B** de l'IGF-1 et de l'insuline est important pour leur liaison au récepteur. Cette région de l'insuline et de l'IGF-1 est de forte homologie et la substitution de l'une à l'autre ne change pas l'affinité de liaison de ces ligands. Seulement 4 aa sont nécessaires à cette interaction ligand/récepteur. Ces aa sont également impliqués dans les liaisons réciproques, c'est-à-dire de l'IGF-1 à l'INSR et de l'insuline à l'IGF-1R. En revanche, le domaine B de l'IGF-2 n'a pas de rôle critique pour sa liaison à l'IGF-1R [293].

Le **domaine A** de l'insuline et de l'IGF-1 est également important dans leur interaction avec les récepteurs. 4 aa sont retrouvés impliqués dans cette liaison et sont d'ailleurs proches des 4 aa responsables de l'interaction ligand/récepteur du domaine B. Le domaine A de l'insuline et de l'IGF-1 permet aussi les liaisons réciproques : une chimère d'IGF-1 contenant le domaine A de l'insuline conserve les mêmes propriétés de liaison à l'IGF-1R que l'IGF-1 wt [293]. Le domaine A de l'IGF-1 permet aussi la liaison de l'IGF-1 à l'INSR.

Le **domaine C** présent uniquement sur les IGF joue un rôle déterminant dans la liaison de l'IGF-1 à l'IGF-1R, contrairement à l'IGF-2. Ce domaine C interagirait avec

le domaine CR de l'IGF-1R qui est seulement impliqué dans l'interaction IGF-1/IGF-1R. Le domaine C cause un réarrangement de la portion d'aa du domaine B responsable de la liaison de l'IGF-1 et de l'insuline pour les récepteurs respectifs. De façon intéressante, une chimère d'insuline avec le domaine C de l'IGF-1 est capable de lier à la fois l'INSR et l'IGF-1R avec une forte affinité [289]. Le domaine C de l'IGF-1 a un rôle mineur dans son interaction avec l'INSR.

Le domaine D n'a aucun effet dans l'interaction des IGF avec l'IGF-1R : sa délétion ne change pas l'affinité des ligands. En revanche, la délétion du domaine D de l'IGF-1 augmente l'affinité de l'IGF-1 pour l'INSR. Celle du domaine D de l'IGF-2 n'a pas été étudiée. Une chimère d'IGF-2 avec le domaine C de l'IGF-1 diminue légèrement l'affinité de l'IGF-2 pour l'INSR alors qu'une chimère d'IGF-1 avec le domaine C de l'IGF-2 améliore l'affinité de l'IGF-1 pour l'INSR. Il en résulte que le domaine D joue un rôle mineur dans la spécificité de liaison de l'IGF-1 et l'IGF-2 à l'INSR [289].

I.2.4. La superfamille des IGFBP

L'affinité des IGF pour les IGFBP est supérieure à celle pour l'IGF-1R ou pour l'IGF-2R. Cette interaction des IGF (IGF-1 et -2) avec leur récepteur peut être donc régulée positivement ou négativement par les IGFBP qui sont au nombre de 6 désignées sous le nom IGFBP-1 à IGFBP-6. Dans la circulation, **99% des IGF sont liés aux IGFBP** incluant le complexe IGFBP-3/ALS (acid labil subunit). Les IGFBP plasmatiques augmentent la **durée de vie** de l'IGF circulant et le délivrent au tissu. Dans les tissus, les IGFBP peuvent soit **inhiber** l'IGF en le séquestrant et ne le rendant pas disponible pour son récepteur ou soit **potentialiser** son action en le délivrant près de son récepteur. Les IGFBP délivrent l'IGF soit par protéolyse grâce aux IGFBP protéases, soit par leur interaction avec la matrice extracellulaire ou soit par leur phosphorylation qui diminue leur affinité pour les IGF. Les IGFBP ont aussi des actions indépendantes à l'IGF : elles sont impliquées dans la localisation intracellulaire et dans la liaison aux intégrines [294].

Les IGFBP ont toute une **structure commune** de 30 kDa comprenant une région N- et C-terminales riches en cystéines connectées par une région « linker » flexible. Les régions N- et C-terminales qui sont hautement conservées (12 cystéines dans la région N-terminale et 6 dans la C-terminale) possèdent une homologie de séquence respectivement de 58 et de 34% entre les différentes IGFBP, contrairement à la région linker qui est une séquence unique de chaque IGFBP (15% d'homologie). Ce

sont les **régions conservées** donc les régions N- et C-terminales qui permettent la fixation de l'IGFBP à l'IGF. Seulement 4 et 2 aa sont impliqués dans l'interaction IGFBP/IGF. Les sites de liaisons de l'IGF aux IGFBP sont propres à chaque IGFBP mais ils se situent au même site de liaison que pour l'IGF-1R c'est-à-dire dans les domaines B et A. Les domaines C et D ne sont pas ou faiblement impliqués dans l'interaction IGF/IGFBP. La région C-terminale de l'IGFBP est impliquée dans la fonction IGF indépendante de ces IGFBP et dans leur liaison à la matrice extracellulaire ou aux groupes héparanes sulfates (*via* son domaine « heparin-binding ») [295].

Des protéines riches en cystéines qui contiennent des structures et des fonctions similaires aux IGFBP ont été identifiées et nommées **IGFBPrP** (IGFBP related protein). Ces IGFBPrP et les 6 IGFBP forment la superfamille IGFBP. 4 IGFBPrP sont principalement décrites et sont désignées soit sous les noms IGFBPrP1 à IGFBPrP4 soit sous les noms IGFBP7 à IGFBP10. Ces IGFBPrP ont une **structure très conservée** par rapport aux IGFBP c'est-à-dire une région N- et C-terminales riches en cystéines et une région non conservé centrale. Le domaine N-terminal des IGFBPrP contient environ 18 cystéines et a une homologie de séquence entre 40 et 57% entre les IGFBP et de plus de 68% entre elles. Le reste de la séquence des IGFBPrP sans le domaine N-terminal possède peu d'homologie avec les IGFBP (15% d'homologie). Le peu de similitude de la région C-terminale explique la faible affinité des IGFBPrP à l'IGF. Les IGFBPrP peuvent lier l'insuline avec la même faible affinité que l'IGF-1. Le rôle physiologique de ces IGFBPrP est peu connu et la fonction de modulation des IGF par les IGFBPrP n'est pas claire [295].

De ces études, il résulte que la superfamille des IGFBP comprend 2 catégories :

- 6 IGFBP, qui possèdent une forte affinité pour l'IGF et une faible action IGF indépendante. Ces IGFBP modulent l'activité des IGF.
- 4 IGFBPrP (voire plus), qui possèdent une faible affinité pour l'IGF et un rôle prédominant indépendant de l'IGF.

I.2.5. Les affinités du système insuline/IGF

L'IGF-1 et l'IGF-2 ont une forte affinité pour l'IGF-1R, tout comme l'insuline pour l'INSR. Du fait de la grande homologie entre l'IGF et l'insuline et entre l'IGF-1R et l'INSR notamment dans leur interaction ligand/récepteur, l'IGF-1 et IGF-2 sont capables de se lier à l'INSR, tout comme l'insuline à l'IGF-1R. L'affinité de ces

ligands pour ces récepteurs est de **100 à 1000 fois plus faible** que pour leur propre récepteur (Table 5). Cependant, dans les conditions physiologiques normales, la concentration d'insuline circulante étant de 0,5 nM et l'affinité de liaison de l'insuline pour l'IGF-1R étant supérieur à 100 nM, l'insuline ne devrait pas exercer un effet à travers l'IGF-1R. Réciproquement, la concentration circulante de l'IGF-1 (majoritairement complexé aux IGFBP) étant de 20 nM et l'affinité de l'IGF-1 pour l'INSR étant supérieur à 120 nM, l'IGF-1 ne devrait pas induire la signalisation de l'INSR. A l'inverse, l'IGF-2 qui est en grande quantité dans la circulation (90 nM), devrait activer à la fois l'IGF-1R et l'INSR. Toutefois, la quantité d'IGF-2 libre est équivalente à celle de l'IGF-1 du fait de son inhibition par l'IGF-2R en plus des IGFBP [288].

En revanche, l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 peuvent exercer un effet *via* le **récepteur hybride IGF-1R/INSR**. Comme abordé précédemment, l'affinité des ligands pour l'Hybrid-R est controversée. Pandini *et al.* ont montré que l'IGF-1, l'IGF-2 et l'insuline pouvaient fixer l'Hybrid-R^A avec une affinité élevée alors que l'Hybrid-R^B fixe seulement l'IGF-1 avec une forte affinité et l'IGF-2 avec une faible affinité. L'affinité de l'insuline pour cet isoforme est quasi-inexistante (Table 5) [296]. Contrairement à ces données, Slaaby *et al*. ont montré que l'affinité des ligands pour les 2 Hybrid-R était similaire à celle de l'homodimère IGF-1R, ce qui suggère que l'Hybrid-R lie fortement l'IGF-1 et l'IGF-2 et faiblement l'insuline [297].

Table 5 : Les affinités de liaisons de l'insuline, de l'IGF-1 et de l'IGF-2 pour les récepteurs IGF-1R, INSR et Hybrid-R selon Denley *et al.* [293]

	IGF-1 ED_{50} (nM)	IGF-2 ED_{50} (nM)	Insuline ED_{50} (nM)
IGF-1R	0,2	0,6	>100
INSR-A	120	0,9	0,2
INSR-B	366	11	0,3
Hybrid-R^A	0,3	0,6	3,7
Hybrid-R^B	2,5	15	> 100

Comme évoqué précédemment, l'IGF-2R a une meilleure affinité pour l'IGF-2 que pour l'IGF-1, ce qui explique son rôle inhibiteur d'IGF-2 et pas d'IGF-1. Les IGFBP ne fixent que l'IGF-1 et l'IGF-2 avec des affinités élevées mais variables en fonction de l'IGFBP impliquée [293].

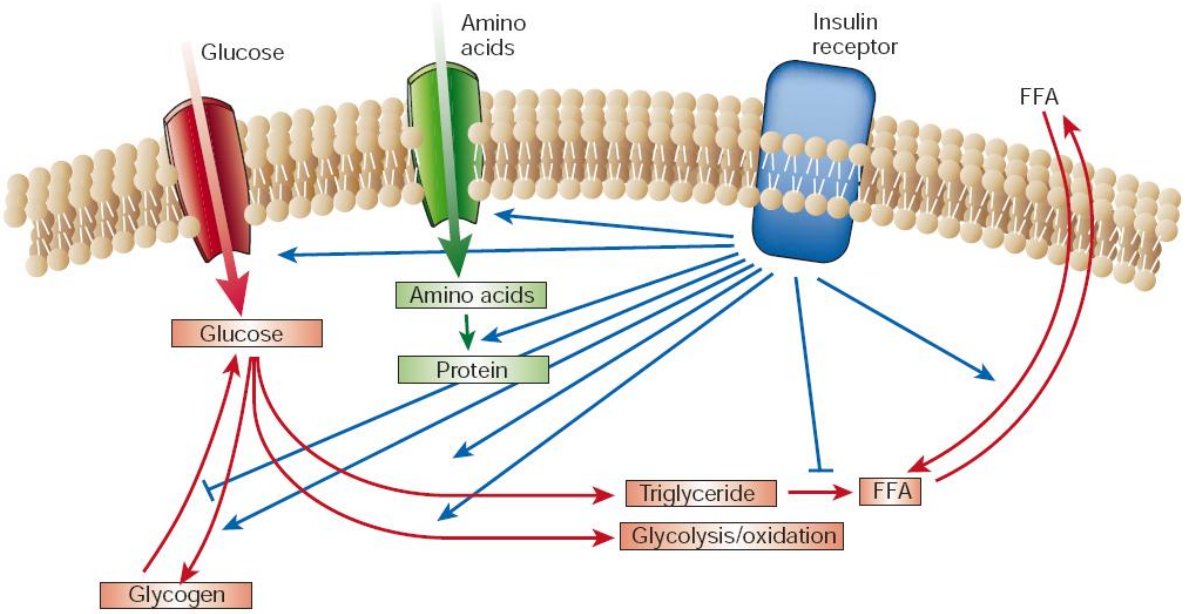
I.3. Le rôle des ligands et récepteurs de la famille insuline/IGF

I.3.1. La fonction physiologique du système insuline/IGF

1) L'insuline

L'insuline joue un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques glucidiques et lipidiques qui sont principalement le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. Le récepteur à l'insuline est surtout présent dans 3 tissus **- foie, muscle et tissu adipeux -** qui sont donc les 3 principaux tissus cibles de l'insuline [298]. L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du **pancréas** en fonction des prises alimentaires, sous l'influence de la glycémie élevée. L'insuline va favoriser l'entrée du glucose et son stockage en glycogène ou en acides gras. L'insuline inhibe en parallèle la dégradation du glycogène et des acides gras (glycogénolyse et la lipolyse) ainsi que leurs relargages dans la circulation. L'entrée du glucose dans les cellules et l'arrêt de la dégradation du glycogène conduisent à baisser la glycémie. La synthèse de glycogène est réalisée dans le foie et les muscles. Les acide gras issus de la lipogenèse sont stockés dans le tissu adipeux [299]. L'insuline favorise également l'entrée et le stockage des acides aminés dans la cellule (Figure 6). A distance des repas, la baisse de la sécrétion d'insuline associée à l'hypoglycémie entraîne la synthèse de glucose par dégradation du glycogène en glucose par le foie et en cas de jeûne prolongé par dégradation des acides gras.

Figure 6 : La régulation du métabolisme glucidique par l'insuline selon Saltiel *et al.* [299]. L'insuline favorise la synthèse et le stockage en glycogène, lipides et protéines tandis qu'il inhibe leur dégradation et leur relargage dans la circulation. L'insuline stimule l'entrée du glucose, des acides aminés et des acides gras dans la cellule. Il augmente l'expression ou l'activité des enzymes qui catalysent la synthèse en glycogène, lipides et protéines et inhibe l'expression ou l'activité des enzymes qui catalysent leur dégradation.



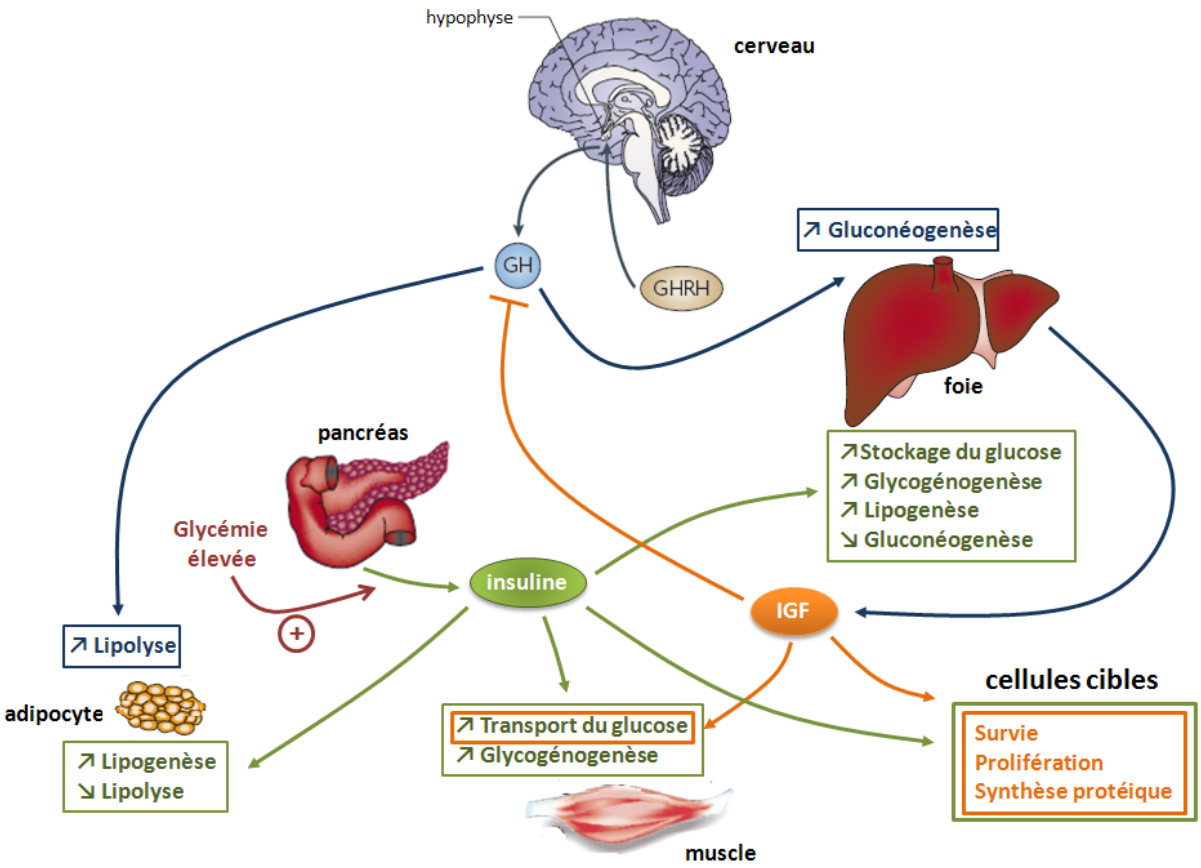
Le **diabète de type 2** aussi appelé diabète non-insulinodépendant est caractérisé par un déséquilibre du métabolisme du glucose. Les cellules chargées de capter le glucose deviennent **insensibles à l'insuline**. De ce fait la glycémie augmente et les cellules β du pancréas vont produire plus d'insuline pour forcer la prise de glucose par les cellules. Au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, les cellules β vont s'épuiser et la production d'insuline va diminuer puis disparaître. La glycémie va augmenter et conduire à une glucotoxicité qui va engendrer une **insulinorésistance** et une destruction directe des cellules β du pancréas. Cela entraîne l'aggravation de la maladie avec une **hyperglycémie** qui ne cesse d'augmenter.

2) Les IGF

L'IGF-1 et l'IGF-2 ont un rôle majeur durant le développement pré et postnataux. A la naissance, la production d'IGF se fait dans **le foie** sous le contrôle de l'hormone de croissance **GH** (Growth hormone) sécrétée par l'hypothalamus en réponse à la **GHRH** (Growth Hormone releasing hormone) [300]. L'IGF est alors relargué dans la circulation associé à des IGFBP qui permettent de stabiliser ce ligand et le conduire vers les tissus cibles pour exercer son rôle de survie et de prolifération (Figure 7).

La production des IGF peut se faire de manière GH indépendante car l'IGF est également produit par des sites **extrahépatiques** tels que les cellules tumorales ou les fibroblastes stromaux [301].

Figure 7 : Les fonctions du système insuline/IGF dans l'organisme. Après une prise alimentaire, le glucose produit par le foie entraîne une glycémie élevée qui va induire une production d'insuline par le pancréas. L'insuline va agir sur ces 3 principaux tissus cibles, le foie, les muscles et le tissu adipeux afin de bloquer la production de glucose par le foie, de favoriser son entrée dans les cellules et le stocker en glycogène (glycogénogénèse) par le foie et les muscles ou en acides gras (lipogenèse) par le tissu adipeux. L'insuline inhibe également les mécanismes inverses de production de glucose c'est-à-dire la glycogénolyse, la gluconéogenèse et la lipolyse. De ce fait, la glycémie va diminuer. Dans le cas de l'hypoglycémie, l'insulinémie est faible et ce sont les mécanismes inverses qui auront lieu afin de déstocker les réserves énergétiques. Les IGF sont produits par le foie en réponse à la GH (Growth hormone). La GH est sécrétée par l'hypophyse *via* la stimulation de la GHRH (Growth hormone release hormone). Une fois dans la circulation, les IGF sont couplés aux IGFBP qui permettent de les stabiliser et de les conduire aux tissus cibles où les IGF favoriseront la synthèse protéique, la survie et la prolifération des cellules. L'insuline est décrite pour avoir également un rôle sur ces effets. L'IGF-1 peut également soutenir les effets de l'insuline en favorisant indirectement l'entrée du glucose dans les muscles. La GH agit directement sur le foie et les adipocytes et possède un rôle antagoniste à l'insuline en favorisant la gluconéogenèse et la lipolyse qui conduisent à une élévation de la glycémie. L'IGF-1 inhibe la sécrétion de GH par l'hypophyse et donc bloque indirectement les effets inhibiteurs de l'insuline par la GH [302].



3) Les IGFBP

Les IGFBP ont des sites de productions spécifiques et sont régulées par de nombreuses protéines ou conditions qui leur confèrent des fonctions différentes. La famille des IGFBP ont des actions **dépendantes ou indépendantes des IGF** mais leurs fonctions sont encore peu connues. Leurs caractéristiques sont synthétisées à la table 6.

Table 6 : Les caractéristiques et les fonctions des IGFBP selon Meinbach *et al.* [303]

IGFBP	site de production	action	régulateur +	régulateur -
IGFBP-1	foie, rein	lie IGF-1 et IGF-2 avec la même affinité, associé avec une augmentation de la matrice extracellulaire et hypertrophie rénale	déficience d'insuline	insuline et stéroïdes
IGFBP-2	prostate et système nerveux central	développement du système nerveux central	taux d'insuline réduit, régime pauvre en protéines	rapide prolifération, facteurs de croissance, TGF-β
IGFBP-3	foie, ostéoblastes, tissus osseux et cellule de Kupffer	régule le relarguage d'IGF-1, se fixe aux récepteurs de surface et active les voies pro-apoptotiques, quelques fois action indépendante d'IGF-1	IGF-1, IGF-2, TGF-β, vitamine D, acide rétinoïque	glucocorticoïdes
IGFBP-4	foie, os, système nerveux central, prostate	lie IGF-1	vitamine D, acide rétinoïque	IGF-2, glucocorticoïdes
IGFBP-5	rein, placenta, ostéosarcome	se lie aux cellules de l'os *via* l'hydroxyapatite, séquestre l'IGF-1 dans la matrice osseuse, favorise l'interaction IGF-1/IGF-1R dans l'os	condition diabétique	FSH
IGFBP-6	ovaire, prostate	lie spécifiquement l'IGF-2	IGF-2, facteurs de croissance, BMP	dexaméthasone

Excepté l'IGFBP-1 qui est majoritairement exprimée dans le foie, les autres IGFBP sont présentes dans plusieurs tissus *via* une régulation complexe. Tout comme l'IGF-1, la GH stimule la production hépatique d'IGFBP-3 ainsi que la protéine ALS (acid labil subunit) qui est la principale source de ces 2 protéines [304]. Alors que l'insuline est le régulateur majeur de la production hépatique d'IGFBP-1, les mécanismes de régulation qui contrôlent l'expression d'IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5 et IGFBP-6 sont peu connus [304]. Les IGFBP-1 à IGFBP-5 lient préférentiellement l'IGF-1 alors que

l'IGFBP-6 a plus d'affinité pour l'IGF-2 [303]. Les IGFBP ont des actions indépendantes des IGF à travers leur liaison à d'autres protéines. L'IGFBP-1 interagit avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ favorisant l'adhésion et la migration cellulaires alors que les IGFBP-2, -3, -5 et -6 ont un domaine de liaison à l'héparine qui leur permettent de se fixer aux glycosaminoglycanes [305]. De plus, il existerait des récepteurs de surface des IGFBP mais ils ne sont pas caractérisés comme récepteurs fonctionnels.

I.3.2. La transduction du signal insuline/IGF

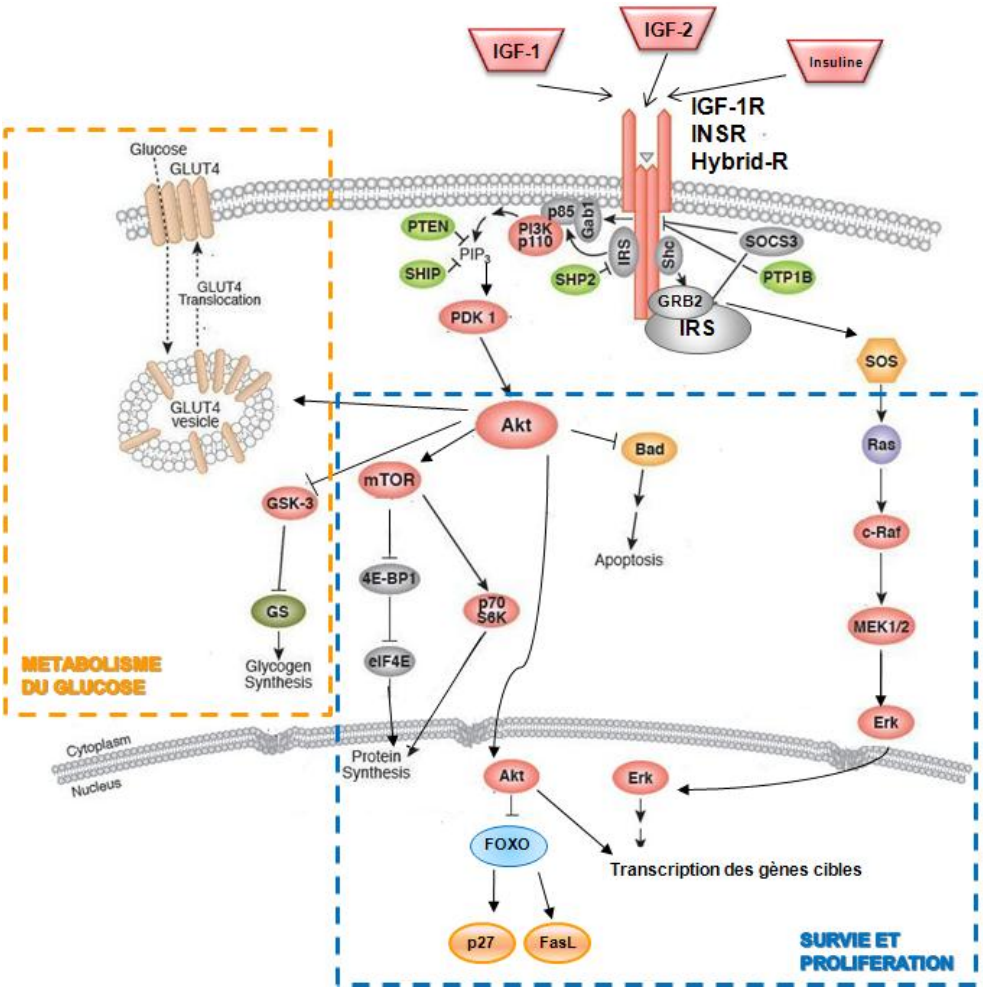
L'insuline et l'IGF-1 entraînent des effets biologiques en se liant sur leur récepteur respectif, l'INSR et l'IGF-1R. Bien que leurs abondances respectives varient en fonction des tissus, ces deux récepteurs sont exprimés à la surface de la plupart des cellules ainsi que les récepteurs hybrides qui sont fonctionnels. Clairement distincts au niveau extracellulaire par leur ligand spécifique, les deux récepteurs vont phosphoryler globalement les mêmes protéines de signalisation intracellulaire. Ces hormones activent avant tout les **IRS** (insulin receptor substrates 1 à 4) qui servent d'adaptateurs pour recruter les voies de transduction **PI3K/AKT** et **Ras/MAPK** [306] (Figure 8).

L'activation de l'INSR ou de l'IGF-1R entraîne la phosphorylation de ces récepteurs au niveau du domaine tyrosine kinase qui induit la phosphorylation des tyrosines des domaines juxtamembranaires et la phosphorylation des sérines carboxyterminal. Les protéines IRS (IRS-1 à IRS-4) qui sont déjà présentes au niveau de la membrane plasmique du côté du cytosol par le domaine PH (affinité pour les phospho-lipides membranaires) vont être recrutées par leur domaine PTB (phospho-tyrosine binding) au niveau du domaine juxtamembranaire des récepteurs de l'insuline ou de l'IGF-1. Ces IRS recrutées vont être phosphorylées par le domaine tyrosine kinase du récepteur et ensuite activer des protéines dites relais *via* leur domaine SH2 (src homology 2). Les principales étant la sous-unité régulatrice de la **phosphatidyl-inositol 3 (PI3) kinase, Shc** (Src homology and collagen) et les protéines adaptatrices Grb2. PI3K va entraîner l'activation d'**AKT** qui va à son tour activer ses substrats tels que **p70S6K** et inhiber le facteur **4E-BP1** (4E binding protein 1) *via* la kinase **mTOR** (mammalian target of rapamycin). L'activation de mTor permet d'augmenter la traduction. AKT possède aussi un effet anti-apoptotique en phosphorylant et en inhibant la protéine pro-apoptotique **Bad** ou les facteurs de

transcription **FOXO**. L'activation d'AKT par IRS peut également avoir un rôle dans le métabolisme du glucose en entraînant la translocation de **GLUT4** à la membrane et en inhibant **GSK-3**, un activateur de la synthèse du glycogène.

Grb2 est également activé par IRS ou indirectement par Shc (lui-même activé par IRS) et va à son tour phosphoryler Ras puis RAF et MAPK. MAPK va permettre l'activation de ces 2 substrats **ERK 1 et 2,** ce qui va induire les gènes cibles tels que FOS ou ELK1. La signalisation de l'insuline ou de l'IGF est régulée par de nombreuses protéines de déphosphorylation telles que **PTP1B, PTEN, SHP2 ou SHIP** [307,308].

Figure 8 : Les voies de signalisations de l'INSR et de l'IGF-1R. L'activation de l'INSR ou de l'IGF-1R par leurs ligands entraîne la phosphorylation des IRS qui vont induire les voies PI3K/AKT/mTOR et ras/raf/MAPK. Le métabolisme du glucose sera médié par AKT qui va favoriser l'entrée du glucose par une translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et inhiber la synthèse du glycogène en inactivant GSK-3. La survie et la prolifération seront engendrées par l'activation de la voie MAPK et également l'activation d'AKT qui va induire mTOR et inhiber FOXO et Bad. L'inhibition de la signalisation insuline/IGF peut être entraînée par de nombreuses protéines qui déphosphorylent directement le récepteur tel que PTP1B, SOCS3 ou IRS tel que SHP2.



Malgré cette « ressemblance », les signalisations de l'IGF/IGF-1R et de l'insuline/INSR produisent des effets assez distincts [309]. Les modèles de souris knock-out (KO) ou transgéniques ont permis d'identifier leurs fonctions biologiques [310,311] (Table 7).

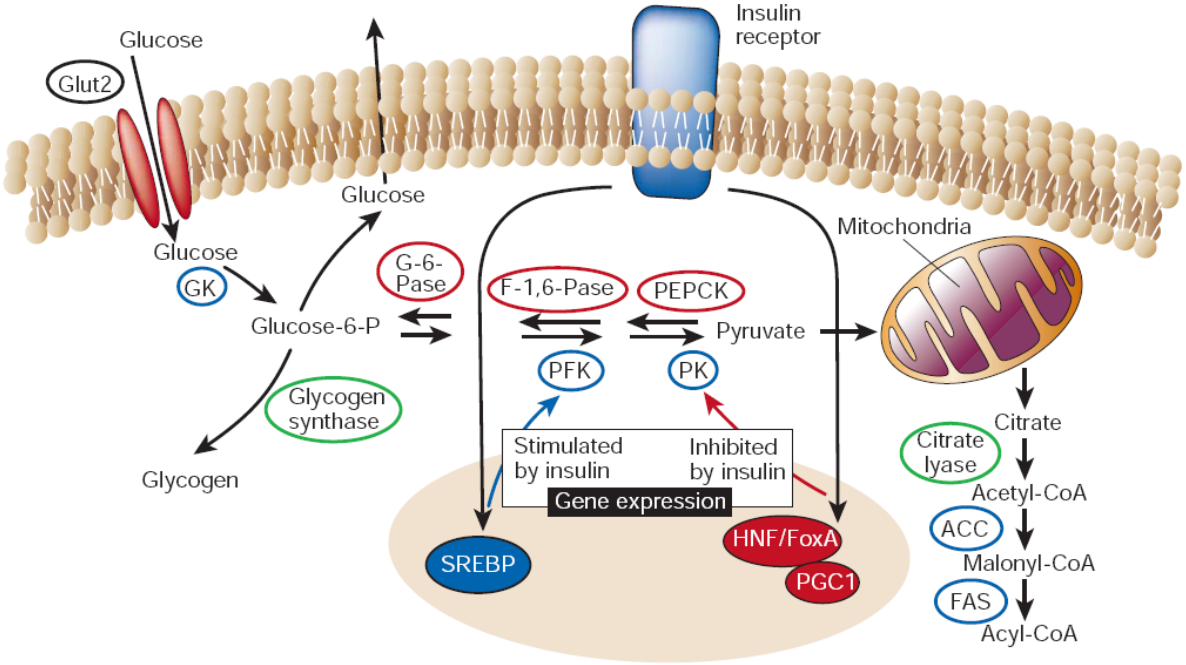
I.3.3. Les fonctions biologiques du système insuline/IGF

L'insuline/IGF sont des protéines clées de la vie des mammifères à travers l'activation des IRS qui contrôle **la croissance, le métabolisme et la reproduction**. L'IGF-1R est impliqué dans le développement fœtal et la croissance postnatale *via* l'IGF-1 et l'IGF-2. L'INSR joue un rôle dans le développement fœtal *via* l'IGF-2 et dans le métabolisme postnatal *via* l'insuline. Il faut préciser que l'IGF-2 est un ligand bi-fonctionnel car il stimule l'IGF-1R et l'INSR en entraînant différentes propriétés.

1) Les KO insr ou Insuline

Les souris *insr*$^{-/-}$ naissent avec un léger défaut de croissance (90% par rapport au wt) mais un développement embryonnaire non altéré. Après la naissance, le contrôle du métabolisme du glucose est rapidement détérioré avec un taux de glucose augmenté (de 100 à 1000 fois plus que le wt), ce qui conduit rapidement à un défaut des cellules β du pancréas puis à une mort par acidocétose diabétique [312,313]. Ces résultats sont confirmés avec les souris KO *insuline* [314] et suggèrent que l'insuline/INSR est nécessaire au **métabolisme glucidique mais pas au développement prénatal**. De plus, les souris développent également un diabète de type 2 quand elles ont une mutation homozygote pour les gènes *glut2* ou *glucokinase*, 2 gènes impliqués dans le métabolisme glucidique (Figure 9) [315,316].

Figure 9 : La régulation du métabolisme glucidique dans le foie selon Saltiel *et al.* [299]. L'insuline stimule le stockage du glucose en glycogène et lipide et inhibe la synthèse et le relargage du glucose. Ces mécanismes sont régulés par la synthèse et l'activité de nombreuses enzymes. L'insuline active l'expression des gènes des enzymes impliquées dans la synthèse du glucogène et des acides gras (en bleu) et inhibe l'expression des gènes des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse (transformation du glucose à partir de composés non glucidiques tels que le lactate, le glycérol, les acides aminés) (en rouge). La glycogène synthase et la citrate lyase régulent également ces mécanismes en changeant le statut de phosphorylation des produits générés. GK, glucokinase; Glucose-6-P, glucose-6-phosphate; G-6-Pase, glucose-6-phosphatase; F-1,6-Pase, fructose-1,6-bisphosphatase; PEPCK, phospho-enolpyruvate carboxykinase; PFK, phosphofructokinase; PK, pyruvate kinase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty-acid synthase.



Le manque de retard de croissance de la souris *insr* $^{-/-}$ est étonnant car l'effet de l'IGF-2 est en partie médié par l'INSR mais il peut être expliqué par une augmentation de l'expression de l'IGF-1R pour compenser l'effet de la perte de l'INSR [317].

A la différence des souris, chez l'humain la production d'insuline et la réponse à cette hormone s'établissent in utéro et favorisent la croissance des cellules adipeuses. Des syndromes avec délétions de l'*insr* provoquent des hypoinsulinémies et des retards sévères de croissance gestationnelle ainsi qu'au diabète à la naissance [318].

Ces résultats montrent que l'insuline est un **facteur de croissance fœtal**. Le diabète s'explique par une production de glucose non restreinte et un taux d'insuline qui augmente au fur et à mesure en association à des résistances extrêmes à l'insuline.

2) Les KO igf1r ou igf1

Les souris avec une mutation nulle homozygote d'*igf1r* ou *igf1* souffrent d'un **retard sévère du développement fœtal** (45% et 60% par rapport aux souris wt) et meurent à la naissance d'une insuffisance respiratoire. Ces souris possèdent de nombreuses anomalies telles que des défauts du développement musculaire, osseux, du cartilage et du système nerveux central mais ont un **métabolisme glucidique normal** [319-321]. Cependant, une autre étude montre que les souris KO *igf1r* développent une hyperglycémie et une diminution des cellules β du pancréas montrant ainsi que l'IGF-1 est indispensable pour le développement des cellules β du pancréas et nécessaire à leur maintenance à l'état différencié [322].

La souris *igf1r*$^{-/-}$ *igf1*$^{-/-}$ possède également un retard de croissance in utéro équivalent aux souris homozygotes *igf1r*$^{-/-}$ (45%), ce qui suggère que l'effet d'IGF-1 passe exclusivement par l'IGF-1R [319]. Un défaut de développement de croissance est également observé sur des souris ayant des mutations homozygotes de gènes impliqués dans la signalisation d'IGF-1 tels que *pdk1, akt1* et *s6k1* [323-325].

Comme évoqué précédemment, la production d'IGF est GH indépendante durant le développement fœtal et devient GH dépendante à la naissance. De ce fait, les souris *grh*$^{-/-}$ (récepteur GH) ont des défauts de croissance uniquement postnataux et la synthèse hépatique d'IGF est diminuée de 98% avec un taux sérique indétectable [326]. Il en résulte que la croissance médiée par l'IGF durant la croissance prénatal est donc indépendante de la GH et devient dépendante de la GH durant la croissance postnatale. La production hépatique des IGF et leurs présences sériques sont exclusivement sous le contrôle de la GH. Cependant, les IGF sont également produits par des sites extrahépatiques.

Pour évaluer la production d'IGF dépendante ou indépendante de la GH, des souris ayant le gène *igf1*$^{-/-}$ muté dans le foie ont permis d'identifier que la moitié de la l'action de l'IGF est hépatique donc GH dépendante et l'autre moitié provient d'autres tissus dont la production est indépendante de la GH [327,328].

Des mutations de l'*igf1r* et *igf1* ont également été identifiées chez des sujets humains qui possèdent le même phénotype que les souris *igf1r*$^{-/-}$ ou *igf1*$^{-/-}$ c'est-à-dire des défauts de croissance pré et postnataux [329-332]. Il n'y a pas de mutation homozygote du récepteur identifiée, ce qui suggère que cette mutation est létale.

Il est à noter qu'une délétion partielle d'*igf1r* prolonge la vie des souris. Ces souris *igf1r*$^{+/-}$ ont un métabolisme énergétique normal sans modification majeure de la taille [333].

3) Les KO igf2r ou igf2

Les souris *igf2*$^{-/-}$ ont un poids d'environ 60% par rapport aux souris wt. Cependant leur développement postnatal n'est pas altéré, ce qui démontre un rôle d'IGF-2 uniquement dans la **croissance embryonnaire**, à la différence des souris KO *igf1* qui possèdent des retards de croissance pré et postnataux [334].

Le phénotype des souris *igf2r*$^{-/-}$ est complètement différent de celui des souris *igf2*$^{-/-}$. Ces souris meurent en période périnatale et ont un taux d'IGF-2 élevé dû à la perte d'IGF-2R qui provoque des **anomalies de développement** (agrandissement anormal des organes) associées à un poids supérieur de 40% par rapport aux souris wt [335,336]. Ce phénotype des souris *igf2r* peut être reversé par la délétion d'*igf1r* : les souris *igf2r*$^{-/-}$ *igf1r*$^{-/-}$ ont un phénotype normal [337]. Ces données suggèrent que l'IGF-2R est nécessaire à la clairance d'IGF-2 et que l'IGF-2 passe par l'IGF-1R pour provoquer les défauts du développement des souris *igf2r*$^{-/-}$. La signalisation d'IGF-2 médiée par l'INSR est suffisante pour engendrer la croissance mais ne l'est pas pour induire des anomalies embryonnaires létales. De plus, comme une souris mutante triple homozygote *igf2r*$^{-/-}$ *igf1r*$^{-/-}$ *insr*$^{-/-}$ est non viable, l'INSR peut se substituer à l'IGF-1R pour promouvoir la croissance [317].

Il est à noter que la survie et la croissance des souris *igf2r*$^{-/-}$ *igf1r*$^{-/-}$ ne sont pas médiées par l'IGF-2 qui est absente après la naissance des souris. Ce qui laisse supposer que la croissance et la survie des souris après leur naissance sont dues à la signalisation IGF-1/INSR, étant donné que le taux d'IGF-1 circulant couplé aux IGFBP est 1000 fois plus importante que celui de l'insuline [338].

4) Le rôle du récepteur hybride INSR/IGF-1R

Le phénotype des souris *insr*$^{-/-}$ (diabétiques) et celles *igf1r*$^{-/-}$ (petites tailles) sont très dissemblables et suggèrent que le récepteur hybride INSR/IGF-1R n'a **pas de fonction spécifique** dans le développement. Une étude sur une souris KO pour le domaine kinase d'INSR affectant l'activité de l'homodimère INSR et de l'Hybrid-R ne possède pas plus de retard de croissance que la souris *insr*$^{-/-}$ (90% du poids du wt) [339]. Des études de l'équipe de Gespi montrent une augmentation du ratio de l'Hybrid-R dans les muscles et le tissu adipeux des patients ayant le diabète de type 2 [340,341].

Cette augmentation de la formation du **récepteur hybride INSR/IGF-1R** est corrélée avec une **diminution de la sensibilité à l'insuline** et une **augmentation de la sensibilité à l'IGF-1** dues à l'affinité plus importante de l'Hybrid-R pour l'IGF-1 dans les conditions physiologiques. L'Hybrid-R séquestre donc les monomères d'INSR et d'IGF-1R sous la forme d'un récepteur sensible à l'IGF-1. Cette diminution de la sensibilité à l'insuline et l'augmentation de la sensibilité à l'IGF-1 pourrait contribuer à l'hyperinsulinémie ainsi qu'à la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 [340-342].

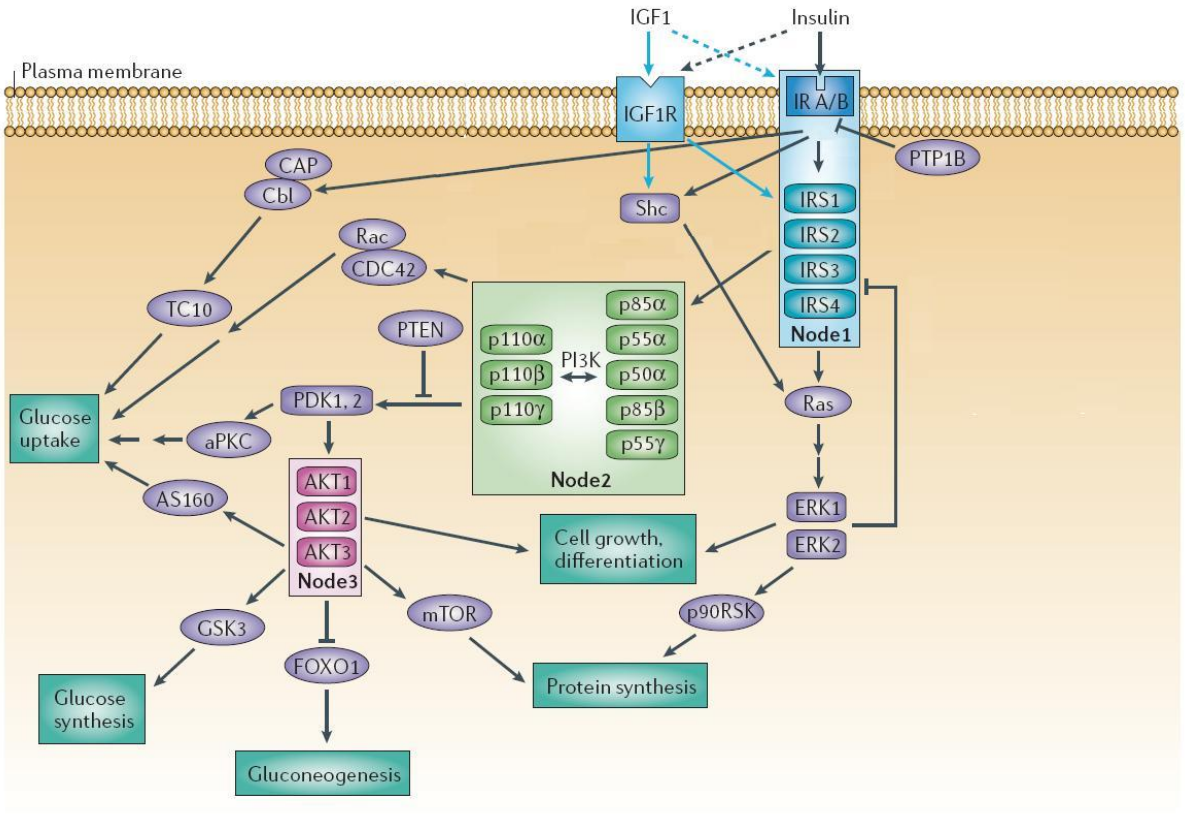
5) Les souris transgéniques IGFBP

Le seul KO de souris pour IGFBP publié ayant un retard de croissance est le KO *igfbp2* qui ne possède pas de retard de croissance général mais seulement une taille réduite des reins et du foie [343]. Des études ont par la suite été faites sur des modèles de souris transgéniques surexprimant les IGFBP. Les manifestations prédominantes de la surexpression des IGFBP sont un retard de croissance généralisé ou localisé. Dans certains cas, l'effet de la surexpression d'IGFBP-1 ou d'IGFBP-3 peut conduire à un défaut du métabolisme du glucose [305]. Ces données laissent à penser que les IGFBP ne possèdent **pas de rôle physiologique important *via* un effet indépendant des IGF**. Il est décrit que la surexpression d'IGFBP-1, d'IGFBP-2 ou d'IGFBP-3 entraîne des retards de croissance contrairement à l'IGFBP-5 qui n'a pas d'effet [305,344-346].

6) Les différences des voies de signalisations de l'insuline et de l'IGF-1

Comme vu précédemment, l'insuline et l'IGF-1 ont des fonctions bien distinctes malgré l'activation des mêmes voies de signalisation. Cette différence de fonction s'explique par la présence de **3 nœuds critiques** dans leurs voies de signalisation concernant **les protéines de la famille IRS, les sous-unités des PI3K et les isoformes AKT**. Chaque nœud représente plusieurs isoformes d'une kinase, activées en fonction de leur affinité pour l'activateur présent en amont, qui vont engendrer des fonctions différentes (Figure 10).

Figure 10 : Les nœuds critiques des voies de signalisations du système insuline/IGF d'après Taniguchi *et al.* [347]. Les nœuds critiques constituent une part importante des fonctions distinctes engendrées par l'INSR et l'IGF-1R. Le premier nœud critique concerne les protéines IRS. En fonction de l'IRS activée, plusieurs signalisations peuvent être induites : soit l'activation de la voie Ras/MAPK qui va résulter à une synthèse protéique, une croissance et une différentiation cellulaire, soit à une activation du deuxième nœud critique. Le recrutement des différentes sous-unités de la PI3K va, elles aussi, conduire à différentes signalisations : soit à une entrée du glucose *via* Rac/CDC42, *via* aPKC/PDK1-2 ou *via* le troisième nœud critique comprenant les isoformes AKT. Les isoformes AKT sont également impliquées dans la croissance et la différentiation cellulaires, la synthèse protéine, la gluconéogenèse et la synthèse du glucose. Abbreviations : atypical protein kinase C (aPKC), Akt substrate of 160 kDa (AS160), Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue (Cbl), Cbl-associated protein (CAP), cell-division cycle 42 (CDC42), extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1 and ERK2), forkhead box O1 (FOXO1), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), mammalian target of rapamycin (mTOR), p90 ribosomal protein S6 kinase (p90RSK), phosphoinositide-dependent kinase 1 and 2 (PDK1 and 2), phosphatase and tensin homologue (PTEN), protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), Ras, Rac, Srchomology-2-containing protein (Shc), signal transducer and activator of transcription (STAT), and Ras homologue gene family, member Q (ARHQ; also called TC10).



La famille des protéines IRS

Les 4 membres IRS sont les premiers modulateurs de la signalisation de l'IGF-1R et de l'INSR. Ils diffèrent de leurs distributions tissulaires, de leurs affinités de liaison à l'IGF-1R et à l'INSR et de leurs interactions avec les protéines relais ayant un domaine SH2. Les présences d'IRS-1 et d'IRS-2 sont hétérogènes dans les cellules

alors que l'expression d'IRS-3 est limitée aux adipocytes et au cerveau et qu'IRS-4 est exprimé principalement dans les tissus embryonnaires [347].

Les souris *irs1*$^{-/-}$ possèdent un retard de croissance (pré et postnataux) ainsi qu'une résistance à l'insuline. Ces souris ont un retard de croissance équivalente aux souris *igf1*$^{-/-}$ donc **IRS-1** est impliqué dans **l'activité de croissance d'IGF-1** et également dans **l'action métabolique d'INSR** [348].

Les souris *irs2*$^{-/-}$ sont de taille normale mais développent une hyperglycémie due à altération de la croissance des cellules β. **IRS2** est donc impliqué dans la **signalisation d'INSR** [322,349].

L'absence de *irs3* n'a pas d'effet sur la fonction ou le métabolisme des adipocytes ni sur la croissance [350]. Cependant, l'absence d'*irs1 et d'irs3* provoquent de sévères défauts d'entrée du glucose dans les cellules adipocytaires et suggèrent que ces 2 protéines peuvent se substituer l'une à l'autre [351].

Les souris *irs4*$^{-/-}$ n'ont pas de retard de croissance, ni de défaut du métabolisme glucidique [352].

Ces données montrent que les **2 principales IRS sont IRS-1 et IRS-2** dont leurs mutations provoquent des anomalies plus importantes que celles d'IRS-3 et d'IRS-4. Chez l'humain, une vingtaine de mutations d'*irs1* et non d'*irs2* sont à l'origine d'un diabète de type 2 [353-357]. IRS-1 a un rôle majoritairement dans la signalisation d'IGF-1 et dans l'entrée du glucose *via* l'INSR dans les muscles et les adipocytes alors qu'IRS-2 a plutôt un rôle dans le développement des cellules β *via* l'IGF-1R et dans la signalisation de l'insuline hépatique [358]. IRS-1 et IRS-2 diffèrent de leur habilité à lier les différentes protéines ayant un domaine SH2 : IRS-1 a une meilleure affinité pour ces protéines SH2, ce qui entraîne des activations différentes des voies MAPK et PI3K.

<u>Les sous-unités PI3K</u>

Les PI3K sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique de 110 kDa et d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa contenant un domaine SH2. Les 3 sous-unités catalytiques p110α, β et δ sont dérivées de 3 gènes et possèdent une distribution tissulaire différente : les formes α et β sont ubiquitaires alors que la forme δ est restreinte aux leucocytes [359]. Les sous-unités régulatrices des PI3K ne stabilisent pas seulement les sous-unités catalytiques mais inhibent également sa

fonction enzymatique jusqu'à la liaison d'une phosphotyrosine avec cet hétérodimère, ce qui lève cette inhibition [360].

Les souris KO pour *p110α* ou *p110β,* à l'inverse des souris KO pour *p100δ,* sont létales et présentent des défauts de croissance pour le KO *p110α* [361-363], ce qui indique que chaque isoforme a une fonction biologique unique qui ne peut pas être compensée par une autre. Les études de surexpression de la p110 ont montré que la **p110α a un rôle important dans la signalisation d'IGF-1** alors que la **p110β** est plus impliquée dans la stimulation de **l'entrée du glucose dans la cellule par l'insuline** [364]. Les souris KO pour *p85α* et *p85β* sont viables. Elles présentent des augmentations de l'action de l'insuline caractérisées par une hypoglycémie ainsi qu'une tendance à être plus petite pour la souris KO *p85β* [365,366].

Les isoformes d'AKT

Les AKT possèdent 3 isoformes qui sont codées par 3 gènes différents : *akt1, akt2* et *akt3.* Ces isoformes sont impliquées dans la régulation de processus biologiques spécifiques due à leurs différentes distributions tissulaires. L'AKT3 est principalement présent dans le système nerveux et les testicules alors que l'AKT1 et l'AKT2 ont une expression ubiquitaire avec toutefois une prédominance de l'AKT2 dans des tissus cibles de l'insuline tels que le foie et les adipocytes [367].

La souris KO pour l'***akt1* possède des retards de croissance** et une durée de vie réduite mais ne présente pas d'anomalie du métabolisme [324,368]. Contrairement à la souris *akt1*$^{-/-}$, la souris KO pour l'***akt2* présente une résistance à l'insuline** et développe un diabète dû à une insensibilité des cellules à l'insuline et une diminution de la production de glucose hépatique [369,370]. L'AKT3 ne semble pas impliquer dans le métabolisme du glucose mais possède des effets dans le développement neuronal [371].

Table 7 : Les phénotypes des souris ayant des mutations homozygotes du système insuline/IGFselon Nakae *et al.* [309] (ND : non déterminé)

Genotype	Croissance (% du poids du Wt)	Phénotype	Référence
insuline	80-85	diabète	314
igf1	60	retard de croissance pré- et postnataux	319
igf2	60	retard de croissance fœtal	334
insr	90	diabète	312,313
igf1r	45	retard de croissance fœtal	319
igf2r	140	létal – organes de taille anormale	335,336
igf1r/igf2r	100	normal	337
igf1r/igf2r/insr	30	retard de croissance fœtal	317
igf1/igf1r	45	retard de croissance fœtal	319
igf2/igf2r	65-75	retard de croissance fœtal	337
irs1	60-80	retard de croissance pré- et postnataux – résistance à l'insuline	348
irs2	100	résistance à l'insuline – cellules β défaillantes	322,349
irs3	100	normal	350
irs4	100	normal	352
p110α	ND	létal – retard de croissance foetal	361
p110β	100	létal	362
p85α	100	augmentation l'action de l'insuline - hypoglycémie	365
p85β	ND	augmentation l'action de l'insuline – taille plus petite	366
akt1	ND	retard de croissance	324,368
akt2	100	résistance à l'insuline – production hépatique glucose défaillante	369,370
akt3	100	défaut du développement neuronal	371

I.4. Le système insuline/IGF dans les cancers

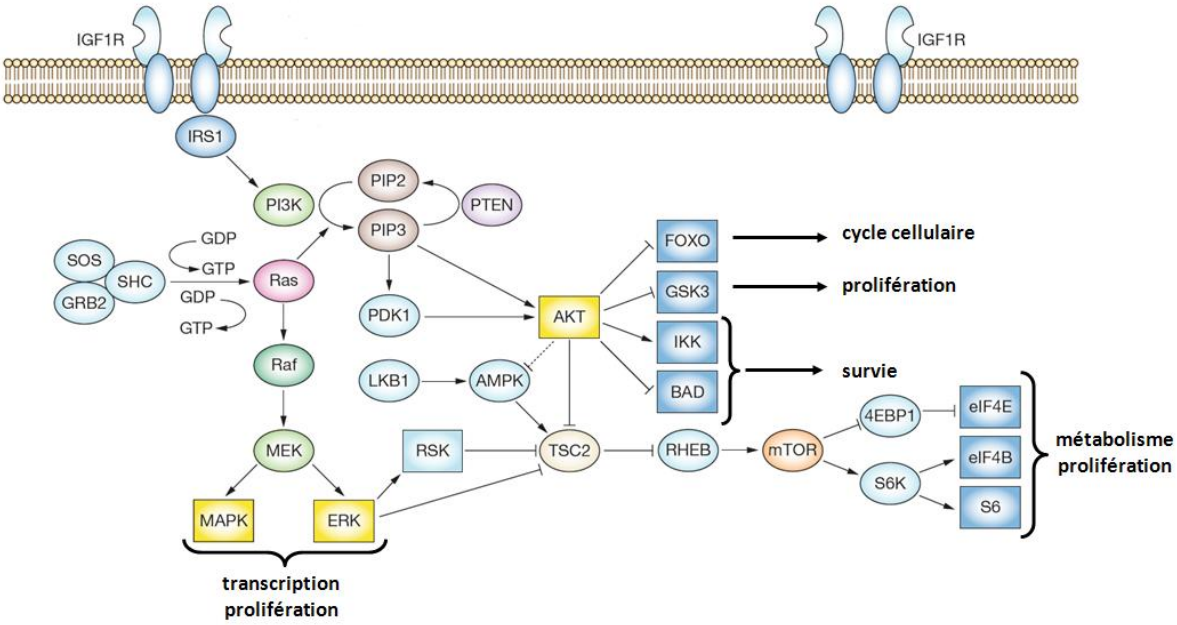
I.4.1. L'IGF/IGF-1R dans les cancers

1) L'IGF-1R

La voie de signalisation de l'IGF-1 est impliquée dans le **développement de nombreux cancers** à travers l'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/AKT qui favorisent **la survie, la progression du cycle cellulaire, la croissance et le métabolisme cellulaires**. Des études montrent que les voies Ras/MAPK et

PI3K/AKT convergent dans l'activation de **mTOR** qui stimule la croissance cellulaire (Figure 11).

Figure 11 : Le schéma de la voie de signalisation IGF-1R d'après Tao *et al.* [372] L'IGF-1R lie soit l'IGF-1 soit l'IGF-2, ce qui engendre l'activation de 2 signaux de transduction : les voies Ras/Raf/ERK/MAPK et PI3K/AKT. L'activation de ces 2 voies de signalisation stimule la prolifération et inhibe l'apoptose. Ras est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire *via* la régulation de la transcription et du métabolisme. AKT contrôle la survie, le cycle cellulaire, la croissance et le métabolisme à travers la phosphorylation de nombreux substrats. L'inhibition de TSC2 et donc l'activation de mTOR est médiée par AKT et ERK directement ou indirectement *via* AMPK ou RSK.
Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; BAD, B-cell CLL/lymphoma 2 antagonist of cell death; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; GSK3, glycogen synthase kinase 3; IKK, IκB kinase; LKB1, STK11 (serine/threonine protein kinase 11); PDK, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homolog; RHEB, Ras homolog enriched in brain; RSK, P90 ribosomal S6 kinase; SOS, son of sevenless; TK, tyrosine kinase; TSC2, tuberous sclerosis complex 2.



L'IGF-1 est un facteur de croissance dans de nombreux cancers. L'IGF-1R régule la prolifération et la différentiation même si son expression est faible. La voie de signalisation d'IGF-1R est impliquée dans la transformation oncogénique, la survie et la croissance des cellules cancéreuses.

Le rôle crucial de l'IGF-1R dans **la transformation maligne** a été démontré par Sell *et al.* [373]. L'IGF-1R permet d'établir la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage qui est une caractéristique des cellules cancéreuses. Cette perte de l'ancrage favorise le potentiel transformant des cellules *in vitro* et la tumorigénécité *in vivo*. Sell *et al*. ont montré que des fibroblastes embryonnaires (MEF) issus de souris KO *igf1r*

ne peuvent pas être transformés *in vitro* par des oncogènes tels que SV40 ou ras activé. La réintroduction d'un IGF-1R fonctionnel rétablit le pouvoir transformant de ces oncogènes. *In vitro*, des fibroblastes qui surexpriment l'IGF-1R acquièrent un phénotype transformant qui conduit à la formation de tumeurs chez la souris en 4 à 6 semaines et à une croissance tumorale stimulée par l'administration d'IGF-1. A l'inverse, des fibroblastes qui surexpriment l'IGF-1R muté dans le domaine tyrosine kinase ne génèrent pas de tumeur [374].

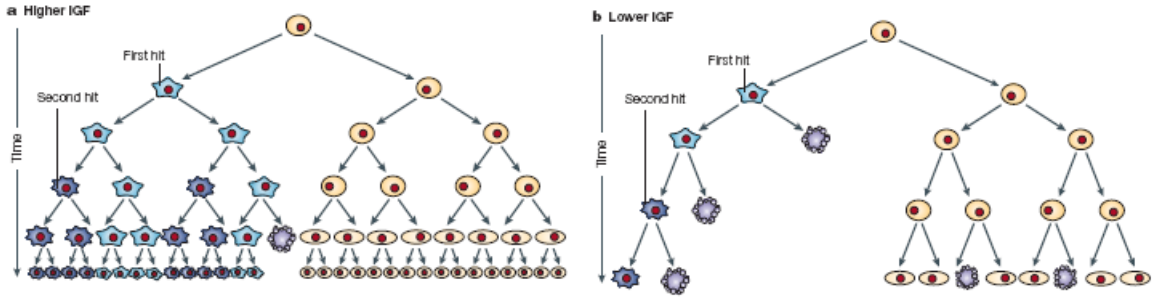
L'IGF-1R est fréquemment surexprimé dans les tumeurs telles que les mélanomes, les cancers du colon, du pancréas, de la prostate et des reins [372]. L'inhibition de la voie de signalisation de l'IGF-1R par un anticorps anti-IGF-1R engendre une réduction importante de la prolifération des cellules cancéreuses dans le mélanome, les cancers du sein et du colon [375]. La surexpression de l'IGF-1R peut résulter d'une perte d'expression de protéines suppressives de la formation tumorale telle que p53 ou PTEN. L'expression de p53 wt inhibe l'expression de l'IGF-1R alors que l'expression de p53 mutée augmente l'expression de ce récepteur et permet ainsi l'augmentation de la survie des cellules cancéreuses [376]. L'expression de PTEN dans des cellules cancéreuses pancréatiques contrecarre l'effet de l'IGF-1R et rend ces cellules moins invasives [377].

L'IGF-1R est également impliqué dans **l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires.** L'IGF-1R active RACK1 qui joue un rôle dans la propagation cellulaire médiée par les intégrines. L'inhibition de RACK1 supprime la migration cellulaire induite par l'IGF-1.

2) L'IGF-1

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des IGF dans le développement des tumeurs. **L'augmentation d'IGF-1 sérique augmente le risque de cancer** du sein, du colon, de la prostate et des poumons. En effet, la présence d'IGF-1 induit une prolifération cellulaire continue et bloque l'apoptose, ce qui favorise la survie des cellules accumulant des anomalies génétiques et l'oncogenèse (Figure 12) [378].

Figure 12 : La signalisation d'IGF-1 dans l'oncogenèse selon Pollak *et al.* [378].



L'IGF-1 est produit par le foie en réponse à la GH ou par les tissus extrahépatiques en particulier par les cellules tumorales elles-mêmes. Des lignées cancéreuses humaines transplantées dans des souris ayant un taux sérique d'IGF-1 réduit de 90% (dû à une production réduite de GH) ont une prolifération significativement réduite [379,380]. L'administration de GH permet de rétablir un taux normal d'IGF-1 et d'augmenter la croissance des cellules tumorales de façon dépendante de la dose de GH. Par la suite, des études ont été réalisées sur des souris déficientes en IGF-1 hépatique afin d'évaluer le rôle de l'IGF-1 circulant par rapport à l'IGF-1 autocrine. L'incidence de la tumeur et la fréquence de métastases hépatiques sont significativement plus élevées dans la souris contrôle par rapport à la souris mutée pour l'*igf1* hépatique dont le taux d'IGF-1 circulant est réduit de 75%. L'administration d'IGF-1 augmente la croissance tumorale et la formation des métastases dans les 2 souris [381,382]. Ces données démontrent qu'une diminution de la concentration d'IGF-1 circulant altère la croissance tumorale. Pollak *et al.* émettent l'hypothèse que la progression tumorale médiée par l'IGF-1 est caractérisée par 2 phases. La première est une phase où les cellules cancéreuses sont dépendantes de l'environnement ou de l'apport d'IGF-1 par la circulation sanguine. La deuxième est une phase autocrine dans laquelle les cellules tumorales ont acquis la capacité de produire l'IGF-1. Cette deuxième phase est caractérisée par un développement rapide des tumeurs [383].

L'élévation de l'IGF-1 sérique peut être causée par plusieurs mécanismes dont les **polymorphismes, la nutrition, les nombreuses hormones** (telles que les œstrogènes, tyrotrophines, FSH, LH, ACTH (adenocorticotropic Hormone)) et les **facteurs de croissance** (tels que EGF, FGF, PDGF). En effet, plusieurs polymorphismes dans le gène codant pour l'IGF-1 ont été décrits et sont associés au risque de cancer. Par exemple, les répétitions du polymorphe CA (cytosine-adenine)

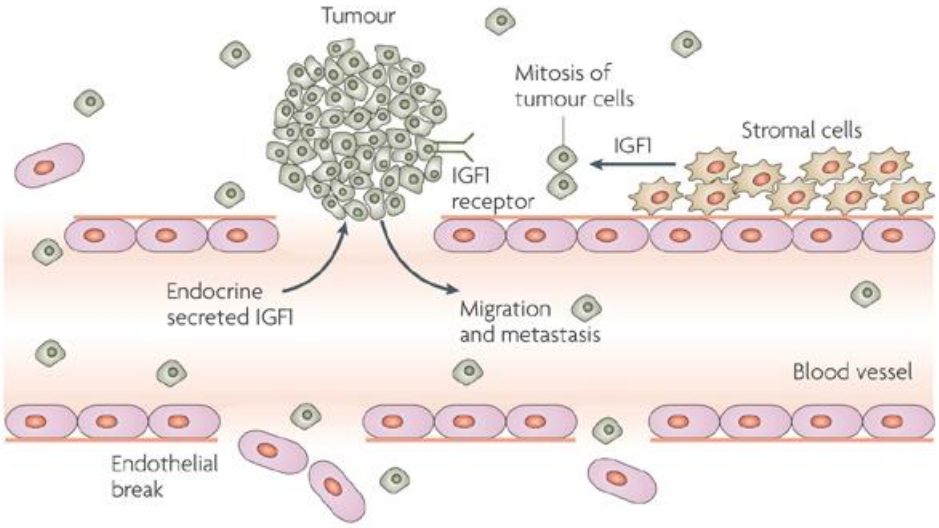
dans la région du promoteur de l'IGF-1 est corrélé à un changement du taux circulant de l'IGF-1. La répétition de 19 CA sur ce promoteur est plus fréquente chez les patients atteints de cancer de la prostate en comparaison à des sujets normaux et a été montrée comme un nouveau prédicteur de métastases sur ces patients [384].

Dunn *et al.* ont démontré que la restriction énergétique était associée à une diminution d'IGF-1 circulant, ce qui diminuait la prolifération des cellules cancéreuses dans un modèle de souris. Quand la restriction energétique est associée à une injection d'IGF-1, la réduction de la prolifération tumorale disparaît et la croissance des tumeurs devient similaire à celle des souris qui n'ont pas eu de régime restrictif [385]. Ces données laissent à penser que la réduction de la croissance tumorale associée à une restriction énergétique est médié principalement par l'IGF-1. L'augmentation du taux d'IGF-1 circulant en fonction des prises alimentaires a également été décrite chez les humains [386]. Cependant, la corrélation entre le statut énergétique et l'augmentation du risque de cancer n'a pas été décrite.

L'axe IGF-1 est également impliqué dans **l'angiogenèse**. L'IGF-1 agit en synergie avec l'HIF1 (hypoxia inducible factor 1) dans la réplication cellulaire des tumeurs. L'IGF-1 fonctionne aussi avec l'HIF1 pour favoriser les métastases des tumeurs transplantées [387]. De plus, ces 2 facteurs peuvent moduler l'expression du VEGF, un facteur angiogénique puissant [388]. L'IGF-1 induit également les MMP tels que MMP2 et MMP9, ce qui engendre la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion cellulaire [389,390].

Les mécanismes d'action de l'IGF-1 dans le développement tumoral sont schématisés à la Figure 13.

Figure 13 : L'action de l'IGF-1 et ses mécanismes dans le développement tumoral d'après Clemmons *et al.* [302]. Les tumeurs augmentent le nombre de vaisseaux sanguins qui sont une source abondante d'IGF-1. L'IGF-1 peut être également synthétisée par les cellules stromales qui sont adjacentes aux cellules cancéreuses ou par les cellules tumorales elles-mêmes. L'IGF-1 autocrine, paracrine ou endocrine stimule la prolifération de ces cellules cancéreuses exprimant l'IGF-1R, ainsi que la migration cellulaire et les métastases. Ce facteur de croissance peut aussi altérer les métastases en modifiant l'habilité des cellules tumorales à pénétrer la barrière de cellules endothéliales ou en stimulant la production de la matrice extracellulaire dans le but de former un nid permettant l'attachement des cellules cancéreuses à la tumeur.



3) L'IGF-2 et l'IGF-2R

L'IGF-2 est majoritairement décrit comme un facteur de croissance fœtal. Le taux d'IGF-2 circulant est relativement stable après la puberté et la GH a peu d'influence sur sa régulation. La régulation de l'expression d'IGF-2 est complexe. Son expression est mono-allélique car le gène *d'IGF-2* est soumis à l'empreinte génomique parentale [391]. La perte de cette empreinte entraîne une **augmentation du taux d'IGF-2** (due à une expression d'IGF-2 bi-allélique) et confère un avantage de croissance. Ce phénomène, qui a été décrit dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon, prostate, ovaire et les gliomes [392], provoque un **risque augmenté** de cancer colorectal [393,394]. L'IGF-2 peut donc jouer un rôle important dans la progression tumorale. Cependant, à la différence d'IGF-1, la seule surexpression d'IGF-2 dans différents modèles de souris ne suffit pas à induire la transformation maligne et semble exercer un effet pro-tumoral durant les stades tardif de l'oncogenèse [395].

L'IGF-2R est également impliqué dans les cancers. Comme l'IGF-2R ne transduit pas de signal et qu'il séquestre l'IGF-2, ce récepteur possède des propriétés de suppresseurs de tumeurs. **La perte d'IGF-2R** est corrélée à l'augmentation de

l'activation d'IGF-1R *via* IGF-2 qui engendre une prolifération élevée des cellules tumorales [396].

4) Les IGFBP

Comme évoqué précédemment, l'activité biologique des ligands IGF peut aussi être modulée par les IGFBP qui sont présents dans la circulation. La majorité des IGF circulants ne sont pas libres et sont couplés à des IGFBP qui leur servent de transporteurs jusqu'aux tissus cibles. Ces IGFBP peuvent être soit **inhibitrices** soit **activatrices** de la signalisation d'IGF-1 selon les conditions. La sécrétion des IGFBP augmente donc la concentration des IGF dans le microenvironnement de la tumeur. Bien que ces IGF liés sont inactifs, ils peuvent être continuellement libérés donc actifs grâce aux IGFBP protéases sécrétées par les cellules cancéreuses [397].

Les IGFBP sont une famille complexe et leurs implications dans le cancer est beaucoup moins décrites que l'IGF-1. De plus, les données sur les IGFBP sont controversées du fait de leurs rôles activateurs ou inhibiteurs selon les conditions (modulées selon les cas par la présence de protéases) ou les types cellulaires. L'IGFBP-3 est la protéine la plus étudiée dans le cancer. **L'IGFBP-3** est la forme prédominante dans le sérum **et 90% des IGF forment un complexe ternaire avec l'IGFBP-3 et la protéine ALS.** De plus, cette IGFBP est régulée, comme l'IGF-1, par la GH et possède un fort pouvoir inhibiteur pour l'IGF-1.

La diminution d'IGFBP-3 circulante, corrélée à une élévation d'IGF-1 circulant est retrouvée dans de nombreux cancers. Dans le cancer de la prostate ou du colon, le taux diminué d'IGFBP-3 est associé à un **risque augmenté de cancer** [398]. De plus, l'administration d'IGFBP-3 dans un modèle de souris peut atténuer l'action d'IGF-1 et réduire la croissance de la tumeur [399].

L'IGFBP-3 peut également avoir une action IGF indépendante. Par exemple, dans une souris KO *igf-1r*, des fibroblastes exprimant l'IGFBP-3 ont une prolifération réduite de 10 fois par rapport à des fibroblastes n'exprimant pas l'IGFBP-3 [400].

A l'inverse de l'IGFBP-3, la surexpression d'autre IGFBP (tel que l'IGFBP-2 ou l'IGFBP-5) peut soit favoriser ou inhiber la tumeur. Dans certaines conditions, cette surexpression est associée à une augmentation de l'effet d'IGF-1 et une inhibition par des anti-sens réduisent la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* [401].

L'IGFBP-6, seule IGFBP spécifique d'IGF-2, bloque la prolifération et la survie des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* induite par l'IGF-2 [402]. Cependant l'IGFBP-6

possède aussi un rôle indépendant d'IGF-2 dans la migration des cellules cancéreuses [303,403].

Pour information, les IGFBP-rP, qui ont de faibles affinités pour l'IGF-1, n'ont été décrites que dans des actions indépendantes des IGF. Cette famille de protéine peut être dérégulée dans les cancers et être associée à un développement tumoral [404].

5) Les inhibiteurs d'IGF-1/IGF-1R

De nombreuses approches ont été adoptées pour inhiber la signalisation de l'IGF-1 telles que les mutants dominants négatifs, les mutants de kinases inactifs, les oligonucléotides anti-sens, les IGFBP, les IGF-1R solubles, les anticorps antagonistes ou neutralisants et les petites molécules inhibiteurs de kinase. Les anticorps et les inhibiteurs de tyrosine kinase sont les meilleures options pour une utilisation en clinique [405]. Une trentaine de molécules ciblant l'IGF-1R ont été étudiées.

La première stratégie adoptée a été l'utilisation d'anticorps ciblant l'IGF-1. Ces anticorps ne se sont pas révélés efficaces dûs à la faible réduction d'IGF-1 circulant qui n'engendrait pas de réponse anti-cancéreuse [288].

De nombreux anticorps spécifiques de l'IGF-1R ont été étudiés en pré-clinique puis évalués dans des essaies cliniques. Ces anticorps monoclonaux murins ou humanisés montrent une grande affinité pour l'IGF-1R et conduisent à une réduction du nombre de la densité d'IGF-1R membranaires due à l'internalisation du récepteur. Les modèles murins de xénogreffe de cancer du sein, du pancréas, du colon, de la prostate, des ovaires ou du poumon ont confirmé **l'efficacité des anticorps ciblant l'IGF-1R** qui provoquent une réduction de la taille des tumeurs, l'apoptose des cellules cancéreuses ainsi que l'augmentation des effets des autres thérapies anti-tumorales telles que les radiations ou les chimiothérapies [302]. Ces données valident le rôle d'IGF-1 dans la résistance des cellules cancéreuses. Les anticorps monoclonaux anti-IGF-1R (tels que le CP-751871 [406], l'AMG479 [407], l'AVE1642 [408], l'IMC-A12 [409] et h7C10 [410]) ont été évalués en phase I clinique. En général, il engendre des toxicités convenables avec une réponse dans une minorité des patients ou **une stabilisation de la maladie** lorsqu'IGF-1R y exerce un rôle important tel que le cancer du sein, du foie, colorectale, de la prostate ou du pancréas [288]. Aucun essai clinique de monothérapie d'anti-IGF-1R de phase II n'a été publié mais quelques uns sont en cours tels que le CP-751871 dans le cancer du

colon, l'IMC-A12 dans le cancer de la prostate et l'AMG-749 ou le R1507 dans le sarcome [411]. L'activité anti-tumorale de ces anticorps dans les cancers chez l'homme reste à déterminer.

Une autre stratégie est d'utiliser des inhibiteurs des tyrosines kinases de l'IGF-1R. Bien que l'importante homologie de séquences des domaines de tyrosine kinase de l'IGF-1R et l'INSR (84%) pose des problèmes pour l'obtention d'un inhibiteur spécifique de l'IGF-1R, plusieurs molécules ont été développées (NVP-AEW541 [412], NVP-ADW742 [413], cyclolignan [414] et BMS-554417 [415]) et possèdent une très grande affinité pour l'IGF-1R par rapport à l'INSR. Les modèles murins de xénogreffe de cancer du sein, de mélanome et de sarcome d'Ewing ont confirmé une **meilleure efficacité des inhibiteurs des kinases d'IGF-1R** par rapport aux anticorps monoclonaux. Ces inhibiteurs provoquent une inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse associées à une survie prolongée des souris [302]. Cependant, les inhibiteurs des kinases d'IGF-1R ont provoqué des effets toxiques et dans certains cas des effets contre l'INSR (taux de glucose augmenté après une seule injection) [416]. De ce fait, ces inhibiteurs n'ont pas été évalués en phase clinique.

Même si l'inhibition de la voie de l'IGF-1 dans le cancer a eu des effets limités en monothérapie dans les études cliniques, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs des kinases de l'IGF-1R ont montré de bonnes efficacités en combinaison avec d'autres thérapeutiques. En effet, la voie de signalisation d'IGF-1 confère une résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies. La combinaison d'un inhibiteur de l'IGF-1R avec des drogues ciblant l'EGFR, l'HER2 ou la voie mTor potentialise l'effet de ces drogues *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de cancers du sein, de la prostate, du pancréas ou du poumon [372]. Cette augmentation de réponse de la chimiothérapie a été confirmé sur des patients atteints de cancer du poumon ayant reçu l'anticorps monoclonal CP-751871 (le plus largement étudié) durant leur chimiothérapie (réponse de la chimiothérapie seule 33%, avec l'anticorps 62%) [417].

Il est à noter que la majorité des essaies cliniques de phase I avec les drogues ciblant l'IGF-1R entraîne des dérégulations endocrines qui touche l'homéostasie physiologique contrôlée par l'IGF-1 et l'insuline (Table 8).

Table 8 : Les effets endocrines dûs à l'inhibition de l'IGF-1R selon Gualberto *et al.* [418]

anormalités	conséquences
taux augmenté d'IGF-1	rôle dans le métabolisme glucidique ?
taux augmenté d'IGFBP-3	effet anti-tumoral d'IGFBP-3 ? résistance à l'insuline conduisant à l'hyperglycémie
taux augmenté de GH	augmentation de la gluconéogenèse hépatique ?
hyperglycémie	conséquence similaire au diabète de type 2
taux augmenté d'insuline	symptôme du syndrome métabolique tel que l'adiposité potentiel d'augmentation de croissance et de survie ?

En effet, la majorité des inhibiteurs de l'IGF-1R conduit à **une hyperglycémie des patients** (dans 20% des cas) même avec un traitement anti-IGF-1R. Ces données démontrent que cet effet est indépendant de l'INSR, non ciblé par ces anticorps. Toutefois, l'hyperglycémie peut aussi être causée par l'inhibition directe des kinases de l'INSR par un inhibiteur des kinases de l'IGF-1R [415]. Pour cette raison, aucun patient diabétique atteint de cancer n'est inclu dans un essai clinique d'inhibiteur d'IGF-1R. Le rôle de l'IGF-1 dans le métabolisme glucidique n'est pas complètement expliqué mais cet effet pourrait venir de la GH. Comme abordé précédemment en figure 7, le taux de GH est augmenté en raison de l'absence de son rétrocontrôle par l'IGF-1, ce qui conduit à l'augmentation de la glycémie et à la résistance à l'insuline [418]. Néanmoins, ces effets peuvent être palliés par des combinaisons d'anticorps anti-GH ou par des médicaments hypoglycémiants.

D'autres conséquences majeures peuvent être entraînées par l'inhibition des IGF-1R dans les cancers. Du fait de l'action de l'IGF-1 dans le développement, l'inhibition de l'IGF-1R peut mener à des retards de croissance chez les sujets jeunes pouvant avoir recours à ces traitements ciblés de longue durée. Etant donné le rôle de l'IGF-1R dans les cellules β pancréatiques, le cœur et l'os, l'inhibition pourrait aussi être toxique pour ces tissus. En particulier, les inhibiteurs de kinases pénétrant la barrière hémato-encéphalique peuvent avoir des effets neurotoxiques où l'IGF-1 est un facteur de survie neuronale [419].

I.4.2. L'insuline/INSR dans les cancers

1) L'INSR

Comme abordé précédemment, les homologies de séquences de l'IGF-1R et de l'INSR entraînent l'activation des mêmes voies de signalisation. Toutefois, leurs différents localisations ainsi que le recrutement des différents médiateurs intracellulaires leurs confèrent des fonctions spécifiques. En effet, l'INSR est

fortement exprimé dans ses 3 tissus cibles : le foie, le muscle et les adipocytes, alors que l'IGF-1R est exprimé dans la plupart des tissus.

Une différence importante entre ces 2 récepteurs est leur habilité à induire une transformation cellulaire. A la différence de l'IGF-1R, l'expression de l'INSR sur des fibroblastes igf1r$^{-/-}$ ne peut rétablir le pouvoir transformant des oncogènes [420]. Cependant, l'INSR est suffisant pour induire un phénotype transformé dépendant de l'insuline sur des fibroblastes exprimant l'IGF-1R endogène puisqu'un anticorps anti-INSR bloque cet effet [421]. Ces données suggèrent que l'IGF-1R possède un effet transformant plus puissant que l'INSR mais la surexpression de l'INSR est suffisante pour induire une **immortalisation** de ces fibroblastes dépendante à l'insuline.

Par la suite, l'INSR a été trouvé présent dans plusieurs lignées cellulaires de cancer telles que les lignées de cancer du sein ainsi que dans des cellules hématopoïétiques normales ou tumorales (lymphoblastes B, lymphocytes T et cellules de plastocytome) qui ont une fonction dans la régulation de la prolifération et dans la différenciation. Pillemer *et al*. ont publié que l'expression de l'INSR dans des lignées cancéreuses pouvait entraîner une **croissance dépendante de l'insuline**. C'est le cas des lignées de lymphome T qui expriment un taux élevé d'INSR et faible d'IGF-1R [422].

Des études ont montré qu'une surexpression de l'INSR était retrouvée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein, du colon, des poumons, des ovaires et de la thyroïde [423,424]. Dans le cas du cancer du sein, les cellules tumorales surexpriment d'un facteur 80% l'INSR par rapport aux cellules normales, ce qui engendre une plus forte sensibilité des cellules cancéreuses à l'insuline [425]. La surexpression de ce récepteur est corrélée à un facteur de mauvais pronostic. En effet, les patientes atteintes de cancer du sein avec une surexpression d'INSR ont une survie sans rechute inférieure de 5 ans par rapport aux patientes avec une expression modérée de l'INSR [426].

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la surexpression de l'INSR dont l'inactivation de la **p53** et la surexpression de **HMGA1**. En effet, la p53 supprime l'activité du promoteur de l'INSR mais aussi celui de l'IGF-1R, ce qui explique au moins en partie la surexpression de l'IGF-1R dans les cancers. L'HMGA1 est une protéine appartenant à la famille des protéines chromatiennes non-histones qui ont des propriétés de régulateur de gènes par leur liaison à l'ADN et par leur participation à des complexes multiprotéiques [427]. L'expression de l'HMGA1 qui est

corrélée au phénotype transformé et métastasique est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de l'INSR [427,428]. De plus, des publications indiquent que l'HMGA1 inhiberait la p53, ce qui suggère une augmentation de l'expression d'INSR dans les cancers *via* l'inactivation de la p53 par l'HMGA1 [429,430]. Ces données laissent à penser que la surexpression de l'INSR est la conséquence de multiples mécanismes généralement activés dans les cancers.

Comme évoqué précédemment, le récepteur à l'insuline possède 2 isoformes qui résultent d'un « splicing » alternatif excluant l'exon 11. L'exclusion de cet exon est régulée en fonction des tissus et des maladies. L'INSR-A ($INSR^{-exon11}$) a une expression ubiquitaire : il est principalement exprimé dans les tissus fœtaux et surexprimé dans plusieurs pathologies telles que le diabète de type 2 et les cancers. L'INSR-B ($INSR^{+exon11}$) est principalement exprimé dans les tissus cibles de l'insuline tels que le foie, le muscle et les adipocytes [431,432].

Le splicing génère 2 récepteurs ayant des rôles différents : alors que l'INSR-B est un récepteur classique des effets métaboliques de l'insuline dans les muscles, le foie et le tissu adipeux, l'INSR-A est le récepteur bi-fonctionnel dû à sa liaison à 2 ligands : l'insuline et l'IGF-2. **Rappelons que l'IGF-2 ne se lie qu'à l'INSR-A** et pas à l'INSR-B. Frasca *et al.* ont pu mettre en évidence grâce à des fibroblastes transfectés par l'INSR-A que **l'IGF-2 *via* l'INSR** stimulait majoritairement **la prolifération cellulaire** alors que **l'insuline *via* l'INSR** activait principalement **l'entrée du glucose** dans la cellule [423].

40% des cellules du cancer du sein expriment plus l'INSR que l'IGF-1R indiquant que la surexpression de l'INSR peut conférer un avantage de sélection des cellules cancéreuses [425]. Contrairement à l'insuline qui ne possède pas d'affinité différente de liaison à l'INSR entre les cellules normales et tumorales, l'IGF-2 peut activer uniquement l'INSR présent sur les cellules cancéreuses [433]. En effet, les lignées de cancer du sein produisent de l'IGF-2 qui va pouvoir supporter la prolifération de ces cellules qui expriment 5 fois plus d'INSR que d'IGF-1R. Un anticorps anti-INSR bloque plus efficacement qu'un anti-IGF-1R cet effet de prolifération médiée par l'IGF-2, ce qui confirme que la surexpression d'INSR joue un rôle important dans l'action de facteur de croissance d'IGF-2 [433].

Ces données sont aussi en accord avec l'isoforme de l'INSR prédominante dans les cancers qui est **l'INSR-A**. L'INSR-A est trouvé surexprimé par rapport à l'INSR-B

dans les cancers du sein, du colon, des ovaires, de la thyroide et du myosarcome [423,432-434].

2) L'insuline

Des études sur des modèles animaux ont pu mettre en évidence le rôle direct de l'insuline dans le cancer. La lignée du cancer du sein MCF-7 ne forme pas de tumeur lorsqu'elle est injectée dans un modèle animal (souris ou rat) rendu diabétique soit par l'administration d'alloxan ou de streptozotocine qui provoquent une déficience de la sécrétion d'insuline (due à la destruction des cellules β des îlots de langherans). L'injection d'insuline dans ces modèles animaux restaure la croissance tumorale des cellules MCF-7 [435-437]. Les mêmes résultats sont observés avec la lignée de lymphome T dépendante à l'insuline : les souris transplantées avec cette lignée développe une résistance à la croissance de ces cellules lorsqu'elles sont rendues diabétiques par un traitement de streptozotocine [438].

Des études ont permis de démontrer que **l'effet mitogénique** de l'insuline passait par sa liaison à son propre récepteur et pas par l'activation de l'IGF-1R (affinité 100 fois inférieure) : seul un anticorps anti-INSR bloque la croissance des cellules tumorales stimulée par l'insuline (un anticorps anti-IGF-1R n'a aucun effet) et un anticorps agoniste d'INSR induit leur croissance [439].

De la même manière des analogues de l'insuline capables d'améliorer le contrôle glycémique dans le diabète ont été testés sur les cellules cancéreuses. Ces analogues de l'insuline ont la propriété d'avoir un constante de dissociation faible afin d'augmenter la durée du complexe insuline/INSR et ainsi l'activation du signal INSR. Ils ont confirmé le rôle de l'insuline dans la prolifération cellulaire avec ces analogues mais également mis en évidence leur potentiel transformant. En effet, un analogue de l'insuline induit un changement de phénotype des cellules épithéliales mammaires *in vitro* [440]. Il engendre également des tumeurs de la glande mammaire *in vivo* après 24 mois de traitement dans un modèle de rat avec 44% de cas de tumeurs bénignes et 23% des cas de développement de cancers du sein [441]. Ces données suggèrent un rôle de l'insuline à travers l'activation de l'INSR dans **la progression tumorale**.

Des études rétrospectives ont permis d'identifier une association directe entre le taux circulant du peptide C (produit du clivage de la pro-insuline) ou le taux d'insuline avec les cancers colorectal, pancréatique, de la prostate et de l'endomètre [442,443]. En effet, l'étude de Pisani *et al.* a montré que les patients qui ont développé ces cancers

avaient un taux d'insuline et/ou de peptide C élevés dans le pré-diagnostic, ce qui suggère un rôle de l'insuline dans la genèse de tumeurs.

3) Le diabète et cancer

Comme évoqué précédemment, l'insuline peut être un facteur de croissance pour les cellules cancéreuses et être impliqué dans le développement de certains cancers. De ce fait, **le diabète de type 2** caractérisé par une hyperinsulinémie peut être associé à un **risque plus élevé de cancer**. En effet, les patients diabétiques ont une incidence plus élevée de développer un cancer du pancréas, du foie, du sein, colorectal et de l'endomètre [444]. De plus, **les patients diabétiques atteints de cancer peuvent avoir une survie inférieure aux patients non diabétiques** : c'est le cas des cancers du sein, de l'endomètre et colorectal. En revanche, cette survie n'est pas diminuée dans les cancers du poumon, gastrique, du foie, du pancréas et de la prostate [444].

Jusqu'à présent, la relation entre le diabète et l'augmentation du risque de cancer n'est pas clairement explicitée mais plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu. Du fait des capacités proliférative évoquées précédemment de l'insuline, l'insuline a un rôle dans l'initiation et/ou la progression tumorale, ce qui traduit un risque élevé des patients diabétiques à développer un cancer. L'hyperinsulinémie peut donc soit induire une tumeur plus agressive ou soit rendre l'organisme moins résistant à la progression tumorale. Il est également possible que les patients diabétiques répondent moins bien aux chimiothérapies par rapport aux patients non diabétiques [444].

Il existe 3 familles majeures de drogues anti-diabétiques (sulphonylurée, biguanide et thiazolidinediones) qui possèdent des mécanismes d'action différents. Les sulphonylurées stimulent la sécrétion endogène d'insuline alors que les 2 autres catégories de composés sont des sensibilisateurs à l'insuline c'est-à-dire qu'ils rendent les tissus plus sensibles à l'insuline et donc diminue l'hyperinsulinémie. Si l'hyperinsulinémie joue un rôle dans l'augmentation du risque de cancer et la progression des patients diabétiques, ces drogues devraient affecter l'association entre le cancer et le diabète [444].

Des études ont montré que la metformine appartenant à la famille des biguanides réduisait de 30% le risque de cancer des patients diabétiques traités *vs* ceux non traités [445]. En plus de la diminution du taux d'insuline circulante, l'effet anti-cancéreux

de la metformine peut être causé par un autre mécanisme qui est la stimulation de l'AMP activated protéine kinase (AMPK, une enzyme induisant l'entrée du glucose dans les muscles) et de son régulateur en amont LKB1 (un suppresseur de tumeur). Les activateurs d'AMPK ont des fonctions anti-proliératives car ils réduisent la voie de signalisation de l'INSR (et de l'IGF-1R) et donc inhibe la prolifération induite par l'insuline. Par conséquent, l'effet anti-tumoral de la metformine peut être expliqué par 2 mécanismes. Des études récentes ont confirmé l'effet inhibiteur de la metformine sur la prolifération *in vitro* des lignées de cancer du sein *via* une inhibition de MAPK, AKT et mTOR [446].

Les études sur l'autre sensibilisateur de l'insuline, le thiazolidinedione, sont controversées. Un effet bénéfique, neutre ou délétaire ont été publié sur différents cancers [447-449]. Ce composé activent les récepteurs des PPARγ, ce qui engendre un effet anti-cancéreux dans plusieurs modèles *in vitro* [450]. L'utilisation de cette drogue est plutôt récente et il n'y a pas assez de recul pour expliciter les différents constats engendrés par son traitement dans les patients diabétiques atteints de cancer.

La troisième catégorie des traitements contre le diabète sont les sulphonylurées qui engendrent une augmentation de l'insuline causant l'hyperinsulinémie. Comme attendu, ils sont associés à l'augmentation du risque de cancer [451] qui est attribuée à une hyperinsulinémie prolongée induite chez les patients. Cependant, un effet direct n'est pas exclu.

I.4.3. Le récepteur hybride INSR/IGF-1R dans les cancers

La plupart des cancers surexpriment à la fois l'IGF-1R et l'INSR, ce qui laisse à penser que les cellules tumorales surexpriment également **le récepteur hybride INSR/IGF-1R**. Étant donné que l'isoforme dominante dans les cancers est l'INSR-A, on peut supposer que **l'Hybrid-R^A** est l'isoforme majoritaire dans les cellules cancéreuses. Rappelons que les données sur les affinités de ce récepteur hybride sont controversées mais elles indiquent que les 2 hybrides l'Hybrid-R^A et l'Hybrid-R^B lient l'IGF-1 avec une grande affinité. Quelques publications, mais pas toutes, montrent que la liaison de l'IGF-1 et de l'insuline peuvent activer l'autophosphorylation des sous-unités β de l'hétérodimère IGF-1R/INSR suggérant une **voie de signalisation unique** activée par l'Hybrid-R.

Un des cancers où l'Hybrid-R est le plus étudié est le cancer du sein. L'équipe de Vigneri a montré que l'Hybrid-R était majoritaire par rapport à l'IGF-1R sur les

cellules cancéreuses du sein, ainsi que son activation suggérant que l'effet de prolifération de l'IGF-1 passait principalement par l'Hybrid-R. Ces résultats sont confirmés par des anticorps monoclonaux spécifiques des récepteurs : un anticorps anti-Hybrid-R est plus efficace qu'un anti-IGF-1R lorsque le ratio Hybrid-R/IGF-1R est élevé [452]. De ce fait, la croissance tumorale médiée par l'IGF-1 est inhibée majoritairement par l'anticorps monoclonal ciblant la forme prédominante du récepteur présent sur la cellule étudiée. Une étude faite *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de cancer du sein caractérisé par un fort ratio Hybrid-R/IGF-1R montre un puissant effet anti-tumoral en présence de l'anticorps h7C10 neutralisant à la fois l'Hybrid-R et l'IGF-1R en comparaison avec un anticorps monoclonal anti-IGF-1R ou anti-Hybrid-R [410]. Ces données montrent **un effet de l'IGF-1 dans la prolifération tumorale *via* son propre récepteur ou *via* l'Hybrid-R**.

Une question se pose sur le poids de l'insuline dans l'activation de l'Hybrid-R. Des études ont montré que l'insuline en se liant à l'hybrid-R^A activait le monomère IGF-1R de l'hybrid-R ainsi qu'un substrat spécifique de l'IGF-1R, CrkII, suggérant que **l'insuline pourrait activer la signalisation d'IGF-1R grâce au récepteur hybride** pour lequel l'insuline a une forte affinité [296]. Ces résultats seraient une explication à l'activation de la voie de signalisation de l'IGF-1R dans les patients hyperinsulinémiques [453].

Le rôle de l'Hybrid-R ainsi que l'implication de l'insuline dans sa fonction ne sont pas clairement définis et sont encore sujet d'investigation.

I.4.4. Le système insuline/IGF dans le MM

1) Le rôle de l'insuline/IGF-1 dans le MM

Freund *et al*. ont été les premiers à mettre en évidence le rôle de l'IGF-1 et de l'insuline dans l'augmentation de la mitose et de la production du lactate dans une lignée de MM [454]. Depuis cette publication datant de 1993, le rôle de l'insuline dans le MM n'a plus été décrit. En revanche, de nombreuses études ont été publiées sur le rôle de l'IGF-1.

L'IGF-1 potentialise l'effet de l'IL-6 [455] ou induit la **prolifération** des lignées qu'elles soient dépendantes ou indépendantes de l'IL-6 [455-459]. Comme cité précédemment, l'IGF-1 active les voies de signalisation Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT et NF-κB (*via* PI3K/AKT) mais pas la voie JAK2/STAT3 contrairement à l'IL-6 [459]. Il induit la

phosphorylation du facteur de transcription FOXO et la surexpression d'une série de protéines anti-apoptotiques incluant FLIP, la survivine, cIAP-2, A1/Bfl-1 et XIAP [195]. L'IGF-1 peut également conférer une **résistance des MMC** aux drogues tels que la dexaméthasone, les inhibiteurs du protéasome et l'Apo2/TRAIL [195,460,461].

Plus récemment, il a été démontré que la cavéoline 1, qui est généralement absente des cellules du sang, est exprimée par les cellules de MM et joue un rôle crucial dans les voie de signalisation médiées par l'IL-6 et l'IGF-1 [462]. Un traitement par la beta-cyclodextrine qui détruit la structure des cavéoles et inhibe la fonction de la cavéoline, bloque la survie des cellules de MM induite par l'IL-6 et l'IGF-1 [462].

De plus, l'IGF-1 peut avoir des fonctions autres que des effets de croissance en jouant un rôle dans le **homing des cellules de MM** ainsi que dans **l'angiogenèse**. L'IGF-1 a été décrit comme un puissant chémoattracteur des cellules de MM à travers la voie PI3K/AKT [463,464] qui est capable de promouvoir la transmigration des cellules de MM à travers les cellules endothéliales *via* la PI3K/PKC et PI3K/Rho [465]. L'augmentation de l'adhésion des lignées ou des cellules primaires de MM à la fibronectine *via* l'intégrine β1 par l'IGF-1 a confirmé le rôle d'IGF-1 dans le homing des MMC [466].

L'IGF-1 est aussi impliqué dans l'angiogenèse en induisant la sécrétion du VEGF par les MMC à travers la voie MAPK. Cette boucle d'activation du VEGF stimule aussi la prolifération des cellules de MM [195,467].

Toutes les lignées de MM ne sont pas sensibles à l'IGF-1. Plusieurs groupes ont essayé d'identifier une sensibilité des cellules de MM à l'IGF-1 en fonction de marqueurs membranaires en vue d'une thérapie ciblée. Ainsi, Sahara *et al.* ont publié que les lignées **CD56$^+$** sont sensibles à l'IGF-1 (pas à l'IL-6) et celles CD56$^-$ sont uniquement sensibles à l'IL-6 [468]. Le groupe du Pr Bataille a montré une stimulation de l'IGF-1 uniquement sur les MMC CD45$^-$ due à une inhibition du signal de l'IGF-1R *via* la phosphatase CD45 [469,470].

D'un point de vue clinique, la corrélation entre le taux sérique d'IGF-1 chez les patients et le pronostic de MM n'a pas pu être établie. Une étude a mis en évidence que le taux moyen d'IGF-1 chez les patients atteints de MM est le même que celui des sujets sains. Cependant, les patients ayant un taux faible d'IGF-1 circulant (< 13 nM) ont une **survie accrue** par rapport à ceux présentant des taux plus élevés, ce qui consolide l'hypothèse d'un rôle de l'IGF-1 dans la **progression de la maladie** [471].

Il est à noter que l'IGF-1 est trouvé en grande quantité dans l'environnement médullaire où les cellules stromales sont la source principale [197,472].

Les données sur le pronostic clinique du récepteur à l'IGF-1 sont divergentes. Bataille *et al*. ont montré une augmentation de l'expression de l'IGF-1R détectée par FACS sur des MMC comparées à des PC normaux, qui est associée à un mauvais pronostic [473]. Chng *et al*. ont décrit une expression globale similaire de ce récepteur évaluée par puces à ADN entre PC normaux et tumoraux. Cependant certains patients possèdent une expression aberrante de ces récepteurs [474]. Dans cette étude, ils n'ont pas trouvé de valeur pronostic pour l'IGF-1R ou l'IGF-1. Par ces données, l'importance de la voie de signalisation de l'IGF-1 n'est pas bien établie.

2) Les inhibiteurs de l'IGF-1R dans le MM

Plusieurs études *in vitro* puis *in vivo* avec des molécules ciblant l'IGF-1R ont été réalisées dans le MM. Wu *et al.* ont publié que l'IMC-A12 pouvait internaliser l'IGF-1R *in vitro* et réduire la formation de la tumeur dans un modèle murin de xénogreffe de MM. Cet anticorps peut également réduire l'angiogenèse en diminuant le taux du VEGF [475]. La forte activité **anti-tumorale** de l'inhibition de l'IGF-1R a été confirmée par un autre inhibiteur, le CP-751871 [476] et un essai clinique de phase I a été récemment publié [406]. Une réponse a été observée pour 9 patients en rechute sur 27 sans toxicité majeure. Toutefois, une augmentation de l'IGF-1 sérique dépendante de la concentration de l'anticorps administrée a été observée.

3 principaux inhibiteurs des tyrosines kinases ont été étudiés : le NVP-ADW742, le NVP-AEW541 et le PPP. Les NVP-ADW742 et NVP-AEW541 ont une spécificité 17 fois plus importante pour l'IGF-1R que pour l'INSR. Le NVP-ADW742 possède une forte activité d'inhibition de la survie et de la prolifération des HMCLs ainsi qu'une réduction de la tumeur et une survie prolongée des souris de xénogreffe de MM [477]. Une publication sur le NVP-AEW541 dans le même modèle de souris a confirmé ces résultats [478].

Un autre type d'inhibiteur qui, à l'inverse des 2 premiers, ne bloque pas le domaine des kinases de l'IGF-1R par une compétition avec l'ATP a été utilisé. Girnita *et al.* ont décrit que le PPP était un inhibiteur spécifique de l'IGF-1R et non de l'INSR [416]. Le PPP bloque l'autophosphorylation de l'IGF-1R des HMCLs et des MMC conduisant à l'arrêt du cycle, l'apoptose et la sensibilité aux drogues [479]. Cet inhibiteur n'entraîne pas de toxicité relative à l'INSR et engendre une **réduction de la formation de la**

tumeur, de l'angiogenèse ainsi qu'une survie prolongée des souris. Aucune toxicité n'est observée *in vivo* même avec un traitement à long terme. De plus, le PPP bloque totalement l'ostéolyse en réduisant le nombre de lésions lytiques et le nombre d'ostéoclastes *in vivo* et possède des effets sur la **résorption des ostéoclastes** [480]. Comme signalé précédemment, il n'existe aucune donnée de ces inhibiteurs de kinases d'IGF-1R en clinique étant donné que ces phases cliniques de phase I sont reportées.

Cibler seulement l'IGF-1R ne semblerait pas suffisant pour contrôler la croissance des cellules de MM en raison d'autres facteurs de croissance du MM. De plus, comme l'inhibition d'IGF-1R n'a pas seulement un effet sur la survie/prolifération mais également sur l'augmentation de la sensibilité des MMC vis-à-vis des autres drogues, des **combinaisons** des cibles de l'IGF-1R avec d'autres inhibiteurs ont été étudiées.

La rapamycine qui est un inhibiteur de la voie mTor agit en synergie *in vitro* avec l'IMC-A12 dans le blocage de la prolifération des MMC [481]. Un essai clinique de phase I sur la combinaison IMC-A12 et un analogue de la rapamycine a débuté sur les patients atteints de MM à un stade avancé. Une combinaison de l'AVE1642 ou de l'IMC-A12 avec les drogues conventionnelles (bortezomib et melphalan) ont montré une augmentation de l'apoptose *in vitro* [482] et de la survie dans un modèle murin [475]. Un essai clinique de phase II avec l'anticorps anti-IGF-1R AVE-1642 en association avec le bortezomib sur les patients atteints de MM en rechute est en cours.

Des études précliniques ont également été entreprises sur des combinaisons des inhibiteurs de kinases d'IGF-1R avec les traitements conventionnels. Mitsiades *et al.* ont combiné le NVP-AEW712 avec le melphalan et ont décrit un effet synergique des ces 2 drogues sur la survie prolongée dans un modèle murin de xénogreffe de MM. De la même manière, le NVP-AEW541 possède un effet synergique *in vitro* avec la dexaméthasone ou le lénalidomide et un effet additif avec le melphalan ou le bortezomib [478]. Il en est de même pour le PPP qui potentialise la sensibilité des MMC *in vitro* au dexaméthasone, à la rapamycine ou à un inhibiteur de la p38 SB205380 [483].

II. Résultats et discussion

II.1. Article 3

"The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor" Blood, 2009, 113: 4614-4626.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, de nombreux facteurs de croissance jouent un rôle dans la prolifération et la survie des cellules myélomateuses. Le but de ce travail a été d'étudier les 5 facteurs de croissance les plus documentés dans la littérature (IL-6, IGF-1, HGF, HB-EGF, APRIL) afin d'identifier leur rôle respectif et leurs coopérations dans la biologie du MM.

Nous avons démontré que :

- l'expression du CD45 permet de distinguer les HMCLs non autonomes de celles autonomes : les HMCLs $CD45^+$ ne peuvent pas survivre *in vitro* dans un milieu de culture dépourvu de sérum et de cytokines exogènes alors que les HMCLs $CD45^-$ peuvent survivre pendant plus de 4 jours grâce à une boucle autocrine IGF-1/IGF-1R. En effet, seul un inhibiteur bloquant la signalisation de l'IGF-1R bloque leur croissance.
- l'IL-6 et l'IGF-1 sont des facteurs de croissances majeurs du MM puisqu'ils stimulent la prolifération de 7 HMCL sur 8 testées. En revanche, l'HGF, le HB-EGF et APRIL ne stimulent qu'une ou deux lignées sur les 8.
- l'étude de l'effet des 5 facteurs de croissance en présence des différents inhibiteurs spécifiques a permis de démontrer que la prolifération des cellules médiée par l'IGF-1 est uniquement bloquée par un inhibiteur de son récepteur. A l'inverse, les activités de croissance de l'IL-6, d'HGF et de l'HB-EGF sont inhibées par l'inhibiteur de l'IGF-1R en plus de leurs propres inhibiteurs. APRIL est la seule cytokine testée dont l'activité n'est pas bloquée par l'inhibiteur d'IGF-1R mais seulement par un inhibiteur spécifique. Ces

données soulignent l'importance de la sécrétion d'IGF-1 par les HMCL qui a été vérifié par Western Blot.

- l'analyse de l'expression des récepteurs de ces facteurs de croissance, IL-6R, gp130, IGF-1R, c-met, BCMA et TACI par puces à ADN Affymetrix sur les différentes populations de cellules B normales, les plasmocytes de patients atteints de MM et les HMCL a permis d'identifier une augmentation des expressions d'IL-6R, de gp130 et de BCMA durant la différentiation plasmocytaire ainsi que dans les MMC. TACI est présent dans toutes les populations. A l'inverse, l'IGF-1R est absent des cellules B normales et se retrouve présent dans environ 45% des MMC. Quand à c-met, son expression est très faible dans les cellules B normales alors qu'elle est forte dans plus de la moitié des MMC.
- l'étude du pronostic de ces récepteurs a mis en évidence que seuls l'IGF-1R et l'IL-6R étaient corrélés à un facteur pronostic sur 2 cohortes de patients : la nôtre (série HM) et celle du groupe du groupe américain de Shaughnessy (série LR-TT2). Les patients des 2 cohortes ont été séparés en fonction de la présence ou non de l'IGF-1R : l'IGF-1R est présent dans 31% et 50% des patients ou en fonction du signal obtenu de l'IL-6R par puces Affymetrix (IL-6R présent dans toutes les MMC : 50% IL-6R^{faible} et 50% IL-6R^{forte}). En effet, les patients ayant des MMC IGF-1R^{absent} ou des MMC IL-6R^{faible} ont une survie sans événement et une survie globale plus longue que ceux ayant des MMC IGF-1R^{présent} ou IL-6R^{forte}. En examinant la répartition des patients dont les MMC sont IGF-1R^{présent} ou IL-6R^{forte} en fonction des anomalies cytogénétiques et de la classification moléculaire du MM, nous avons pu mettre en évidence que les patients qui présentaient une translocation t(4 ;14) (groupe MMSET) étaient fortement associés à la présence d'IGF-1R (77% *vs* 23%, $P = 2.10^{-4}$, pour la cohorte HM ; 94% *vs* 43%, $P = 8.10^{-15}$, pour la cohorte LR-TT2) ou la forte expression d'IL-6R (77% *vs* 45%, $P = 6.10^{-4}$, pour la cohorte HM ; 82% *vs* 45%, $P = 5.10^{-8}$, pour la cohorte LR-TT2). La forte incidence entre la présence d'IGF-1R ou la forte expression d'IL-6R et la translocation t(4 ;14) peut expliquer le mauvais pronostic de ces 2 récepteurs. Toutefois considéré isolement c'est-à-dire sans t(4 ;14), les patients ayant des MMC IGF-1R^{présent} ou IL-6R^{forte} restent encore des facteurs de mauvais pronostic dans la cohorte LR-TT2 par rapport aux patients IGF-1R^{absent} ou IL-6R^{faible}.

En conclusion, l'IGF-1 est un facteur majeur du MM secondé par l'IL-6. La biologie *in vitro* a une réalité *in vivo* puisque seuls les récepteurs de l'IGF-1 et de l'IL-6 sont des facteurs de mauvais pronostic dans 2 cohortes de patients atteints de MM. En raison de l'expression d'IGF-1R uniquement exprimé sur les cellules plasmocytaires myélomateuses, un inhibiteur d'IGF-1R en combinaison avec un anticorps anti-IL-6 apparait comme une cible intéressante pour le traitement du MM.

II.2. Article 4

“The BAFF/APRIL inhibitor - TACI-Fc – induces the survival and the proliferation of myeloma cell lines, promoting an autocrine IGF-1/IGF-1R loop” soumis.

Dans certaines conditions, nous avons trouvé que l’inhibiteur de BAFF/APRIL, TACI-FC, induisait la prolifération des cellules de MM. Nous avons étudié le mécanisme de cette prolifération.

Nous avons démontré que :

- TACI-Fc induisait la prolifération de 5 lignées de MM sur 9 dans un milieu de culture sans sérum ni facteur de croissance exogène. Les 2 autres inhibiteurs de BAFF/APRIL, BCMA-Fc ou BAFF-R-Fc n’engendre aucun effet, ce qui suggère un effet spécifique à TACI et non du fragment Fc.
- cette prolifération engendrée par TACI-Fc est uniquement inhibée par un inhibiteur d’IGF-1R ou un anti-IGF-1R mais pas par un anti-IL-6. L’effet de TACI-Fc en présence d’IL-6 ou d’IGF-1 a permis d’établir une synergie de TACI-Fc avec l’IL-6 et non avec l’IGF-1. De plus, l’ajout d’IGF-1 exogène par le biais d’une protéine recombinante ou par l’ajout de sérum de vœu fœtal ne permet plus de détecter l’effet de prolifération de TACI-Fc, ce qui laisse à penser que TACI-Fc favorise une boucle autocrine IGF-1/IGF-1R.
- l’héparine qui déplace la fixation de TACI-Fc sur syndecan-1 n’inhibe pas l’effet proliératif de TACI-Fc, ce qui démontre que l’effet de cette molécule ne passe pas par sa fixation à syndecan-1.
- l’analyse de l’apoptose d’une lignée $CD45^+$ en présence de TACI-FC avec ou sans IL-6 montre que TACI-Fc est un facteur anti-apoptotique, la lignée $CD45^-$ a déjà une forte viabilité. Le cycle cellulaire en présence de TACI-Fc est favorisé dans les 2 lignées ($CD45^+$ et $CD45^-$) avec une synergie avec l’IL-6 pour la lignée $CD45^+$ (sensible à l’IL-6).
- un test de culture durant 21 jours en présence de TACI-Fc en présence ou pas d’IL-6 confirme que TACI-Fc favorise la survie des cellules de MM : la lignée de MM XG-2 qui ne survie pas en culture plus de 12 jours dans un milieu dépourvu de sérum survie durant plus de 21 jours en présence de

TACI-Fc ou en présence d'IL-6. Quand à XG-5 dont la survie est autonome, la présence de TACI-Fc améliore sa survie et sa prolifération. La prolifération des HMCL est plus importante quand ces cellules sont cultivées en présence de TACI-Fc et d'IL-6.

En conclusion, TACI-Fc favorise la croissance des cellules de MM en favorisant une boucle autocrine IGF-1/IGF-1R. Les lignées n'étant pas sensibles à TACI-Fc n'expriment pas l'IGF-1R ou sont les moins stimulées par l'IGF-1. L'effet proliératif de TACI-FC qui est utilisé à des usages thérapeutiques dans le MM ne devrait pas se produire *in vivo* : la quantité d'IGF-1 autocrine produite *via* TACI-FC est masquée par l'ajout d'IGF-1 présent dans le sérum et d'IGF-1 recombinant qui sont largement en excès par rapport à l'IGF-1 autocrine. De plus, l'IGF-1 est abondant dans l'environnement médullaire. Toutefois, cette étude permet de confirmer l'importance de la voie de signalisation d'IGF-1/IGF-1R dans la biologie du MM.

II.3. Article 5

“Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin receptor/IGF-1 receptor activation” soumis.

Etant donné le rôle important de la voie de signalisation de l’IGF-1/IGF-1R dans la croissance des cellules de myélome et la forte homologie entre l’IGF-1R et l’INSR, nous avons étudié l’effet de l’insuline dans la biologie du MM.

Nous avons démontré que :

- l’INSR est exprimé par 8 HMCL sur 9. Ce récepteur est également exprimé dans les populations B normales dont l’expression est augmentée durant la différenciation plasmocytaire.
- l’insuline possède les mêmes effets de prolifération que l’IGF-1. Les 7 lignées sensibles à l’IGF-1 sont sensibles à l’insuline, les 2 lignées non sensibles sont IGF-1R$^-$/INSR$^-$ ou IGF-1R$^+$/INSR$^-$.
- l’effet de stimulation de l’insuline est inhibé par un anticorps neutralisant anti-INSR mais également par un inhibiteur de l’IGF-1R ou un anticorps anti-IGF-1R. En revanche, l’effet de l’IGF-1 est bloqué uniquement par un inhibiteur ou un anticorps ciblant l’IGF-1R et pas par l’anti-INSR.
- l’effet de l’insuline engendre l’activation du cycle cellulaire et l’inhibition de l’apoptose. De plus, l’insuline active les mêmes voies de signalisation que l’IGF-1, c'est-à-dire les voies PI3K/AKT et MAPK qui sont bloquées par l’inhibiteur de l’IGF-1R et l’anti-INSR.
- La présence du récepteur hybride IGF-1R/INSR sur les HMCL par des expériences d’immunoprécipitations spécifiques des récepteurs. L’insuline est capable de phosphoryler l’INSR mais également l’IGF-1R. Il en est de même pour l’IGF-1.
- l’étude du pronostic clinique de l’INSR a montré que ce récepteur n’était pas un facteur pronostic du MM.

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois que l’insuline était un facteur de croissance du MM. L’insuline active l’IGF-1R *via* l’Hybrid-R étant donné que l’insuline possède 100 fois plus d’affinité pour l’Hybrid-R que pour l’IGF-1R. L’activation de l’Hybrid-R *via* l’insuline entraîne ainsi la prolifération et la survie des

cellules de MM au même titre que l'IGF-1. Ces données soulèvent l'intérêt des cibles de l'IGF-1 dans le myélome et plus particulièrement insiste sur le fait que les inhibiteurs de l'IGF-1 dans le MM doivent également cibler l'Hybrid-R afin de neutraliser toute la voie de signalisation de l'IGF-1R c'est-à-dire *via* l'homodimère mais aussi *via* l'hétérodimère.

II.4. Discussion

Comme l'IL-6, le rôle de l'IGF-1 a été largement décrit dans le MM. Toutefois, l'existence d'une multitude de facteurs de croissance rapportés dans cette pathologie rend difficile leur rôle et leur importance respectifs dans la biologie du MM. Notre étude basée, dans un premier temps, sur 5 facteurs de croissance les plus documentés dans la littérature décrit pour la première fois une hiérarchie de ces facteurs de croissance : l'IGF-1 est le facteur majeur du MM suivi de l'IL-6 (puisque ces 2 facteurs stimulent la croissance de la quasi-totalité des lignées). Le HGF, l'HB-EGF et l'APRIL favorisent la prolifération de peu lignées de MM.
Dans le MM, l'IGF-1R est exprimé dans 44% des plasmocytes tumoraux de patients atteints de MM et ce récepteur est absent des plasmocytes normaux et de plasmocytes atteints de cas de MGUS. De plus, 90% des HMCL expriment ce récepteur. Ces données suggèrent que l'expression de l'IGF-1R peut être une transition entre le stade MGUS et MM qui favorise la progression de la maladie.

Quels sont le(s) mécanisme(s) qui induise(nt) l'expression de ce récepteur ? La présence d'IGF-1R, dont le gène est situé sur le chromosome 15, est retrouvée dans la majorité des anomalies cytogénétiques (t(4 ;14), gain 1q21, del13, del17), ce qui suggère que l'expression d'IGF-1R n'est pas le résultat d'une anomalie chromosomique particulière. Néanmoins, l'association de l'IGF-1R avec la t(4 ;14) aggrave le pronostic de l'IGF-1R. Ceci est en accord avec la publication de Glassford *et al*. qui montre que les HMCL et les MMC présentant des translocations t(4 ;14) ou t(14 ;16) ont une prolifération dépendante de l'IGF-1 contrairement aux cellules de MM présentant une translocation t(11 ;14). En effet, l'IGF-1 régule l'expression de la cycline D2 (présente dans les cellules de MM ayant une t(4 ;14) ou t(14 ;16)), à l'inverse de la cycline D1 (exprimée dans les cellules de MM ayant une t(11 ;14)) [484].
Nous n'avons pas pu trouvé une forte incidence de l'IGF-1R chez les MMC de patients présentant une t(14 ;16) dans notre série de patients due à sa faible fréquence (moins de 5%). Cependant, dans la cohorte de LR-TT2, il n'existe pas de corrélation entre l'IGF-1R et le groupe MF (t(14 ;16)) (présence d'IGF-1R de 55% dans le groupe MF *vs* 50% dans l'ensemble des patients ; P = 0,5).

Etant donné que l'induction de l'IGF-1R n'est pas le résultat d'une anomalie cytogénétique, sa régulation pourrait avoir lieu au niveau de sa transcription. Des études montrent une régulation transcriptionnelle de l'IGF-1R par des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, WT1 et BRCA1 [485]. La del17 touchant la voie de la p53 ainsi que la mutation et la délétion de p53 étant trouvées respectivement dans 5% et 10% de cas de MM et 65% et 40% des PCL pourraient être un des mécanismes d'induction de l'expression de l'IGF-1R dans les cellules de MM. En effet, la forme sauvage de p53 supprime l'activité du promoteur de l'IGF-1R alors que la forme mutée de p53 réverse la répression de ce promoteur, ce qui entraîne une augmentation de l'ARN messager et du récepteur à la membrane [376].

D'autres mécanismes peuvent être mis en jeu dans l'augmentation de l'expression de l'IGF-1R :

- les microRNA : des cellules cardiaques de rat diabétique possèdent une diminution de l'expression d'IGF-1R et non de son ARNm en comparaison à des cellules de rat non diabétiques. Cette diminution de l'expression d'IGF-1R serait due *via* une surexpression de miRNA [486].
- l'acétylation : l'analyse de GEP d'une lignée de MM traitée avec un inhibiteur des déacétylases, SAHA, a permis de montrer une diminution de l'expression de l'IGF-1R [280].
- la déméthylation : une étude faite sur les chondrocytes montre que la déméthylation du promoteur de l'OP-1 (BMP-7) entraîne une surexpression de l'IGF-1R [487]. De la même manière, la levée de la méthylation du promoteur de gènes ciblant l'IGF-1R pourrait se produire dans les cellules plasmocytaires tumorales.

La régulation de l'expression de l'IGF-1R est peu connue. Quelques mécanismes sont décrits pouvant être à l'origine de l'induction de son expression dans d'autres modèles que le MM et il serait intéressant de les étudier dans cette pathologie.

Une fois que les cellules plasmocytaires tumorales ont acquis l'expression de l'IGF-1R, l'IGF-1 peut augmenter leur survie et leur prolifération principalement des cellules $CD45^-$ (voir ci-dessous). Comme nous l'avons démontré le signal IGF-1/IGF-1R est suffisant pour induire la survie et la prolifération des lignées de MM, ce qui laisse à penser que la survie/prolifération *via* l'IGF-1R a lieu également *in vivo* dans l'environnement médullaire, riche en IGF-1. Ce microenvironnement est aussi concentré en facteurs de croissance tels que l'IL-6, l'HGF et l'HB-EGF qui vont

pouvoir agir en coopération avec l'IGF-1 et favoriser davantage la survie et la prolifération des MMC. Le seul facteur qui n'a pas besoin d'IGF-1 pour favoriser la survie et la prolifération des cellules de MM est l'APRIL. Ceci peut être expliqué par le fait que syndecan-1 concentre APRIL et TACI autour des cellules de MM permettant l'activation du signal APRIL/TACI nécessaire à la survie et à la croissance de ces cellules [488]. Ces données suggèrent qu'APRIL peut se substituer à l'IGF-1 pour la survie et la prolifération des MMC quand les cellules sont sensibles à ce facteur de croissance.

Les expériences des lignées de MM faites dans un milieu de culture dépourvu de sérum de vœu fœtal et de facteur de croissance exogène, nous ont permis de distinguer 2 catégories de lignées en fonction de l'expression de la phosphatase CD45 :

- les lignées $CD45^-$ qui sont autonomes et indépendantes des facteurs de croissance exogènes c'est-à-dire pouvant survivre en culture uniquement par leurs productions de facteurs de croissance et en particulier l'IGF-1
- les lignées $CD45^+$ qui sont non autonomes et dépendantes des facteurs de croissances exogènes dont l'IL-6 ou l'IGF-1.

Ces données sont en accord avec la publication de Li *et al*. qui montre que les HMCLs $CD45^+$ sont plus sensibles à l'IL-6 dû à une translocation d'IL-6 et de CD45 dans les lipides rafts [94]. Ces données sont également cohérentes avec la publication de Moreau *et al*. qui décrit que les patients atteints de MM $CD45^-$ ont une moins bonne survie que les patients de MM $CD45^+$ due à un phénotype plus agressif de ces cellules [489]. En effet, une autonomie des lignées de MM $CD45^-$ vis-à-vis des facteurs de croissance exogènes traduit une dépendance moins importante de l'environnement extérieur et donc un stade plus avancé de la maladie.

Les lignées $CD45^+$ qui produisent comme les lignées $CD45^-$ de l'IGF-1 ne peuvent pas survivre en culture, ce qui suggère que le signal IGF-1 n'est pas suffisant à favoriser leur survie. Ceci peut s'expliquer par les études menées par Descamps *et al.* sur le CD45. En effet, le CD45 inactive rapidement le signal de l'IGF-1R en déphosphorylant le domaine kinase du récepteur, ce qui démontre une activation du signal d'IGF-1 plus courte dans les lignées $CD45^+$ [490]. Toutefois, nous avons démontré qu'une quantité d'IGF-1 plus importante (à partir de 30 pg/mL) que celle produite par les HMCLs elle-même (< 30 pg/mL : seuil limite de détection de l'ELISA)

suffisait à induire la survie et la prolifération de ces cellules CD45$^+$. Descamps *et al.* ont également montré que les HMCLs CD45$^+$ ne sont pas inhibées en présence d'un anticorps anti-IGF-1R contrairement à celles CD45$^-$. Ces lignées CD45$^+$ deviennent sensibles à l'anti-IGF-1R lorsque l'expression du CD45 est éteint par un ShRNA ciblant CD45 [469]. Ceci peut s'expliquer par le fait que les 2 lignées de MM CD45$^+$ utilisées pour les expériences (XG-1 et XG-6) sont les moins sensibles à l'IGF-1 (stimulation de la croissance par l'IGF-1 de 5 fois pour XG-1, 3 fois pour XG-6 et 17 fois pour XG-2) et les plus dépendantes à l'IL-6. Dans nos manipulations, un inhibiteur d'IGF-1R bloque partiellement ou totalement l'effet de 200 pg/mL d'IL-6 sur les HMCLs. Cet inhibiteur d'IGF-1R est moins efficace sur ces lignées plus sensibles à l'IL-6 et bloque respectivement 31% et 65% de l'activité de 200 pg/mL d'IL-6 sur XG-1 et XG-6. Descamps *et al.* ont testé l'anti-IGF-1R sur les lignées de MM CD45$^+$ en présence d'un excès d'IL-6 (3 ng/mL). L'inefficacité de l'anti-IGF-1R observé dans ces conditions suggère que l'activation du signal IL-6 est majoritaire et contrecarre l'effet de l'IGF-1 qui est moins important sur XG-1 et XG-6. Un anti-IGF-1R n'aura donc aucun effet en présence de fortes concentrations d'IL-6 sur des lignées CD45$^-$ moins sensibles à l'IGF-1. L'extinction du CD45 sur XG-1 va la rendre moins sensible à l'IL-6 et lui confère donc un comportement de lignée CD45$^-$: sa survie et sa prolifération seront dépendantes de l'IGF-1 et l'IL-6 ne pourra plus contrecarrer l'effet de l'inhibition de l'IGF-1R.

Le rôle majeur de l'IGF-1 dans environ 44% des plasmocytes myélomateux exprimant l'IGF-1R nous a orienté à étudier la fonction de l'insuline dans le MM. Dans les lignées de MM, nous avons démontré que l'insuline avait le même effet de survie et de prolifération que l'IGF-1. Ces données seraient en accord avec Kulas et al. qui ont montré un rôle « inhibiteur » du CD45 dans la voie de signalisation de l'insuline [491]. L'activité de croissance de l'insuline passerait par l'activation du signal de l'IGF-1R puisque la lignée IGF-1R$^-$ et INSR$^+$ ne prolifère pas en présence d'insuline. De plus, des molécules bloquant la fixation des ligands sur l'IGF-1R ou le domaine tyrosine kinase de l'IGF-1R bloquent l'effet de l'insuline. Des expériences d'immunoprécipitation spécifiques des récepteurs à l'IGF-1 et à l'insuline nous ont permis d'identifier que l'IGF-1 et l'insuline étaient capables d'activer l'IGF-1R et l'INSR ainsi que l'existence des récepteurs hybrides IGF-1R/INSR à la surface des lignées de MM. L'insuline ayant une très faible affinité pour l'IGF-1R et

réciproquement pour l'IGF-1 (ED50 > 100 nM : conditions non physiologiques), l'activation de l'IGF-1R par l'insuline et celle de l'INSR par l'IGF-1 devraient être médiées par le récepteur hybride dont l'activation par un ligand entraîne la transactivation de l'hétérodimère [296]. Nous avons observé un effet de l'insuline et de l'IGF-1 dès 100 pg/mL (voire moins pour certaines lignées), ce qui équivaut à 17 µM d'insuline et 13 µM d'IGF-1. Les concentrations plasmatiques d'insuline et d'IGF-1 étant respectivement de 0,5 nM et 20 nM [288], l'insuline et l'IGF-1 ont donc un effet sur la prolifération des cellules de MM très en dessous des concentrations physiologiques.

L'effet de l'insuline passe majoritairement par le récepteur hybride et par l'homodimère INSR. En effet, un anticorps anti-INSR bloque l'effet de l'insuline (pas de l'IGF-1) de même qu'un inhibiteur de l'activité kinase d'IGF-1R. L'anti-IGF-1R - αIR3 - bloque également l'effet de l'insuline en bloquant l'Hybrid-R puisque l'αIR3 a aussi une affinité pour l'IGF-1R présent à l'état hétérodimérique [492] (comme la majorité des anticorps anti-IGF-1R [410]). Quant à l'IGF-1, son effet passe par l'IGF-1R qu'il soit homodimérique ou hétérodimérique, étant donné que son affinité pour l'IGF-1R et pour l'Hybrid-R sont équivalentes.

Contrairement à la majorité des cancers où le récepteur à l'insuline est surexprimé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, l'expression de l'INSR n'est pas augmentée entre le plasmocyte normal et myélomateux. Dans le MM, étant donné que les cellules plasmocytaires expriment toutes l'INSR, le facteur limitant dans la formation de l'Hybrid-R est l'IGF-1R. Ces données suggèrent que l'Hybrid-R est présent à la surface des MMC dès que l'IGF-1R est induit, ce qui confère à l'insuline comme à l'IGF-1 un effet de prolifération et de survie des cellules de MM. On peut en déduire que l'IGF-1R qu'il soit homodimérique ou hétérodimérique est le récepteur majoritaire activant les voies de signalisation favorisant la survie et la croissance des cellules de MM *via* l'IGF-1 et l'insuline. Ce mécanisme doit avoir lieu in vivo et est conforté par le fait que seul l'IGF-1R est un facteur de mauvais pronostic, à la différence d'INSR.

Mon travail de thèse a permis de hiérarchiser les principaux facteurs de croissance dans le MM et d'identifier un rôle majeur de la voie de signalisation d'IGF-1/IGF-1R et plus exactement des voies IGF-1/IGF-1R, IGF-1/Hybrid-R et insuline/Hybrid-R. De plus, les résultats obtenus *in vitro* ont une relevance biologique *in vivo* puisque les

récepteurs des 2 facteurs de croissance majeurs dans le MM sont trouvés de mauvais pronostic sur 2 larges cohortes de patients atteints de MM. Un inhibiteur ciblant l'IGF-1R mais également l'Hybrid-R en association avec un anti-IL-6 semblerait donc être un traitement prometteur dans la pathologie du MM pour les 44% des patients exprimant l'IGF-1R.

III. Discussion générale

L'étude sur la coopération des 5 facteurs de croissances les plus documentés dans le MM nous a permis de nous orienter sur le système IGF-1/insuline dans la survie et la prolifération des cellules myélomateuses. Par ailleurs, ce travail soulève de nombreuses interrogations, notamment sur le rôle du système IGF-1/insuline dans l'environnement des patients atteints de MM.

L'IGF-1R : cible thérapeutique prometteuse des MMC mais aussi des ostéoclastes dans le MM

Comme évoqué précédemment, l'IGF-1 a été largement décrit dans les cancers. Dans le MM, mis à part son rôle dans la survie et la prolifération des MMC et dans la coopération avec les autres cytokines de l'environnement médullaire, l'IGF-1 n'a pas qu'une fonction de facteur de croissance des plasmocytes tumoraux. L'IGF-1 joue également un rôle dans le homing des MMC, dans l'angiogenèse ainsi que dans la résistance aux drogues [465,466,493].

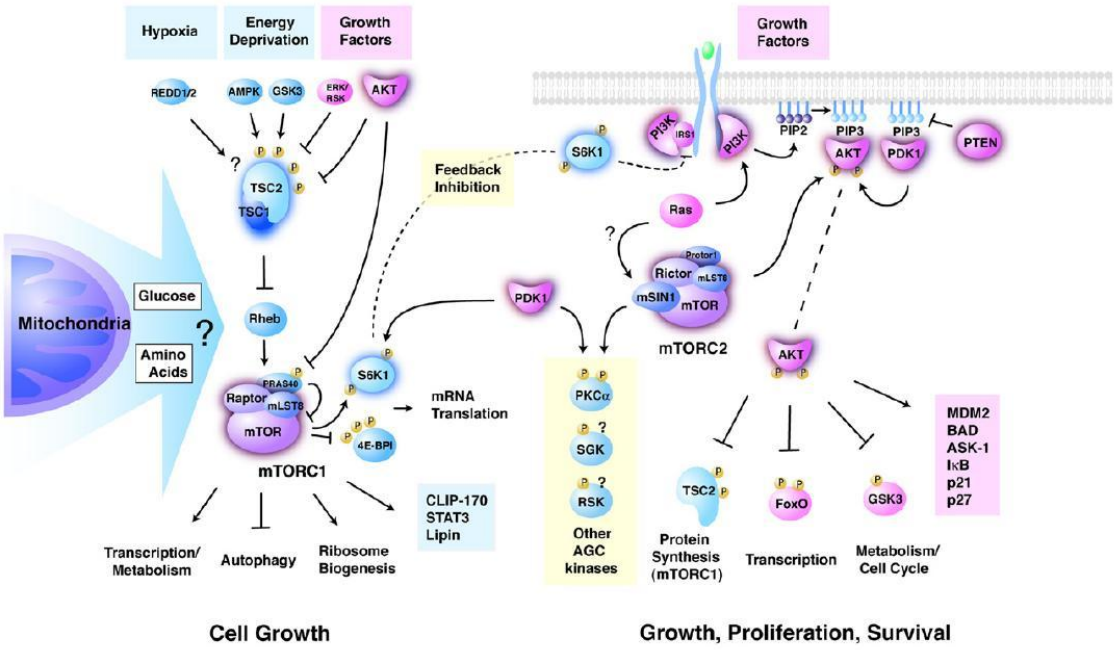
De plus, l'IGF-1 serait également impliqué dans la régulation de l'homéostasie osseuse en jouant un rôle dans l'équilibre des ostéoblastes et des ostéoclastes [494]. En plus d'avoir un rôle dans le développement de l'os jusqu'à la puberté [495], l'IGF-1 favoriserait l'ostéoclastogenèse [496]. Cependant l'action d'IGF-1 est contradictoire et certaines études la décrivent également activatrice de l'ostéoblastogenèse : ces différentes fonctions pourraient être expliquées par la présence ou non des IGFBP qui modulent son activité [497]. Néanmoins, dans le myélome il semblerait que l'IGF-1 ait un rôle dans la différentiation et l'activation des ostéoclastes qui expriment le récepteur. Cette cytokine aurait un rôle direct *via* son récepteur et un rôle indirect *via* la stimulation de RANKL par les ostéoblastes qui entraîne une augmentation du ratio RANKL/OPG et donc la résorption osseuse [494]. Il est à noter qu'IGF-1 pourrait également aggraver la progression du MM en stimulant d'autres facteurs de croissances paracrines qui réguleraient la résorption osseuse ainsi que la croissance des cellules de MM et l'angiogenèse tel que la production de TNF-α par les monocytes et les macrophages [498]. Même si la relation entre l'IGF-1 et les lésions osseuses présentes chez les patients atteints de MM n'a pas encore été décrite, les résultats obtenus avec un inhibiteur de l'IGF-1R dans un modèle de xénogreffe de

souris confortent ces données : en plus d'inhiber la formation de la tumeur et l'angiogenèse, le PPP bloque aussi l'ostéolyse et la formation des ostéoclastes [480]. Du fait de ces diverses fonctions dans la biologie du MM, cibler l'IGF-1R serait donc une cible thérapeutique prometteuse. En revanche, la majorité des inhibiteurs ciblant l'IGF-1R entraînent une hyperglycémie qui n'a pas encore été clarifiée. Ces données mettent en évidence la relation étroite qui existe entre l'IGF-1 et l'insuline. D'autant plus, qu'à l'état physiologique normal, il s'établit un équilibre entre les voies métaboliques et énergétiques et les voies favorisant la croissance et la prolifération médiées respectivement par l'insuline et l'IGF-1. L'inhibition de l'IGF-1R va donc entraîner un déséquilibre de ces 2 voies (qui se rejoignent partiellement) et résulter alors à une prédominance de la voie de signalisation de l'insuline, ce qui va affecter le métabolisme [411].

Quel est le rôle de la voie mTOR dans le MM ?

La voie de l'insuline et de l'IGF-1 convergent dans l'activation de la voie mTOR qui est un régulateur clé de la croissance et du métabolisme. Étant donné que cette voie de signalisation est dérégulée dans les cancers et dans le diabète, la voie mTOR a été le sujet de nombreuses études, notamment dans le cancer [499]. Du fait de ces fonctions diverses et de ces différents activateurs, la voie mTOR est une voie de signalisation complexe avec de multiples boucles de régulation (Figure 14). La protéine peut former 2 complexes multiprotéiques mTORC1 et mTORC2 qui sont respectivement activés par AKT ou activeur d'AKT.

Figure 14 : La voie de signalisation de mTOR dans le cancer d'après Guertin *et al.* [500]. L'activité de mTORC1 est influencée par de nombreux signaux dont les facteurs de croissance tels que l'IGF-1 et l'insuline qui sont activateurs et vont entraîner la croissance cellulaire. Les activateurs de mTORC2 sont moins connus mais mTORC2 entraîne l'activation d'AKT, son seul substrat identifié qui va donc engendrer une prolifération, une croissance et une survie de la cellule. Par l'intermédiaire d'AKT, mTORC2 peut donc activer mTORC1.



L'insuline et l'IGF-1 activent donc mTORC1 *via* AKT, ce qui entraîne la croissance cellulaire. Cibler mTORC1 revient ainsi à inhiber à la fois l'insuline et l'IGF-1. Les inhibiteurs de mTOR, dont la rapamycine, sont utilisés comme traitement thérapeutique dans les cancers et ne ciblent que mTORC1, mTOCR2 étant insensible. Il est à noter que cet inhibiteur est efficace dans les cas d'hyperactivation de la voie PI3K/AKT caractéristique de certains cancers dû principalement à la délétion du gène suppresseur de tumeur PTEN [501] et pour lesquels un inhibiteur d'IGF-1R n'a notamment aucun effet.

Des études sur la ramamycine et ces analogues ont montré un effet anti-cancéreux dans le MM *in vitro* et *in vivo* caractérisé par une inhibition de la prolifération, de l'angiogenèse et une induction de l'apoptose ainsi qu'une diminution de la tumeur et une survie prolongée des modèles de xénogreffe de souris [200,502,503]. De plus, des études ont montré un effet additif voire synergique de la rapamycine avec un inhibiteur de l'IGF-1R dans le MM [504].

Peterson *et al.* ont décrit pour la première fois une implication de la dérégulation de mTOR dans le MM mais contrairement aux autres cancers, ils démontrent qu'environ 30% des patients atteints de MM surexpriment DEPTOR qui est un inhibiteur de mTOR, ce qui conduit à une inhibition des 2 complexes : mTORC1 et mTORC2. Cette surexpression de DEPTOR est retrouvée majoritairement dans les patients caractérisés par une surexpression de cycline D1/D3 ou de c-MAF/MAFB. Etonnamment, l'inhibition de la voie mTOR *via* DEPTOR entraîne une activation de la voie PI3K/AKT qui favorise la survie des MMC [505]. Ceci peut s'expliquer par un effet anti-stress du réticulum endoplasmique (stress du RE) de DEPTOR. En effet, l'activation de mTORC1 peut entraîner une réponse au stress du RE prolongée qui peut conduire à l'apoptose comme c'est le cas des inhibiteurs de protéasome. DEPTOR inhiberait donc l'effet de mTORC1 dans l'apoptose *via* une réponse au stress [505].

Il serait intéressant d'exploiter le rôle de l'IGF-1 et de l'insuline dans la voie mTOR, d'autant plus que dans les cancers dont le MM, une réponse au stress du RE est critique pour la transformation tumorale [506]. Rappelons que la surexpression d'une des protéines impliquées dans la réponse au stress du RE, XBP-1 a permis de générer un modèle de souris semblable à la pathologie humaine du MM [507]. De plus, l'insuline et l'IGF-1 sont impliquées dans la réponse au stress du RE qui est régulée par une boucle de contrôle négative de S6K sur IRS1/2 [508]. Il est à noter que la résistance à l'insuline est médiée par cette absence de contrôle négatif provoquant la destruction des cellules β du pancréas due à une réponse au stress du RE prolongée. Cette résistance a l'insuline est reversée par une surexpression de XBP-1 [509].

Quel est le rôle du récepteur homodimérique de l'INSR dans le MM ?

Comme nous l'avons démontré, l'insuline est un facteur de croissance dans les cellules de MM en passant par le récepteur hybride INSR/IGF-1R qui permet de potentialiser l'action de l'insuline au même titre que l'IGF-1 dans la prolifération et la survie des MMC. Ces données sont en accord avec le risque augmenté de développer un myélome chez les patients diabétiques [510]. Toutefois, étant donné l'importance de l'insuline dans le métabolisme glucidique à travers son récepteur homodimérique, le rôle de l'insuline/INSR dans la différenciation plasmocytaire et dans les cellules plasmocytaires de MM est sujet d'interrogation.

Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'INSR au cours de la différenciation plasmocytaire qui est associée à une activité métabolique importante dont ont besoin les lymphocytes B pour se différencier en plasmocytes sécrétant une grande quantité d'Ig. La fonction des LB est altérée chez les sujets diabétiques de type 2 due à un blocage de la prolifération des LB [511]. La prolifération et l'activation de ces cellules sont modulées par l'insuline et le glucose qui régulent le transport des adénosines à travers la membrane plasmique des LB, étape essentielle à la croissance et l'activation de ces cellules [512]. Ces données suggèrent donc un rôle de l'insuline dans la différenciation plasmocytaire.

Le métabolisme glucidique est également important dans la croissance des cellules tumorales où il est augmenté. Une méthode de diagnostic dans la détection des cellules cancéreuses a été développée sur ce principe : en analysant l'incorporation de glucose dans les cellules grâce à du glucose radiomarqué, le 18 F-fluorodéoxyglucose (FDG) qui est proportionnel à l'activité de prolifération et du nombre de cellules viables dans la tumeur. Cette méthode de diagnostic est utilisée dans de nombreux cancers [513] et a été notamment testé dans la pathologie du MM [514]. La captation du FDG permet de détecter les activités hypermétaboliques dans les sites intramédullaires et extramédullaires et d'identifier les régions de lyses osseuses. De plus, Bartel *et al.* ont montré que la suppression du FDG dans les lésions focales après un traitement confère un bon pronostic [514]. Ces données montrent l'importance d'étudier le rôle de l'insuline et du métabolisme glucidique dans les plasmocytes normaux et tumoraux.

Quel est le rôle des adipocytes dans la pathologie du MM ?

Etant donné que le risque de développer un myélome est plus élevé chez les patients diabétiques, le rôle de l'insuline et de leurs cellules cibles, les adipocytes médullaires sont un domaine à explorer dans la pathologie du MM. D'autant plus que le nombre des adipocytes médullaires augmentent avec l'âge et peuvent occuper plus de 70% de l'espace de la MO. Comme les personnes atteintes de MM sont généralement des sujets âgés avec une médiane de survie de plus de 65 ans et une incidence accrue avec l'âge, cela suppose que la MO des malades est remplie d'adipocytes qui interagissent étroitement avec les cellules de MM. Caers *et al.* sont les seuls à avoir étudié le rôle des adipocytes médullaires dans la prolifération des MMC [515]. Ils ont montré une interaction directe des adipocytes de MO avec les MMC,

ce qui favorise la prolifération, la survie et la migration des cellules de myélome au même titre que les BMSC [515]. Cependant cette contribution des adipocytes dans l'environnement médullaire n'est majoritaire qu'au début de la maladie de MM puisque les cellules graisseuses tendent à diminuer significativement avec l'évolution de la maladie [516] à cause des réorganisations de l'environnement tumoral engendrées par les MMC. Toutefois, même si le nombre des adipocytes diminue en fonction de la progression de la maladie, les adipocytes semblent avoir un rôle durant cette pathologie à travers la sécrétion d'adipokines. En plus de sécréter des facteurs de croissances qui sont déjà produits par les cellules stromales tels que l'IL-6, le VEGF, le FGF-2 et le TNF-α, les cellules adipocytaires produisent la leptine et l'adiponectine [515]. Caers *et al.* ont montré une modeste prolifération des MMC en présence de leptine. Le récepteur de la leptine (OB-R) est exprimé par les cellules de MM. De plus, les MMC de patients ayant une faible expression d'OB-R tendent à avoir une meilleure survie que ceux ayant une expression forte d'OB-R (non significatif mais $P = .09$) [515].

Dans le MM, les taux sériques de ces 2 adipokines sont dérégulées : le taux d'adiponectine est diminué et celui de leptine est augmenté, ce qui révèle un rôle des adipocytes dans la modification du métabolisme et de la croissance des cellules de MM à travers les adipokines. Il est à noter que l'adiponectine jouerait un rôle de protection des MMC, d'ailleurs le faible taux d'adiponectine a été associé à un risque élevé de MM [517]. Ces données suggèrent un rôle des adipocytes qu'ils soient médullaires ou extramédullaires dans la prolifération des MMC, néanmoins peu de choses sont connues et ces mécanismes devraient être plus largement explorés.

Quel est le rôle dans le MM de la régulation réciproque adipocytes/ostéoblastes ?

Ces modifications de production de cytokines par les adipocytes n'ont pas que des répercutions sur les plasmocytes myélomateux mais également sur l'os. Tout comme les BMSC, les adipocytes médullaires devraient jouer un rôle sur les ostéoclastes et les ostéoblastes *via* les facteurs de croissance sécrétés en communs.

De plus, les adipocytes sont également impliqués dans la régulation de l'os *via* la leptine. En effet, Ducy *et al.* ont démontré que la leptine inhibait la formation de l'os indirectement *via* le système nerveux central : la leptine n'a pas d'effet direct sur les ostéoblastes [518]. Cette régulation se fait à 2 niveaux : l'activation d'OB-R *via* la leptine au niveau de l'hypothalamus engendre la stimulation des récepteurs β-

adrénergiques des ostéoblastes [519] qui va conduire au blocage de leur prolifération et à la production augmentée de RANKL, ce qui va entraîner une diminution de la formation de l'os et une augmentation de la résorption osseuse [520]. En raison du taux de leptine augmenté dans le MM, ces données supposeraient que la leptine pourrait être impliquée dans l'inhibition de la formation de l'os, d'autant plus que la relation entre le taux circulant de leptine et la formation de l'os a été établie [521].
Même si les adipocytes impliqués dans la production sérique de la leptine ne sont majoritairement pas les adipocytes du microenvironnement tumoral, les adipocytes médullaires pourraient être directement concernés dans l'inhibition des ostéoblastes. En effet, l'adiponectine est un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse et favorise la croissance des ostéoblastes ainsi que leur différenciation [522,523]. Le taux d'adiponectine diminué dans le MM pourrait donc entraîner l'effet inverse.
Ces données montrent un rôle des adipocytes dans la régulation de l'os qui pourrait être impliqué dans les lyses osseuses caractéristiques du MM.

Il est à noter qu'il existe également une relation réciproque c'est-à-dire une régulation des ostéoblastes sur les adipocytes et notamment sur le métabolisme énergétique [524]. En effet, Lee *et al.* ont démontré que les ostéoblastes produisaient de l'ostéocalcine qui, à l'état non carboxylé (dernière étape de modification post-transcritionnelle altérée) entraîne une augmentation de la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes et d'insuline par les cellules β du pancréas, ce qui améliore la réponse à l'insuline et donc le métabolisme glucidique [524]. A l'inverse, la souris KO pour l'ostéocalcine ($ocn^{-/-}$) montre un taux d'adiponectine diminué ainsi qu'une hyperglycémie et une insulinorésistance. En raison des faibles taux sériques d'adiponectine et d'ostéocalcine dans le MM, il pourrait être envisagé que la diminution de l'expression de l'ostéocalcine est impliquée dans la baisse du taux d'adiponectine, d'autant plus que la faible concentration sérique d'ostéocalcine a été associée à la présence de lyses osseuses [525].
Comme nous l'avons évoqué, il existe une régulation étroite et réciproque entre le métabolisme énergétique et le remodelage osseux et plus particulièrement entre les adipocytes et les ostéoblastes. Rappelons que ces 2 types cellulaires sont issus du même précurseur que sont les cellules souches mésenchymateuses (MSC : mesenchymal stem cell) [526].

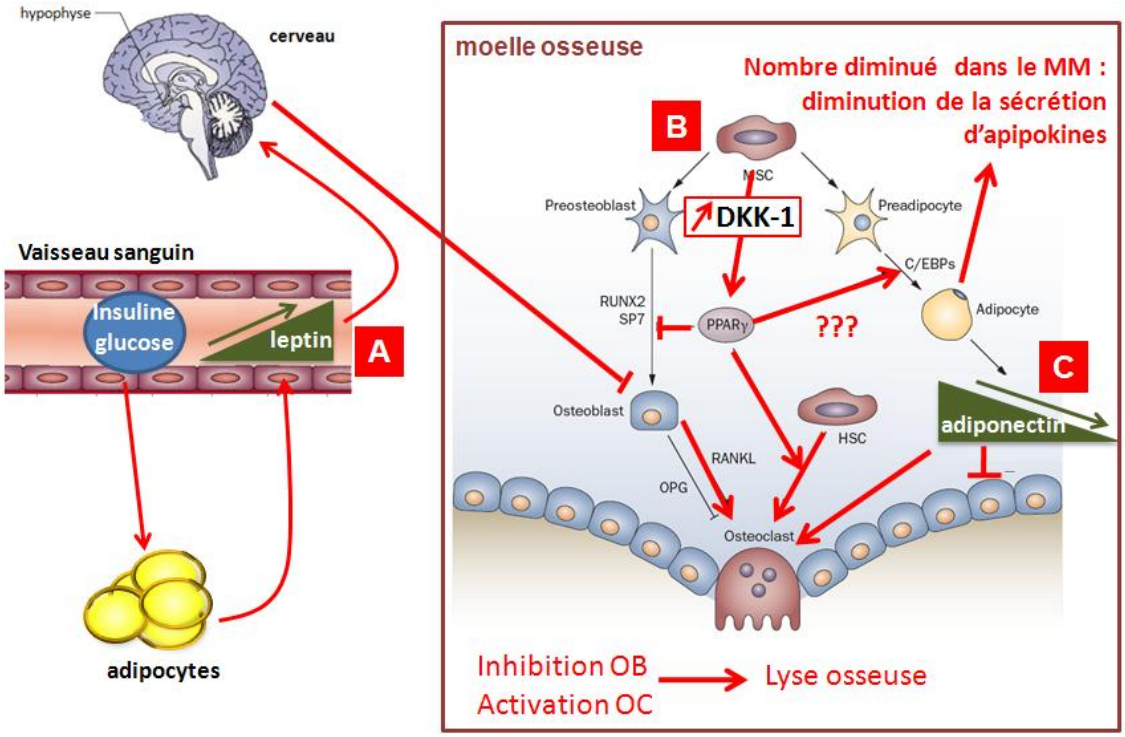
Des études ont montré qu'il y avait une relation étroite inverse entre l'adipogenèse et l'ostéoblastogenèse dans la moelle osseuse, conduisant au concept que l'inhibition de l'adipogenèse pourrait favoriser la formation osseuse [527,528]. En effet, l'activation du récepteur nucléaire PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) favorise l'adipogenèse et inhibe l'ostéoblastogenèse des MSC [529]. Il s'est avéré que l'utilisation clinique d'un agoniste de PPARγ (les thiazolidinediones) dans le traitement du diabète de type 2 (potentialise la réponse des cellules à l'insuline) a démontré une perte de la masse osseuse due à une augmentation du nombre des adipocytes en dépit d'une diminution du nombre des ostéoblastes [530]. De plus, l'activation de PPARγ a également été décrit comme inducteur de l'ostéoclastogenèse dans un modèle de souris, ce qui aggraverait le phénomène et expliquerait que les patients diabétiques traités avec les thiazolidinediones ont un risque augmenté de fracture osseuse [531].

Le rôle majeur de PPARγ dans le contrôle de la balance entre l'adipogenèse et l'ostéoblastogenèse ainsi que dans l'ostéoclastogenèse suggèrent que les PPARγ sont une cible prometteuse dans les pathologies osseuses notamment dans le MM. Ces données seraient en accord avec les études faites sur la voie Wnt qui montrent un rôle contradictoire des ligands de Wnt dans le MM. En effet, Il est décrit que l'activation de la voie Wnt inhibe les PPARγ et donc permet la réaction inverse c'est-à-dire induit l'ostéoblastogenèse et inhibe l'adipogenèse. Comme signalé dans l'introduction, l'activation de Wnt3a induit la formation des lésions osseuses mais à l'inverse favorise la prolifération des MMC dans des sites extraosseux [167,168]. De la même manière, l'inhibition de PPARγ devrait être bénéfique pour le remodelage osseux mais pourrait activer la prolifération des MMC puisque les thiazolidinediones entraînent l'arrêt du cycle et l'apoptose des lignées de MM [532,533].

Cependant, il faut également remarqué que le contrôle de la balance entre l'adipogenèse et l'ostéoblastogenèse dans le MM doit être altéré puisque les 2 populations sont diminuées dans cette pathologie. Cela montre que d'autres événements rentrent en jeu notamment la présence des MMC qui perturbent l'environnement médullaire. En effet, il est décrit que les MSC de patients atteints de MM (MSC-MM) ont un phénotype différent des MSC de donneurs dû à la présence d'anomalies cytogénétiques [534]. Ces MSC-MM surexpriment également DKK1, l'inhibiteur de la voie Wnt par rapport aux MSC de donneurs, ce qui conduit à un

blocage de l'ostéoblastogenèse [535] et en parallèle favorise l'augmentation des ostéoclastes et donc l'apparition des lyses osseuses [253]. Une question est de savoir pourquoi dans le MM, le blocage de l'ostéoblastogenèse des MSC ne conduit pas à une augmentation de l'adipogenèse, étant donné que le nombre des cellules graisseuses est réduit dans cette pathologie. Les MSC-MM pourraient avoir une fonction altérée due à des modifications de leur phénotype par rapport à celui des sujets normaux. De plus, les adipocytes médullaires ont la propriété de remplir les cavités de la MO non occupées [536]. De ce fait, nous pouvons supposer que la différentiation des adipocytes est bloquée dans le MM au détriment de l'augmentation d'autres populations telles que les MMC et les cellules endothéliales (Figure 15).

Figure 15 : Rôle éventuel des adipocytes dans le MM. Les adipocytes sécrètent des adipokines telles que la leptine et l'adiponectine qui pourraient avoir un rôle dans les lyses osseuses. (A) Dans le MM, il y a une augmentation sérique de la leptine. Cette production de leptine par les adipocytes (en réponse à l'insuline ou au glucose) pourrait inhiber l'ostéoblastogenèse et activer l'ostéoclastogenèse via RANKL. Cet effet passerait indirectement via le système nerveux central. Les PPARγ, le contrôle de la balance adipogenèse/ostéoblastogenèse [537], pourraient également être responsables de la dimininution des ostéoblastes. (B) En effet, le précurseur commun des adipocytes et des ostéoblastes, la MSC surexpriment DKK-1 lorsqu'elles sont présentes dans l'environnement médullaire myélomateux, ce qui peut résulter à l'activation des PPARγ et donc à une différentiation des MSC en faveur d'une adipogenèse (au détriment d'une ostéoblastogenèse). Cette induction des PPARγ peut aussi favoriser l'activation des ostéoclastes. Dans le MM, la diminution des adipocytes en comparaison à des sujets sains pourrait être expliquée par un blocage de l'adipogenèse dû au manque de place et donc à une diminution de la sécrétion des adipokines. (C) L'adiponectine, dont le taux est diminuée dans le MM, n'exerceraient plus alors son rôle d'inhibiteur des ostéoclastes.



Quel est le rôle des MSC dans la niche myélomateuse ?

En plus d'être le précuseur des ostéoblastes et des adipocytes, les MSC peuvent également se différencier en cellules réticulaires [538]. Comme il a été brièvement mentionné dans l'introduction, les CSH sont en contact avec les ostéoblastes (niche ostéoblastique) qui les maintiennent dans un état quiescent et jouent un rôle dans l'autorenouvellement de ces cellules. Dans un état plus différencié, ces CSH sont près des sinusoides grâce à des interactions avec les cellules réticulaires riches en SDF-1α (niche vasculaire). Il en résulte que les MSC sont des acteurs importants de la niche hématopoiétique [539]. Tokoyoda et *al.* ont décrit que les cellules plasmocytaires partagent la même niche médullaire que les CSH en interagissant avec ces cellules réticulaires exprimant SDF-1α et VCAM-1 [540]. Au même titre que les plasmocytes, les cellules de MM adhèrent aux cellules stromales grâce à SDF-1α et VCAM-1, il serait donc interessant de comparer la niche plasmocytaire de patients atteints de MM par rapport à des sujets sains afin de déterminer l'existence d'une niche plasmocytaire myélomateuse éventuelle. Il serait également très interessant d'étudier les cellules stromales et plus particulièrement les cellules réticulaires dans la niche plasmocytaire normale et tumorale. De plus, Sacchetti et al. ont montré l'importance des cellules réticulaires dans l'angiogenèse [207]. Dans la pathologie du MM, quel est l'importance des cellules réticulaires dans la mise en place de l'angiogenèse tumorale ?

En conclusion, ce travail de thèse a permis de démontrer un rôle majeur du système IGF-1/insuline à travers l'IGF-1R et le récepteur hybride IGF-1R/INSR dans la prolifération et la survie des cellules de MM. Un inhibiteur ciblant les 2 formes de récepteurs (IGF-1R et Hybrid-R) serait donc une cible prometteuse dans le traitement du MM. Etant donné le rôle majeur de l'insuline dans le métabolisme glucidique et l'existence de la régulation réciproque entre le métabolisme glucidique et le remodelage osseux, il serait très intéressant d'étudier la fonction du récepteur homodimérique de l'INSR dans les cellules de MM ainsi que dans les cellules de l'environnement médullaire, notamment les ostéoblastes.

Bibliographie

1. Vescio RA, Cao J, Hong CH, et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. J Immunol. 1995;155:2487-2497.
2. Ralph QM, Brisco MJ, Joshua DE, Brown R, Gibson J, Morley AA. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene. Blood. 1993;82:202-206.
3. Kuipers J, Vaandrager JW, Weghuis DO, et al. 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. 1999;109:99-107.
4. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. Blood. 2005.
5. Hallek M, Leif Bergsagel P, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood. 1998;91:3-21.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2002;346:564-569.
7. Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. Blood. 1994;83:3654-3663.
8. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res. 2004;64:1546-1558.
9. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. Leukemia. 2009.
10. Avet-Loiseau H, Li JY, Facon T, et al. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. Cancer Res. 1998;58:5640-5645.
11. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, et al. Frequent Dysregulation of the c-maf Proto-Oncogene at 16q23 by Translocation to an Ig Locus in Multiple Myeloma. Blood. 1998;91:4457-4463.
12. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat Rev Cancer. 2002;2:175-187.
13. Flactif M, Zandecki M, Lai JL, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. Leukemia. 1995;9:2109-2114.
14. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood. 2004;104:607-618.
15. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, et al. 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. 1999;59:4546-4550.
16. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. Blood. 2005;106:2156-2161.
17. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. Immunol Rev. 2003;194:96-104.

18. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. Blood. 2005;106:296-303.
19. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene. 2001;20:5611-5622.
20. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol. 2003;121:749-757.
21. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. Blood. 2002;99:2185-2191.
22. Fonseca R, Oken MM, Greipp PR. 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. 2001;98:1271-1272.
23. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. Blood. 2003;102:2562-2567.
24. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, et al. 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. 2000;97:228-233.
25. Nobuyoshi M, Kawano M, Tanaka H, et al. Increased expression of the c-myc gene may be related to the aggressive transformation of human myeloma cells. Br J Haematol. 1991;77:523-528.
26. Liu P, Leong T, Quam L, et al. 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. 1996;88:2699-2706.
27. Corradini P, Ladetto M, Inghirami G, Boccadoro M, Pileri A. N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. LeukLymphoma. 1994;15:17-20.
28. Chesi M, Brents LA, Ely SA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. Blood. 2001;97:729-736.
29. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. Cancer Cell. 2007;12:115-130.
30. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. Cancer Cell. 2007;12:131-144.
31. Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. Leukemia. 1994;8:1280-1284.
32. Juge Morineau N, Mellerin MP, Francois S, et al. High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells. BrJHaematol. 1995;91:664-667.
33. Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E, Maiolo AT. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. Blood. 1993;81:128-135.
34. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. Blood. 1998;92:802-809.
35. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. Blood. 2007;109:3489-3495.

36. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. Blood. 2006;108:1724-1732.
37. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. Hematology. 2005;10 Suppl 1:117-126.
38. Ge NL, Rudikoff S. Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth in vivo. Oncogene. 2000;19:4091-4095.
39. Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, et al. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Blood. 2001;97:822-825.
40. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. Blood. 2006;108:2020-2028.
41. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. 2007;20:571-596.
42. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer. 1975;36:842-854.
43. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2005;23:3412-3420.
44. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. NEnglJ Med. 1996;335:91-97.
45. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia. 2006;20:1467-1473.
46. Chee CE, Kumar S, Larson DR, et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. Blood. 2009.
47. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. Blood. 2009.
48. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. Blood. 2000;96:2943-2950.
49. Anderson KC. Lenalidomide and Thalidomide: Mechanisms of Action--Similarities and Differences. Seminars in Hematology. 2005;42:S3-S8.
50. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Cancer Res. 2001;61:3071-3076.
51. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR. Phase III Clinical Trial of Thalidomide Plus Dexamethasone Compared With Dexamethasone Alone in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Clinical Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol. 2006;24:431-436.
52. Wang M, Dimopoulos MA, Chen C, et al. Lenalidomide plus dexamethasone is more effective than dexamethasone alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma regardless of prior thalidomide exposure. Blood. 2008;112:4445-4451.
53. Harousseau JL, Attal M, Leleu X, et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. Haematologica. 2006;91:1498-1505.

54. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Superior Complete Response Rate and Progression-Free Survival after Autologous Transplantation with up-Front Velcade-Thalidomide- Dexamethasone Compared with Thalidomide-Dexamethasone in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. ASH Annual Meeting Abstracts. 2008;112:158-.
55. Richardson P, Lonial, S., Jakubowiak, A., Jagannath,S., Raje, N. S., Avigan, D., Ghobrial, I. M., Schlossman, R. L., Mazumder, A., Munshi, N. C., Vesole, D. H., Joyce, R., Doss, D., Warren, D. L., Hayes, S. W., Kaster, S., Delaney, C., Lauria, M., Mitsiades, C., Hideshima, T., Knight, R. D., Esseltine, D. L., Anderson, K.C. Safety and efficacity of lenalidomide , bortezomib, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma : a phase I/II study. Proc Am Soc Clin Oncol. 2008;26:8520 (abstract).
56. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. N Engl J Med. 2008;359:906-917.
57. Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. Ann Intern Med. 1986;105:8-11.
58. Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. N Engl J Med. 1984;310:1353-1356.
59. Vesole DH, Crowley JJ, Catchatourian R, et al. High-dose melphalan with autotransplantation for refractory multiple myeloma: results of a Southwest Oncology Group phase II trial. J Clin Oncol. 1999;17:2173-2179.
60. Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, et al. High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. Blood. 1987;70:869-872.
61. Lee CK, Barlogie B, Zangari M, et al. Transplantation as salvage therapy for high-risk patients with myeloma in relapse. Bone Marrow Transplant. 2002;30:873-878.
62. Fermand JP, Ravaud P, Chevret S, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. Blood. 1998;92:3131-3136.
63. Maloney DG, Molina AJ, Sahebi F, et al. Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. Blood. 2003;102:3447-3454.
64. Lee C-K, Barlogie B, Munshi N, et al. DTPACE: An Effective, Novel Combination Chemotherapy With Thalidomide for Previously Treated Patients With Myeloma. J Clin Oncol. 2003;21:2732-2739.
65. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med. 2007;357:2123-2132.
66. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. N Engl J Med. 2005;352:2487-2498.
67. Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A, et al. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. Leukemia. 2009.
68. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. Blood. 2007;110:3557-3560.
69. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. Blood. 2002;7:7.
70. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. Nat Rev Immunol. 2008;8:290-301.

71. Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A, Teixido J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. Blood. 2001;97:346-351.
72. Francisco S-R, Natividad R-V, Dora P-S, Joaquin T. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. British Journal of Haematology. 1999;107:825-834.
73. Ahsmann EJ, Benschop RJ, de Gruyl TD, Faber JA, Lokhorst HM, Bloem AC. A novel flow cytometric assay for the quantification of adhesion of subsets within a heterogeneous cell population; analysis of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)-mediated binding of bone marrow-derived primary tumour cells of patients with multiple myeloma. Clin Exp Immunol. 1993;93:456-463.
74. Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. Blood. 1993;81:767-774.
75. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. Adhesion-Mediated Intracellular Redistribution of c-Fas-Associated Death Domain-Like IL-1-Converting Enzyme-Like Inhibitory Protein-Long Confers Resistance to CD95-Induced Apoptosis in Hematopoietic Cancer Cell Lines. J Immunol. 2002;168:2544-2553.
76. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. Blood. 1999;93:1658-1667.
77. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). Oncogene. 2000;19:4319-4327.
78. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. Nature. 1988;332:83-85.
79. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. Blood. 1989;73:517-526.
80. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. Blood. 1995;85:863-872.
81. Urashima M, Chauhan D, Uchiyama H, Freeman GJ, Anderson KC. CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. Blood. 1995;85:1903-1912.
82. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. Leukemia. 2001;15:1950-1961.
83. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. Oncogene. 2001;20:4519-4527.
84. Costes V, Portier M, Lu ZY, Rossi JF, Bataille R, Klein B. Interleukin-1 in multiple myeloma: producer cells and their role in the control of IL-6 production. BrJ Haematol. 1998;103:1152-1160.
85. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. J Biol Chem. 2002;277:16639-16647.
86. Dankbar B, Padro T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. Blood. 2000;95:2630-2636.
87. Bisping G, Leo R, Wenning D, et al. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. Blood. 2003;101:2775-2783.
88. Jourdan M, Veyrune JL, Vos JD, Redal N, Couderc G, Klein B. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. Oncogene. 2003;22:2950-2959.

89. Neumann C, Zehentmaier G, Danhauser-Riedl S, Emmerich B, Hallek M. Interleukin-6 induces tyrosine phosphorylation of the Ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 in the human multiple myeloma cell line LP-1. EurJ Immunol. 1996;26:379-384.
90. Ogata A, Chauhan D, Teoh G, et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. JImmunol. 1997;159:2212-2221.
91. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity. 1999;10:105-115.
92. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. Oncogene. 2001;20:5991-6000.
93. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, et al. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. Blood. 2002;99:2172-2178.
94. Li FJ, Tsuyama N, Ishikawa H, et al. A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in myeloma. Blood. 2005;105:3295-3302.
95. Zhang XG, Gu ZJ, Lu ZY, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inbitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. JExpMed. 1994;179:1337-1342.
96. Zhang XG, Bataille R, Widjenes J, Klein B. Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasias. Cancer. 1992;69:1373-1376.
97. Jourdan M, Mahtouk K, Veyrune JL, et al. Delineation of the roles of paracrine and autocrine interleukin-6 (IL-6) in myeloma cell lines in survival versus cell cycle. A possible model for the cooperation of myeloma cell growth factors. Eur Cytokine Netw. 2005;16:57-64.
98. Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, et al. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. Blood. 1991;78:1198-1204.
99. Bataille R, Barlogie B, Lu ZY, et al. Biologic effects of anti-interleukin-6 (IL-6) murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. Blood. 1995;86:685-691.
100. Lu ZY, Brailly H, Wijdenes J, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Measurement of whole body interleukin-6 (IL-6) production: prediction of the efficacy of anti-IL-6 treatments. Blood. 1995;86:3123-3131.
101. Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. JClinInvest. 1989;84:2008-2011.
102. Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, et al. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. EurJImmunol. 1993;23:820-824.
103. Ludwig H, Nachbaur DM, Fritz E, Krainer M, Huber H. Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma [letter]. Blood. 1991;77:2794-2795.
104. Bataille R, Klein B. C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. Arthritis Rheum. 1992;35:982-984.
105. Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie B, Pileri A. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. Blood. 1992;80:733-737.
106. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. Cancer Res. 1999;59:728-733.
107. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G, et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. Haematologica. 2000;85:800-805.

108. Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. Br J Cancer. 1999;79:451-455.
109. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic Value of Bone Marrow Angiogenesis in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2000;6:3111-3116.
110. Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. Blood. 2001;98:428-435.
111. Podar K, Tai Y-T, Lin BK, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-induced Migration of Multiple Myeloma Cells Is Associated with beta 1 Integrin- and Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent PKCalpha Activation. J Biol Chem. 2002;277:7875-7881.
112. Le Gouill S, Podar K, Amiot M, et al. VEGF induces MCL-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. Blood. 2004.
113. Lin B, Podar K, Gupta D, et al. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. Cancer Res. 2002;62:5019-5026.
114. Podar K, Catley LP, Tai Y-T, et al. GW654652, the pan-inhibitor of VEGF receptors, blocks the growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. Blood. 2004;103:3474-3479.
115. Podar K, Tonon G, Sattler M, et al. The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103:19478-19483.
116. Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, Brochier J, Rossi JF, Klein B. Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. EurCytokineNetw. 1999;10:65-70.
117. Lichtenstein A, Berenson J, Norman D, Chang MP, Carlile A. Production of cytokines by bone marrow cells obtained from patients with multiple myeloma. Blood. 1989;74:1266-1273.
118. Filella X, Blade J, Guillermo AL, Molina R, Rozman C, Ballesta AM. Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. Cancer Detect Prev. 1996;20:52-56.
119. Blade J, Filella X, Montoto S, et al. Interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha serum levels in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol. 2002;117:387-389.
120. Bang S, Jeong EJ, Kim IK, Jung YK, Kim KS. Fas- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction. A typical model for convergent signal transduction. J Biol Chem. 2000;275:36217-36222.
121. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. J Exp Med. 1998;188:211-216.
122. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. Oncogene. 2003;22:2417-2421.
123. Jelinek DF, Aagaard-Tillery KM, Arendt BK, Arora T, Tschumper RC, Westendorf JJ. Differential human multiple myeloma cell line responsiveness to interferon-alpha. Analysis of transcription factor activation and interleukin 6 receptor expression. JClinInvest. 1997;99:447-456.
124. Jourdan M, Zhang XG, Portier M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. IFN-alpha induced autocrine production of IL-6 in myeloma cell lines. JImmunol. 1991;147:4402-4407.

125. Ferlin-Bezombes M, Jourdan M, Liautard J, Brochier J, Rossi JF, Klein B. IFN-alpha is a survival factor for human myeloma cells and reduces dexamethasone-induced apoptosis. J Immunol. 1998;161:2692-2699.
126. Schwabe M, Brini AT, Bosco MC, et al. Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 growth loop in IL-6-dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta-chains. J Clin Invest. 1994;94:2317-2325.
127. Anthes JC, Zhan Z, Gilchrest H, Egan RW, Siegel MI, Billah MM. Interferon-alpha down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266. Biochem J. 1995;309 (Pt 1):175-180.
128. Arora T, Jelinek DF. Differential myeloma cell responsiveness to interferon-alpha correlates with differential induction of p19(INK4d) and cyclin D2 expression. JBiolChem. 1998;273:11799-11805.
129. Blade J, San Miguel JF, Escudero ML, et al. Maintenance treatment with interferon alpha-2b in multiple myeloma: a prospective randomized study from PETHEMA (Program for the Study and Treatment of Hematological Malignancies, Spanish Society of Hematology). Leukemia. 1998;12:1144-1148.
130. Sawamura M, Murayama K, Ui G, et al. Plasma cell leukaemia with alpha-interferon therapy in myeloma. Br J Haematol. 1992;82:631.
131. Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Sundan A, Waage A. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. Blood. 1996;88:3998-4004.
132. Seidel C, Borset M, Turesson I, Abildgaard N, Sundan A, Waage A. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. The Nordic Myeloma Study Group. Blood. 1998;91:806-812.
133. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, Kandidaki E, Roussou P, Kyriakou DS. Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma: Correlation with markers of disease activity. American Journal of Hematology. 2003;72:229-233.
134. Takai K, Hara J, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. Blood. 1997;89:1560-1565.
135. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. Blood. 2002;99:1405-1410.
136. Derksen PW, de Gorter DJ, Meijer HP, et al. The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. Leukemia. 2003;17:764-774.
137. Tjin EP, Derksen PW, Kataoka H, et al. Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator

Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells

The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma

Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. Blood. 2004;101:6122-6127.

138. Hov H, Holt RU, Ro TB, et al. A Selective c-Met Inhibitor Blocks an Autocrine Hepatocyte Growth Factor Growth Loop in ANBL-6 Cells and Prevents Migration and Adhesion of Myeloma Cells. Clin Cancer Res. 2004;10:6686-6694.
139. Holt RU, Baykov V, Ro TB, et al. Human myeloma cells adhere to fibronectin in response to hepatocyte growth factor. Haematologica. 2005;90:479-488.
140. Håkon H, Erming T, Toril H, et al. c-Met signaling promotes IL-6-induced myeloma cell proliferation. European Journal of Haematology. 2009;82:277-287.

141. Du W, Hattori Y, Yamada T, et al. NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells: molecular targeting of angiogenic growth factor. Blood. 2007;109:3042-3049.
142. De Vos J, Couderc G, Tarte K, et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. Blood. 2001;98:771-780.
143. Mahtouk K, Jourdan M, De Vos J, et al. An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis. Blood. 2004;103:1829-1837.
144. Mahtouk K, Hose D, Reme T, et al. Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. Oncogene. 2005;24:3512-3524.
145. Mahtouk K, Cremer FW, Reme T, et al. Heparan sulphate proteoglycans are essential for the myeloma cell growth activity of EGF-family ligands in multiple myeloma. Oncogene. 2006;25:7180-7191.
146. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu Rev Immunol. 2003;21:231-264.
147. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. J Immunol. 2008;180:3655-3659.
148. Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. Blood. 2004;103:3148-3157.
149. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. Blood. 2004;103:689-694.
150. Yaccoby S, Pennisi A, Li X, et al. Atacicept (TACI-Ig) inhibits growth of TACI(high) primary myeloma cells in SCID-hu mice and in coculture with osteoclasts. Leukemia. 2008;22:406-413.
151. Rossi JF, Moreaux J, Hose D, et al. Atacicept in relapsed/refractory multiple myeloma or active Waldenstrom's macroglobulinemia: a phase I study. Br J Cancer. 2009;101:1051-1058.
152. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, et al. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. Mol Cancer Ther. 2002;1:539-544.
153. Wright N, de Lera TL, Garcia-Moruja C, et al. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. Blood. 2003;102:1978-1984.
154. Martin SK, Dewar AL, Farrugia AN, et al. Tumor Angiogenesis Is Associated with Plasma Levels of Stromal-Derived Factor-1{alpha} in Patients with Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2006;12:6973-6977.
155. Zannettino AC, Farrugia AN, Kortesidis A, et al. Elevated serum levels of stromal-derived factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease in multiple myeloma patients. Cancer Res. 2005;65:1700-1709.
156. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. Blood. 2007;109:2708-2717.
157. Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, et al. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. Blood. 2009;113:4341-4351.
158. Jundt F, Probsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. Blood. 2004;103:3511-3515.

159. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. Blood. 2004;103:3503-3510.
160. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. Blood. 2004;104:3697-3704.
161. Ghoshal P, Nganga AJ, Moran-Giuati J, et al. Loss of the SMRT/NCoR2 Corepressor Correlates with JAG2 Overexpression in Multiple Myeloma. Cancer Res. 2009;69:4380-4387.
162. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. Blood. 2008;111:2220-2229.
163. Schwarzer R, Kaiser M, Acikgoez O, et al. Notch inhibition blocks multiple myeloma cell-induced osteoclast activation. Leukemia. 2008;22:2273-2277.
164. Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, et al. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:6122-6127.
165. Yasui H, Hideshima T, Ikeda H, et al. Novel etodolac analog SDX-308 (CEP-18082) induces cytotoxicity in multiple myeloma cells associated with inhibition of beta-catenin/TCF pathway. Leukemia. 2007;21:535-540.
166. Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, et al. Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:7516-7521.
167. Edwards CM, Edwards JR, Lwin ST, et al. Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone in vivo. Blood. 2008;111:2833-2842.
168. Qiang Y-W, Shaughnessy JD, Jr., Yaccoby S. Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth. Blood. 2008;112:374-382.
169. Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. Blood. 1999;93:3064-3073.
170. Otsuki T, Yamada O, Yata K, et al. Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(q16.3;q32. 3) and FGFR3 translocation [In Process Citation]. IntJ Oncol. 1999;15:1205-1212.
171. Chesi M, Nardini E, Brents LA, et al. 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. NatGenet. 1997;16:260-264.
172. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood. 2003;101:1520-1529.
173. Paterson JL, Li Z, Wen XY, et al. Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. Br J Haematol. 2004;124:595-603.
174. Trudel S, Ely S, Farooqi Y, et al. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. Blood. 2004;103:3521-3528.
175. Trudel S, Li ZH, Wei E, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. Blood. 2005;105:2941-2948.
176. Grand EK, Chase AJ, Heath C, Rahemtulla A, Cross NC. Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074. Leukemia. 2004;18:962-966.

177. Chen J, Lee BH, Williams IR, et al. FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. Oncogene. 2005;24:8259-8267.
178. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, et al. Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. Blood. 1996;87:1928-1938.
179. Hayashi T, Hideshima T, Nguyen AN, et al. Transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. Clin Cancer Res. 2004;10:7540-7546.
180. Pappa C, Miyakis S, Tsirakis G, et al. Serum levels of Interleukin-15 and Interleukin-10 and their correlation with proliferating cell nuclear antigen in multiple myeloma. Cytokine. 2007;37:171-175.
181. Henrik H-H, Anders W, Magne B. Interleukin-15 blocks apoptosis and induces proliferation of the human myeloma cell line OH-2 and freshly isolated myeloma cells. British Journal of Haematology. 1999;106:28-34.
182. Tinhofer I, Marschitz I, Henn T, Egle A, Greil R. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. Blood. 2000;95:610-618.
183. Brenne AT, Baade Ro T, Waage A, Sundan A, Borset M, Hjorth-Hansen H. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. Blood. 2002;99:3756-3762.
184. Menoret E, Maiga S, Descamps G, et al. IL-21 Stimulates Human Myeloma Cell Growth through an Autocrine IGF-1 Loop. J Immunol. 2008;181:6837-6842.
185. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 b receptor components. Science. 1994;263:92-95.
186. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Jr., Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. Science. 1995;267:1349-1353.
187. De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. BrJHaematol. 2000;109:823-828.
188. Pedranzini L, Dechow T, Berishaj M, et al. Pyridone 6, A Pan-Janus-Activated Kinase Inhibitor, Induces Growth Inhibition of Multiple Myeloma Cells. Cancer Res. 2006;66:9714-9721.
189. Burger R, Le Gouill S, Tai Y-T, et al. Janus kinase inhibitor INCB20 has antiproliferative and apoptotic effects on human myeloma cells in vitro and in vivo. Molecular Cancer Therapeutics. 2009;8:26-35.
190. Hamasaki M, Hideshima T, Tassone P, et al. Azaspirane (N-N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. Blood. 2005;105:4470-4476.
191. Amit-Vazina M, Shishodia S, Harris D, et al. Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. Br J Cancer. 2005;93:70-80.
192. Tassone P, Neri P, Carrasco DR, et al. A clinically relevant SCID-hu in vivo model of human multiple myeloma. Blood. 2005;106:713-716.
193. Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. Cancer Res. 2000;60:6763-6770.
194. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. Nat Rev Cancer. 2002;2:927-937.
195. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. Oncogene. 2002;21:5673-5683.

196. Klein B, Tarte K, Jourdan M, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. Int J Hematol. 2003;78:106-113.
197. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18:509-524.
198. Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. Blood. 2006;107:4053-4062.
199. Shi Y, Gera J, Hu L, et al. Enhanced Sensitivity of Multiple Myeloma Cells Containing PTEN Mutations to CCI-779. Cancer Res. 2002;62:5027-5034.
200. Frost P, Moatamed F, Hoang B, et al. In vivo antitumor effects of the mTOR inhibitor CCI-779 against human multiple myeloma cells in a xenograft model. Blood. 2004;104:4181-4187.
201. Farag SS, Zhang S, Jansak BS, et al. Phase II trial of temsirolimus in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. Leuk Res. 2009.
202. Tai YT, Fulciniti M, Hideshima T, et al. Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis. Blood. 2007;110:1656-1663.
203. Breitkreutz I, Raab MS, Vallet S, et al. Targeting MEK1/2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma. Br J Haematol. 2007;139:55-63.
204. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat Immunol. 2002;3:221-227.
205. Jourdan M, Moreaux J, Vos JD, et al. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. Br J Haematol. 2007.
206. Hideshima T, Neri P, Tassone P, et al. MLN120B, a Novel I{kappa}B Kinase {beta} Inhibitor, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth In vitro and In vivo. Clin Cancer Res. 2006;12:5887-5894.
207. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007;131:324-336.
208. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. BrJ Haematol. 1994;87:503-508.
209. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1995;1:149-153.
210. Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. J Clin Invest. 1996;98:1949-1953.
211. Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. Haematologica. 2003;88:176-185.
212. Uneda S, Matsuno F, Sonoki T, Tniguchi I, Kawano F, Hata H. Expressions of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in myeloma cells. Haematologica. 2003;88:113-115.
213. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat Med. 2002;8:918-921.
214. Vacca A, Frigeri A, Ribatti D, et al. Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. Br J Haematol. 2001;113:415-421.
215. Cavallaro U, Liebner S, Dejana E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. Exp Cell Res. 2006;312:659-667.

216. Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. Thromb Haemost. 2001;86:23-33.
217. Seon BK. Expression of endoglin (CD105) in tumor blood vessels. Int J Cancer. 2002;99:310-311; author reply 312.
218. Vacca A, Ria R, Semeraro F, et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. Blood. 2003;102:3340-3348.
219. Ria R, Piccoli C, Cirulli T, et al. Endothelial Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Patients with Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2008;14:1678-1685.
220. Giuliani N, Colla S, Lazzaretti M, et al. Proangiogenic properties of human myeloma cells: production of angiopoietin-1 and its potential relationship to myeloma-induced angiogenesis. Blood. 2003;102:638-645.
221. Portier M, Zhang XG, Ursule E, et al. Cytokine gene expression in human multiple myeloma. BrJ Haematol. 1993;85:514-520.
222. Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A. Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. Blood. 2001;98:187-193.
223. Kumar S, Witzig TE, Timm M, et al. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. Blood. 2004;104:1159-1165.
224. Hose D, Moreaux J, Meissner T, et al. Induction of angiogenesis by normal and malignant plasma cells. Blood. 2009;114:128-143.
225. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V. Angiopoietin-1 and myeloma-induced angiogenesis. Leuk Lymphoma. 2005;46:29-33.
226. Khotskaya YB, Dai Y, Ritchie JP, et al. Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization and metastasis of myeloma tumors in vivo. J Biol Chem. 2009:M109.018473.
227. Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, et al. Thalidomide Downregulates Angiogenic Genes in Bone Marrow Endothelial Cells of Patients With Active Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2005;23:5334-5346.
228. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, et al. Bortezomib Mediates Antiangiogenesis in Multiple Myeloma via Direct and Indirect Effects on Endothelial Cells. Cancer Res. 2006;66:184-191.
229. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Human Myeloma Cell Growth in Vivo and Prolongs Survival in a Murine Model. Cancer Res. 2002;62:4996-5000.
230. Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL, Barlogie B, Choi Y, Epstein J. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. Br J Haematol. 2002;116:278-290.
231. Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. Cancer Res. 2003;63:287-289.
232. Dhodapkar MV, Singh J, Mehta J, et al. Anti-myeloma activity of pamidronate in vivo. Br J Haematol. 1998;103:530-532.
233. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. N Engl J Med. 1996;334:488-493.
234. Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y, Roodman GD. Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. Blood. 2001;97:3349-3353.

235. Masih-Khan E, Trudel S, Heise C, et al. MIP-1alpha (CCL3) is a downstream target of FGFR3 and RAS-MAPK signaling in multiple myeloma. Blood. 2006;108:3465-3471.
236. Choi SJ, Cruz JC, Craig F, et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. Blood. 2000;96:671-675.
237. Choi SJ, Oba Y, Gazitt Y, et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. J Clin Invest. 2001;108:1833-1841.
238. Oyajobi BO, Franchin G, Williams PJ, et al. Dual effects of macrophage inflammatory protein-1alpha on osteolysis and tumor burden in the murine 5TGM1 model of myeloma bone disease. Blood. 2003;102:311-319.
239. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998;93:165-176.
240. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:3540-3545.
241. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1998;12:1260-1268.
242. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature. 1999;397:315-323.
243. Farrugia AN, Atkins GJ, To LB, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. Cancer Res. 2003;63:5438-5445.
244. Heider U, Langelotz C, Jakob C, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2003;9:1436-1440.
245. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. Blood. 2001;98:3527-3533.
246. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:11581-11586.
247. Standal T, Seidel C, Hjertner O, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood. 2002;100:3002-3007.
248. Sordillo EM, Pearse RN. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. Cancer. 2003;97:802-812.
249. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. Blood. 2001;98:3534-3540.
250. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. Cancer. 2003;97:887-892.
251. Giuliani N, Colla S, Morandi F, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. Blood. 2005;106:2472-2483.
252. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, et al. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. J Biol Chem. 2000;275:25163-25172.
253. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. N Engl J Med. 2003;349:2483-2494.

254. Terpos E, Heath DJ, Rahemtulla A, et al. Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. Br J Haematol. 2006;135:688-692.
255. Oshima T, Abe M, Asano J, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. Blood. 2005;106:3160-3165.
256. Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. Blood. 2004;103:2308-2315.
257. Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, et al. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. Blood. 2005;106:1407-1414.
258. Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, et al. Interleukin-3 (IL-3) is overexpressed by T lymphocytes in multiple myeloma patients. Blood. 2006;107:841-842.
259. Giuliani N, Colla S, Sala R, et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. Blood. 2002;100:4615-4621.
260. Colucci S, Brunetti G, Rizzi R, et al. T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction. Blood. 2004;104:3722-3730.
261. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature. 2003;425:841-846.
262. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature. 2003;425:836-841.
263. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. Science. 2000;287:1427-1430.
264. Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell. 2004;116:769-778.
265. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 2007;7:585-598.
266. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. Adv Immunol. 2005;87:163-208.
267. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. Leukemia. 2009.
268. Mahtouk K, Hose D, De Vos J, et al. Input of DNA microarrays to identify novel mechanisms in multiple myeloma biology and therapeutic applications. Clin Cancer Res. 2007;13:7289-7295.
269. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. Blood. 2002;99:1745-1757.
270. De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. Oncogene. 2002;21:6848-6857.
271. De Vos J, Hose D, Reme T, et al. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. Immunol Rev. 2006;210:86-104.
272. Jourdan M, Reme T, Goldschmidt H, et al. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. Br J Haematol. 2009;145:45-58.
273. Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D, et al. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. Blood. 2004;103:1799-1806.
274. Davies FE, Dring AM, Li C, et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. Blood. 2003;102:4504-4511.

275. Croonquist PA, Linden MA, Zhao F, Van Ness BG. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. Blood. 2003;102:2581-2592.
276. Chauhan D, Li G, Auclair D, et al. Identification of Genes Regulated by 2-Methoxyestradiol (2ME2) in Multiple Myeloma (MM) Cells using Oligonucleotide Arrays. Blood. 2002;12:12.
277. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14374-14379.
278. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. Blood. 2003;101:2377-2380.
279. Chauhan D, Li G, Auclair D, et al. Identification of genes regulated by 2-methoxyestradiol (2ME2) in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. Blood. 2003;101:3606-3614.
280. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:540-545.
281. Neri P, Tagliaferri P, Di Martino MT, et al. In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. Br J Haematol. 2008;143:520-531.
282. Tassone P, Neri P, Burger R, et al. Combination therapy with interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 and dexamethasone induces antitumor effects in a novel SCID-hu In vivo model of human multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2005;11:4251-4258.
283. Burington B, Barlogie B, Zhan F, Crowley J, Shaughnessy JD, Jr. Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2008;14:4821-4829.
284. Corre J, Mahtouk K, Attal M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. Leukemia. 2007;21:1079-1088.
285. Ria R, Todoerti K, Berardi S, et al. Gene Expression Profiling of Bone Marrow Endothelial Cells in Patients with Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2009.
286. Ge Y, Zhan F, Barlogie B, Epstein J, Shaughnessy J, Jr., Yaccoby S. Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival. Br J Haematol. 2006;133:83-92.
287. Mahtouk K, Hose D, Raynaud P, et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. Blood. 2007;109:4914-4923.
288. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. Nat Rev Cancer. 2008;8:915-928.
289. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. Nat Rev Drug Discov. 2002;1:769-783.
290. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. Bioessays. 2004;26:1351-1362.
291. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. Cell Mol Life Sci. 2000;57:1050-1093.
292. Kornfeld S. Structure and Function of the Mannose 6-Phosphate/Insulinlike Growth Factor II Receptors. Annual Review of Biochemistry. 1992;61:307-330.
293. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:421-439.

294. Holly J, Perks C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. Neuroendocrinology. 2006;83:154-160.
295. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily. Endocr Rev. 1999;20:761-787.
296. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. J Biol Chem. 2002;277:39684-39695.
297. Slaaby R, Schaffer L, Lautrup-Larsen I, et al. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. J Biol Chem. 2006;281:25869-25874.
298. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-Specific Expression of Two Alternatively Spliced Insulin Receptor mRNAs in Man. Mol Endocrinol. 1989;3:1263-1269.
299. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414:799-806.
300. Le Roith D, Scavo L, Butler A. What is the role of circulating IGF-I? Trends Endocrinol Metab. 2001;12:48-52.
301. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev. 1995;16:143-163.
302. Clemmons DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. Nat Rev Drug Discov. 2007;6:821-833.
303. Meinbach DS, Lokeshwar BL. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? Urol Oncol. 2006;24:294-306.
304. Ferry RJ, Jr., Cerri RW, Cohen P. Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. Horm Res. 1999;51:53-67.
305. Firth SM, Baxter RC. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. Endocr Rev. 2002;23:824-854.
306. Dupont J, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. Horm Res. 2001;55 Suppl 2:22-26.
307. Workman P, Clarke PA, Guillard S, Raynaud FI. Drugging the PI3 kinome. Nat Biotechnol. 2006;24:794-796.
308. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. Clin Cancer Res. 2008;14:6364-6370.
309. Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. Endocr Rev. 2001;22:818-835.
310. Klammt J, Pfäffle R, Werner H, Kiess W. IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2008;19:197-205.
311. Mauvais-Jarvis F, Kulkarni RN, Kahn CR. Knockout models are useful tools to dissect the pathophysiology and genetics of insulin resistance. Clin Endocrinol (Oxf). 2002;57:1-9.
312. Accili D, Drago J, Lee EJ, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. Nat Genet. 1996;12:106-109.
313. Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, et al. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. Embo J. 1996;15:1542-1547.
314. Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, et al. Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:5137-5140.
315. Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, et al. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. Nat Genet. 1997;17:327-330.
316. Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic [beta] cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. Cell. 1995;83:69-78.

317. Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. Dev Biol. 1997;189:33-48.
318. Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. Diabetes. 1992;41:1473-1490.
319. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell. 1993;75:59-72.
320. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, et al. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. Genes Dev. 1993;7:2609-2617.
321. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Giltinan D, Pitts-Meek S, Stewart T. Inactivation of the IGF-I gene in mice results in perinatal lethality. Ann N Y Acad Sci. 1993;692:300-301.
322. Withers DJ. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 1998;391:900-904.
323. Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. EMBO J. 2002;21:3728-3738.
324. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. J Biol Chem. 2001;276:38349-38352.
325. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. Embo J. 1998;17:6649-6659.
326. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. Dev Biol. 2001;229:141-162.
327. Yakar S, Liu JL, Stannard B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:7324-7329.
328. Sjogren K, Liu JL, Blad K, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:7088-7092.
329. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. N Engl J Med. 2003;349:2211-2222.
330. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. N Engl J Med. 1996;335:1363-1367.
331. Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. Acta Paediatr Suppl. 1997;423:39-45.
332. Walenkamp MJE, Karperien M, Pereira AM, et al. Homozygous and Heterozygous Expression of a Novel Insulin-Like Growth Factor-I Mutation. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:2855-2864.
333. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003;421:182-187.
334. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. Nature. 1990;345:78-80.
335. Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. Nature. 1994;372:464-467.
336. Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. Genes Dev. 1994;8:2953-2963.

337. Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. Dev Biol. 1996;177:517-535.
338. Simpson HL, Umpleby AM, Russell-Jones DL. Insulin-like growth factor-I and diabetes. A review. Growth Horm IGF Res. 1998;8:83-95.
339. Lauro D, Kido Y, Hayashi H, Ebina Y, Accili D. Expression of kinase-inactive mutant insulin receptors does not rescue insulin receptor-deficient mice from perinatal death. Diabetologia. 1999;42:1441-1442.
340. Federici M, Zucaro L, Porzio O, et al. Increased expression of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in skeletal muscle of noninsulin-dependent diabetes mellitus subjects. J Clin Invest. 1996;98:2887-2893.
341. Federici M, Porzio O, Zucaro L, et al. Increased abundance of insulin/IGF-I hybrid receptors in adipose tissue from NIDDM patients. Mol Cell Endocrinol. 1997;135:41-47.
342. Federici M, Lauro D, D'Adamo M, et al. Expression of insulin/IGF-I hybrid receptors is increased in skeletal muscle of patients with chronic primary hyperinsulinemia. Diabetes. 1998;47:87-92.
343. Wood TL, Rogler LE, Czick ME, Schuller AG, Pintar JE. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. Mol Endocrinol. 2000;14:1472-1482.
344. Rajkumar K, Barron D, Lewitt MS, Murphy LJ. Growth retardation and hyperglycemia in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. Endocrinology. 1995;136:4029-4034.
345. Hoeflich A, Reisinger R, Vargas GA, et al. Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 in vivo. FEBS Lett. 2002;523:63-67.
346. Modric T, Silha JV, Shi Z, et al. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice. Endocrinology. 2001;142:1958-1967.
347. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7:85-96.
348. Tamemoto H. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature. 1994;372:182-186.
349. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. Diabetes. 2000;49:1880-1889.
350. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. J Biol Chem. 1999;274:18093-18099.
351. Laustsen PG, Michael MD, Crute BE, et al. Lipoatrophic diabetes in Irs1(-/-)/Irs3(-/-) double knockout mice. Genes Dev. 2002;16:3213-3222.
352. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;278:E127-E133.
353. Hager J, Zouali H, Velho G, Froguel P. Insulin receptor substrate (IRS-1) gene polymorphisms in French NIDDM families. Lancet. 1993;342:1430.
354. Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, et al. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79:1655-1658.
355. Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, et al. Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. Diabetologia. 1995;38:481-486.

356. Armstrong M, Haldane F, Taylor RW, et al. Human insulin receptor substrate-1: variant sequences in familial non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabet Med. 1996;13:133-138.
357. Imai Y, Philippe N, Sesti G, Accili D, Taylor SI. Expression of variant forms of insulin receptor substrate-1 identified in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82:4201-4207.
358. Kido Y. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. J Clin Invest. 2000;105:199-205.
359. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem J. 1998;333 (Pt 3):471-490.
360. Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. Mol Cell Biol. 1998;18:1379-1387.
361. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL. Proliferative Defect and Embryonic Lethality in Mice Homozygous for a Deletion in the p110alpha Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. J Biol Chem. 1999;274:10963-10968.
362. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. Mamm Genome. 2002;13:169-172.
363. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. Science. 2002;297:1031-1034.
364. Asano T, Kanda A, Katagiri H, et al. p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. J Biol Chem. 2000;275:17671-17676.
365. Terauchi Y. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85[alpha] subunit of phosphoinositide 3-kinase. Nature Genet. 1999;21:230-235.
366. Ueki K, Yballe CM, Brachmann SM, et al. Increased insulin sensitivity in mice lacking p85Î² subunit of phosphoinositide 3-kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99:419-424.
367. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem. 1999;68:965-1014.
368. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. Genes Dev. 2001;15:2203-2208.
369. Cho H. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB[beta]). Science. 2001;292:1728-1731.
370. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, et al. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. Science. 2004;304:1325-1328.
371. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. Development. 2005;132:2943-2954.
372. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of Disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway[mdash]therapeutic perspectives in cancer. Nat Clin Prac Oncol. 2007;4:591-602.
373. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90:11217-11221.
374. Hernandez-Sanchez C, Blakesley V, Kalebic T, Helman L, LeRoith D. The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. J Biol Chem. 1995;270:29176-29181.

375. Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. Adv Cancer Res. 1996;68:183-223.
376. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:8318-8323.
377. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. Cancer Res. 2001;61:589-593.
378. Pollak MN. Insulin-like growth factors and neoplasia. Novartis Found Symp. 2004;262:84-98; discussion 98-107, 265-108.
379. Yang XF, Beamer WG, Huynh H, Pollak M. Reduced growth of human breast cancer xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. Cancer Res. 1996;56:1509-1511.
380. Deitel K, Dantzer D, Ferguson P, et al. Reduced growth of human sarcoma xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. J Surg Oncol. 2002;81:75-79.
381. Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. Cancer Res. 2002;62:1030-1035.
382. Wu Y, Cui K, Miyoshi K, et al. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. Cancer Res. 2003;63:4384-4388.
383. Pollak MN. Insulin-like growth factors and neoplasia. Nat Rev Cancer. 2004;4:505-518.
384. Tsuchiya N, Wang L, Horikawa Y, et al. CA repeat polymorphism in the insulin-like growth factor-I gene is associated with increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Int J Oncol. 2005;26:225-231.
385. Dunn SE, Kari FW, French J, et al. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. Cancer Res. 1997;57:4667-4672.
386. Luigi F, Edward PW, Dennis TV, Samuel K, John OH. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. Aging Cell. 2008;7:681-687.
387. Catrina SB, Botusan IR, Rantanen A, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha are expressed in kaposi sarcoma and modulated by insulin-like growth factor-I. Clin Cancer Res. 2006;12:4506-4514.
388. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. J Biol Chem. 2002;277:38205-38211.
389. Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:435-444.
390. Zhang D, Samani AA, Brodt P. The role of the IGF-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. Horm Metab Res. 2003;35:802-808.
391. Sussenbach JS, Rodenburg RJ, Scheper W, Holthuizen P. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the human IGF-II gene expression. Adv Exp Med Biol. 1993;343:63-71.
392. Kim HT, Choi BH, Niikawa N, Lee TS, Chang SI. Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF-II genes in ovarian tumors. Am J Med Genet. 1998;80:391-395.
393. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science. 1997;276:1268-1272.

394. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. Science. 2003;299:1753-1755.
395. Toretsky JA, Helman LJ. Involvement of IGF-II in human cancer. J Endocrinol. 1996;149:367-372.
396. O'Gorman DB, Weiss J, Hettiaratchi A, Firth SM, Scott CD. Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. Endocrinology. 2002;143:4287-4294.
397. Brodt P, Reich R, Moroz LA, Chambers AF. Differences in the repertoires of basement membrane degrading enzymes in two carcinoma sublines with distinct patterns of site-selective metastasis. Biochim Biophys Acta. 1992;1139:77-83.
398. Fürstenberger G, Senn H-J. Insulin-like growth factors and cancer. The Lancet Oncology. 2002;3:298-302.
399. Liu B, Lee KW, Anzo M, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibition of prostate cancer growth involves suppression of angiogenesis. Oncogene. 2006;26:1811-1819.
400. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. Mol Endocrinol. 1995;9:361-367.
401. So AI, Levitt RJ, Eigl B, et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel therapeutic target associated with breast cancer. Clin Cancer Res. 2008;14:6944-6954.
402. Grellier P, De Galle B, Babajko S. Expression of insulin-like growth factor-binding protein 6 complementary DNA alters neuroblastoma cell growth. Cancer Res. 1998;58:1670-1676.
403. Fu P, Thompson JA, Bach LA. Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6. J Biol Chem. 2007;282:22298-22306.
404. Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. Trends in Biochemical Sciences. 2008;33:461-473.
405. Hofmann F, Garcia-Echeverria C. Blocking the insulin-like growth factor-I receptor as a strategy for targeting cancer. Drug Discov Today. 2005;10:1041-1047.
406. Lacy MQ, Alsina M, Fonseca R, et al. Phase I, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Anti-Insulinlike Growth Factor Type 1 Receptor Monoclonal Antibody CP-751,871 in Patients With Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2008.
407. Beltran PJ, Mitchell P, Chung YA, et al. AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells. Mol Cancer Ther. 2009.
408. Bladt F. Pre-clinical evaluation of the anti-tumor activity of the IGF1R-specific antibody AVE1642 [abstract]: Nature Publishing Group; 2006.
409. Rowinsky EK, Youssoufian H, Tonra JR, Solomon P, Burtrum D, Ludwig DL. IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. Clin Cancer Res. 2007;13:5549s-5555s.
410. Pandini G, Wurch T, Akla B, Corvaia N, Belfiore A, Goetsch L. Functional responses and in vivo anti-tumour activity of h7C10: a humanised monoclonal antibody with neutralising activity against the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor and insulin/IGF-1 hybrid receptors. Eur J Cancer. 2007;43:1318-1327.
411. Rodon J, DeSantos V, Ferry RJ, Kurzrock R. Early drug development of inhibitors of the insulin-like growth factor-I receptor pathway: Lessons from the first clinical trials. Molecular Cancer Therapeutics. 2008;7:2575-2588.
412. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, et al. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. Cancer Cell. 2004;5:231-239.

413. Warshamana-Greene GS. The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. Clin Cancer Res. 2005;11:1563-1571.
414. Vasilcanu D. The cyclolignan PPP induces activation loop-specific inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor: link to the phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt apoptotic pathway. Oncogene. 2004;23:7854-7862.
415. Haluska P. In vitro and in vivo antitumor effects of the dual insulin-like growth factor-I/insulin receptor inhibitor, BMS-554417. Cancer Res. 2006;66:362-371.
416. Girnita A. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. Clin Cancer Res. 2006;12:1383-1391.
417. Karp DD, Paz-Ares LG, Novello S, et al. Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2009;27:2516-2522.
418. Gualberto A, Pollak M. Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. Oncogene. 2009;28:3009-3021.
419. Sachdev D, Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. Mol Cancer Ther. 2007;6:1-12.
420. Sell C, Dumenil G, Deveaud C, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. Mol Cell Biol. 1994;14:3604-3612.
421. Giorgino F, Belfiore A, Milazzo G, et al. Overexpression of insulin receptors in fibroblast and ovary cells induces a ligand-mediated transformed phenotype. Mol Endocrinol. 1991;5:452-459.
422. Pillemer G, Lugasi-Evgi H, Scharovsky G, Naor D. Insulin dependence of murine lymphoid T-cell leukemia. Int J Cancer. 1992;50:80-85.
423. Frasca F, Pandini G, Scalia P, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. Mol Cell Biol. 1999;19:3278-3288.
424. Frittitta L, Sciacca L, Catalfamo R, et al. Functional insulin receptors are overexpressed in thyroid tumors: is this an early event in thyroid tumorigenesis? Cancer. 1999;85:492-498.
425. Papa V, Pezzino V, Costantino A, et al. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. J Clin Invest. 1990;86:1503-1510.
426. Mathieu MC, Clark GM, Allred DC, Goldfine ID, Vigneri R. Insulin receptor expression and clinical outcome in node-negative breast cancer. Proc Assoc Am Physicians. 1997;109:565-571.
427. Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. FEBS Lett. 2004;574:1-8.
428. Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. Mol Cell Biol. 2003;23:2720-2732.
429. Pierantoni GM, Rinaldo C, Esposito F, Mottolese M, Soddu S, Fusco A. High Mobility Group A1 (HMGA1) proteins interact with p53 and inhibit its apoptotic activity. Cell Death Differ. 2006;13:1554-1563.
430. Frasca F, Rustighi A, Malaguarnera R, et al. HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. Cancer Res. 2006;66:2980-2989.

431. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. Embo J. 1990;9:2409-2413.
432. Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE. The insulin receptor isoform exon 11-(IR-A) in cancer and other diseases: a review. Horm Metab Res. 2003;35:778-785.
433. Sciacca L, Costantino A, Pandini G, et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. Oncogene. 1999;18:2471-2479.
434. Vella V, Pandini G, Sciacca L, et al. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:245-254.
435. Heuson JC, Legros N, Heimann R. Influence of insulin administration on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in intact, oophorectomized, and hypophysectomized rats. Cancer Res. 1972;32:233-238.
436. Cohen ND, Hilf R. Influence of insulin on growth and metabolism of 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene-induced mammary tumors. Cancer Res. 1974;34:3245-3252.
437. Shafie SM, Grantham FH. Role of hormones in the growth and regression of human breast cancer cells (MCF-7) transplanted into athymic nude mice. J Natl Cancer Inst. 1981;67:51-56.
438. Sharon R, Pillemer G, Ish-Shalom D, et al. Insulin dependence of murine T-cell lymphoma. II. Insulin-deficient diabetic mice and mice fed low-energy diet develop resistance to lymphoma growth. Int J Cancer. 1993;53:843-849.
439. Milazzo G, Giorgino F, Damante G, et al. Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. Cancer Res. 1992;52:3924-3930.
440. Milazzo G, Sciacca L, Papa V, Goldfine ID, Vigneri R. ASPB10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. Mol Carcinog. 1997;18:19-25.
441. Drejer K. The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. Diabetes Metab Rev. 1992;8:259-285.
442. Pisani P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies. Arch Physiol Biochem. 2008;114:63-70.
443. Albanes D, Weinstein SJ, Wright ME, et al. Serum insulin, glucose, indices of insulin resistance, and risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2009;101:1272-1279.
444. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. Endocr Relat Cancer. 2009.
445. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. Bmj. 2005;330:1304-1305.
446. Alimova IN, Liu B, Fan Z, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. Cell Cycle. 2009;8:909-915.
447. Govindarajan R, Ratnasinghe L, Simmons DL, et al. Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and colon cancer in patients with diabetes. J Clin Oncol. 2007;25:1476-1481.
448. Koro C, Barrett S, Qizilbash N. Cancer risks in thiazolidinedione users compared to other anti-diabetic agents. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2007;16:485-492.
449. Ramos-Nino ME, MacLean CD, Littenberg B. Association between cancer prevalence and use of thiazolidinediones: results from the Vermont Diabetes Information System. BMC Med. 2007;5:17.

450. Aiello A, Pandini G, Frasca F, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. Endocrinology. 2006;147:4463-4475.
451. Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. Diabetes Care. 2006;29:254-258.
452. Pandini G, Vigneri R, Costantino A, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. Clin Cancer Res. 1999;5:1935-1944.
453. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. Endocr Rev. 2009.
454. Freund GG, Kulas DT, Mooney RA. Insulin and IGF-1 Increase Mitogenesis and Glucose Metabolism in the Multiple Myeloma Cell Line, RPMI-8226. JImmunol. 1993;151:1811-1820.
455. Jelinek DF, Witzig TE, Arendt BK. A role for insulin-like growth factor in the regulation of IL-6- responsive human myeloma cell line growth. JImmunol. 1997;159:487-496.
456. Georgii-Hemming P, Wiklund HJ, Ljunggren O, Nilsson K. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. Blood. 1996;88:2250-2258.
457. Ferlin M, Noraz N, Hertogh C, Brochier J, Taylor N, Klein B. Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. Br J Haematol. 2000;111:626-634.
458. Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth

Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth in vivo. Blood. 2000;96:2856-2861.

459. Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. Blood. 2002;99:4138-4146.
460. Xu F, Gardner A, Tu Y, Michl P, Prager D, Lichtenstein A. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors. BrJHaematol. 1997;97:429-440.
461. Ogawa M, Nishiura T, Oritani K, et al. Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. Cancer Res. 2000;60:4262-4269.
462. Podar K, Tai YT, Cole CE, et al. Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells. J Biol Chem. 2003;278:5794-5801.
463. Vanderkerken K, Asosingh K, Braet F, Van Riet I, Van Camp B. Insulin-like growth factor-1 acts as a chemoattractant factor for 5T2 multiple myeloma cells. Blood. 1999;93:235-241.
464. Menu E, Asosingh K, Van Riet I, Croucher P, Van Camp B, Vanderkerken K. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment. Blood Cells Mol Dis. 2004;33:111-119.
465. Qiang YW, Yao L, Tosato G, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. Blood. 2004;103:301-308.

466. Tai YT, Podar K, Catley L, et al. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. Cancer Res. 2003;63:5850-5858.
467. Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC. Focus on multiple myeloma. Cancer Cell. 2004;6:439-444.
468. Sahara N, Takeshita A, Ono T, et al. Role for interleukin-6 and insulin-like growth factor-I via PI3-K/Akt pathway in the proliferation of CD56- and CD56+ multiple myeloma cells. Exp Hematol. 2006;34:736-744.
469. Descamps G, Wuilleme-Toumi S, Trichet V, et al. CD45neg but not CD45pos human myeloma cells are sensitive to the inhibition of IGF-1 signaling by a murine anti-IGF-1R monoclonal antibody, mAVE1642. J Immunol. 2006;177:4218-4223.
470. Collette M, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Amiot M. Crucial role of phosphatase CD45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells. Eur Cytokine Netw. 2007;18:120-126.
471. Standal T, Borset M, Lenhoff S, et al. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. Blood. 2002;100:3925-3929.
472. Abboud SL, Bethel CR, Aron DC. Secretion of insulinlike growth factor I and insulinlike growth factor- binding proteins by murine bone marrow stromal cells. J ClinInvest. 1991;88:470-475.
473. Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. Haematologica. 2005;90:706-707.
474. Chng WJ, Gualberto A, Fonseca R. IGF-1R is overexpressed in poor-prognostic subtypes of multiple myeloma. Leukemia. 2006;20:174-176.
475. Wu KD, Zhou L, Burtrum D, Ludwig DL, Moore MA. Antibody targeting of the insulin-like growth factor I receptor enhances the anti-tumor response of multiple myeloma to chemotherapy through inhibition of tumor proliferation and angiogenesis. Cancer Immunol Immunother. 2007;56:343-357.
476. Cohen BD. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. Clin Cancer Res. 2005;11:2063-2073.
477. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. Cancer Cell. 2004;5:221-230.
478. Maiso P, Ocio EM, Garayoa M, et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. Br J Haematol. 2008;141:470-482.
479. Stromberg T. IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. Blood. 2006;107:669-678.
480. Menu E, Jernberg-Wiklund H, Stromberg T, et al. Inhibiting the IGF-1 receptor tyrosine kinase with the cyclolignan PPP: an in vitro and in vivo study in the 5T33MM mouse model. Blood. 2006;107:655-660.
481. Bertrand FE, Steelman LS, Chappell WH, et al. Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells. Leukemia. 2006;20:1254-1260.
482. Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Bataille R, Amiot M. A humanised anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances Bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. Br J Cancer. 2009;100:366-369.

483. Menu E, van Valckenborgh E, van Camp B, Vanderkerken K. The role of the insulin-like growth factor 1 receptor axis in multiple myeloma. Arch Physiol Biochem. 2009;115:49-57.
484. Glassford J, Rabin N, Lam EW, Yong KL. Functional regulation of D-type cyclins by insulin-like growth factor-I and serum in multiple myeloma cells. Br J Haematol. 2007;139:243-254.
485. Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabani-Gargir L, Glaser T. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. Mol Genet Metab. 2000;71:315-320.
486. Wang XH, Qian RZ, Zhang W, Chen SF, Jin HM, Hu RM. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36:181-188.
487. Loeser RF, Im HJ, Richardson B, Lu Q, Chubinskaya S. Methylation of the OP-1 promoter: potential role in the age-related decline in OP-1 expression in cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 2009;17:513-517.
488. Moreaux J, Sprynski AC, Dillon SR, et al. APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. Eur J Haematol. 2009;83:119-129.
489. Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. Haematologica. 2004;89:547-551.
490. Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Szpak Y, Bataille R, Robillard N, Amiot M. The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells. J Immunol. 2004;173:4953-4959.
491. Kulas DT, Freund GG, Mooney RA. The Transmembrane Protein-tyrosine Phosphatase CD45 Is Associated with Decreased Insulin Receptor Signaling. Journal of Biological Chemistry. 1996;271:755-760.
492. Kull FC, Jacobs S, Su YF, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Cuatrecasas P. Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C. Journal of Biological Chemistry. 1983;258:6561-6566.
493. Menu E, Kooijman R, Van Valckenborgh E, et al. Specific roles for the PI3K and the MEK-ERK pathway in IGF-1-stimulated chemotaxis, VEGF secretion and proliferation of multiple myeloma cells: study in the 5T33MM model. Br J Cancer. 2004;90:1076-1083.
494. Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD. Role of IGF-I Signaling in Regulating Osteoclastogenesis. Journal of Bone and Mineral Research. 2006;21:1350-1358.
495. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, et al. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. J Biol Chem. 2002;277:44005-44012.
496. Middleton J, Arnott N, Walsh S, Beresford J. The expression of mRNA for insulin-like growth factors and their receptor in giant cell tumors of human bone. Clin Orthop Relat Res. 1996:224-231.
497. Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. Eur J Endocrinol. 2005;152:327-332.
498. Renier G, Clement I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. Endocrinology. 1996;137:4611-4618.
499. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell. 2006;124:471-484.

500. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 2007;12:9-22.
501. Rowinsky EK. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). Curr Opin Oncol. 2004;16:564-575.
502. McMillin DW, Ooi M, Delmore J, et al. Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. Cancer Res. 2009;69:5835-5842.
503. Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. Exp Cell Res. 2009;315:485-497.
504. Baumann P, Hagemeier H, Mandl-Weber S, Franke D, Schmidmaier R. Myeloma cell growth inhibition is augmented by synchronous inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor by NVP-AEW541 and inhibition of mammalian target of rapamycin by Rad001. Anticancer Drugs. 2009;20:259-266.
505. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. Cell. 2009;137:873-886.
506. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? Nat Rev Cancer. 2004;4:966-977.
507. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. Cancer Cell. 2007;11:349-360.
508. Reiling JH, Sabatini DM. Increased mTORC1 signaling UPRegulates stress. Mol Cell. 2008;29:533-535.
509. Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, et al. Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. Mol Cell. 2008;29:541-551.
510. Fortuny J, Benavente Y, Bosch R, Garcia-Villanueva M, de Sevilla AF, de Sanjose S. Type 2 diabetes mellitus, its treatment and risk for lymphoma. Eur J Cancer. 2005;41:1782-1787.
511. Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Massry SG. Elevated cytosolic calcium and impaired proliferation of B lymphocytes in type II diabetes mellitus. Am J Kidney Dis. 1997;30:98-104.
512. Kocbuch K, Sakowicz-Burkiewicz M, Grden M, Szutowicz A, Pawelczyk T. Effect of insulin and glucose on adenosine metabolizing enzymes in human B lymphocytes. Acta Biochim Pol. 2009;56:439-446.
513. Juweid ME, Cheson BD. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. N Engl J Med. 2006;354:496-507.
514. Bartel TB, Haessler J, Brown TLY, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. Blood. 2009;114:2068-2076.
515. Caers J, Deleu S, Belaid Z, et al. Neighboring adipocytes participate in the bone marrow microenvironment of multiple myeloma cells. Leukemia. 2007;21:1580-1584.
516. Baur A, Bartl R, Pellengahr C, Baltin V, Reiser M. Neovascularization of bone marrow in patients with diffuse multiple myeloma: a correlative study of magnetic resonance imaging and histopathologic findings. Cancer. 2004;101:2599-2604.
517. Dalamaga M, Karmaniolas K, Panagiotou A, et al. Low circulating adiponectin and resistin, but not leptin, levels are associated with multiple myeloma risk: a case-control study. Cancer Causes Control. 2009;20:193-199.

518. Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell. 2000;100:197-207.
519. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Cell. 2002;111:305-317.
520. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. Cell Metab. 2006;4:341-348.
521. Sato M, Takeda N, Sarui H, et al. Association between serum leptin concentrations and bone mineral density, and biochemical markers of bone turnover in adult men. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:5273-5276.
522. Hyun Woo L, Sang Yun K, Kim AY, Eun Jig L, Je-Yong C, Jae Bum K. Adiponectin Stimulates Osteoblast Differentiation Through Induction of COX2 in Mesenchymal Progenitor Cells. Stem Cells. 2009;27:2254-2262.
523. Williams GA, Wang Y, Callon KE, et al. In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. Endocrinology. 2009;150:3603-3610.
524. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell. 2007;130:456-469.
525. Barille S, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Amiot M. Ectopic secretion of osteocalcin, the major non-collagenous bone protein, by the myeloma cell line NCI-H929. J Bone Miner Res. 1996;11:466-471.
526. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science. 1999;284:143-147.
527. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Sci. 1992;102 (Pt 2):341-351.
528. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. Nat Rev Rheumatol. 2009;5:442-447.
529. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. Endocrinology. 2002;143:2376-2384.
530. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91:3349-3354.
531. Vestergaard P. Bone metabolism in type 2 diabetes and role of thiazolidinediones. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009;16:125-131.
532. Baumann P, Mandl-Weber S, Emmerich B, Straka C, Schmidmaier R. Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. Exp Cell Res. 2007;313:3592-3603.
533. Huang H, Wu D, Fu J, et al. All-trans retinoic acid can intensify the growth inhibition and differentiation induction effect of rosiglitazone on multiple myeloma cells. Eur J Haematol. 2009;83:191-202.
534. Garayoa M, Garcia JL, Santamaria C, et al. Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. Leukemia. 2009;23:1515-1527.
535. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, et al. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2007;48:2032-2041.
536. Laharrague P, Cousin, B. , Corberand, JX. , Pénicaud, L. ,Casteilla, L. . The bone marrow adipocyte : a cell with a future. medecines/sciences. 1999;15:504-509.
537. Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. Nat Rev Rheumatol. 2009;5:365-372.

538. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev. 2006;20:161-171.
539. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8:726-736.
540. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. Immunity. 2004;20:707-718.