



HAL
open science

Role of the mitochondrial channel VDAC2 in the regulation of apoptosis effector proteins BAK and BAX in Multiple Myeloma

Ophélie Champion

► **To cite this version:**

Ophélie Champion. Role of the mitochondrial channel VDAC2 in the regulation of apoptosis effector proteins BAK and BAX in Multiple Myeloma. Human health and pathology. Nantes Université, 2024. English. NNT : 2024NANU1030 . tel-04894786

HAL Id: tel-04894786

<https://theses.hal.science/tel-04894786v1>

Submitted on 17 Jan 2025

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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Biologie cellulaire, Biologie du développement

Par

Ophélie CHAMPION

Rôle du canal mitochondrial VDAC2 dans la régulation des protéines effectrices de l'apoptose BAK et BAX dans le Myélome Multiple

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le mercredi 04 décembre 2024

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers – INSERM 1307 CNRS 6075

Rapporteurs avant soutenance :

Dr Nikolay POPGEORGIEV
Dr Damien ARNOULT

Maître de Conférence Universitaire, Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de Recherche CNRS, Université Paris-Sud Villejuif

Composition du Jury :

Président : Dr Philippe Paul JUIN

Directeur de Recherche INSERM, Nantes Université

Examineurs : Dr Philippe Paul JUIN
Dr Lucie BERGDOLL

Directeur de Recherche INSERM, Nantes Université
Chargée de Recherche CNRS, Aix-Marseille Université

Dir. de thèse : Dr Patricia GOMEZ-BOUGIE
Co-dir. de thèse : Pr Cyrille TOUZEAU

Chargée de Recherche CHU de Nantes, Nantes Université
Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes,
Nantes Université

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à présenter mes remerciements aux Dr. Lucie Bergdoll, Dr. Nicolay Popgeorgiev, Dr. Damien Arnoult et Dr. Philippe Paul Juin qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que membres du jury.

J'aimerais remercier Catherine Pellat-Deceunynck et David Chiron pour leur accueil au sein de leur équipe. Merci pour votre écoute, vos conseils et votre investissement dans mon projet de thèse. Merci pour votre rigueur scientifique qui me sera d'une grande utilité pour la suite.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Patricia Gomez-Bougie, pour sa technicité et sa rigueur inégalées lors des manip. Désormais, le Western Blot n'a plus de secret pour moi ! Ton expertise et tes conseils avisés m'ont guidée tout au long de ce parcours. Je te remercie également pour ta gentillesse et ton écoute. Merci de m'avoir transmis ce savoir et cette passion sur la famille BCL2, en espérant t'avoir partagé ma passion pour les canaux calciques ! Je te souhaite une bonne continuation pour la suite du projet, car il reste encore de nombreuses choses très intéressantes à découvrir sur VDAC2 ... Je tiens aussi à remercier Cyrille Touzeau, mon co-directeur de thèse. Merci pour ta gentillesse, ton écoute attentive et ta disponibilité, même avec ton emploi du temps chargé. Merci de ton implication dans ces deux projets et de ton expertise dans le Myélome Multiple !

Je remercie tous les membres de l'équipe 11 « reMOVE-B ».

Merci à Christelle, ma partenaire bien matinale du labo ! Entre nos discussions et tes compétences en biologie moléculaire, mais aussi en Qualité chaque moment était un vrai plaisir. Et un grand merci pour toutes les heures que tu as consacrées au trieur pour mes cellules – je suis convaincue que tu mérites une médaille pour ça !

Merci à Géraldine, avec qui j'ai eu le plaisir de chanter des classiques de Disney en pièce de culture cellulaire – un vrai duo pour démarrer la journée avec le sourire !

Merci à Céline, pour ton aide précieuse en bio-informatique et ta gentillesse qui ont été d'une grande aide tout au long de ma thèse !

Merci à Agnès, notre source inépuisable d'anecdotes hilarantes, qui sait toujours rendre nos journées plus légères par son humour et sa joie de vivre. Merci pour tes précieux conseils en biologie moléculaire, le CRISPR n'a pas de secret pour toi !

Merci à Antonin, notre auditeur privilégié avec Patricia, qui a dû penser que nos discussions sur le projet VDAC2 étaient le meilleur podcast jamais créé ! Merci pour ta patience ...

Merci aussi à Manu et Charlotte, Sara mais aussi à Martine. Martine, merci de m'avoir laissé l'opportunité de terminer ton dernier projet scientifique, merci pour tous tes conseils.

Un grand remerciement à tous les stagiaires présents lors de ces 3 dernières années. Merci ma petite Alana d'avoir été un réel petit rayon de soleil, merci de m'avoir permis de t'encadrer. Merci à Chloé, Domitille, Lilou, Antoine, Marie, Emma. Enfin, merci à Maxence, Camille et Élise pour tous ces moments de partage et de rire. Petite dédicace spéciale pour Élise, la meilleure interne d'hémato de Tours !

J'aimerais aussi remercier toutes les plateformes impliquées dans ce projet. Merci à Steven de la plateforme MicroPICell, merci à Nicolas, Cécile et Lucile de la plateforme Cytocell, merci à François de la plateforme Prot'ICO et merci à la plateforme GenoA. Merci aux financeurs de mon projet de thèse, l'Héma Next et la FFRMG.

Merci à l'association Nan'thèse, qui m'a ouvert ses portes, qui m'a permis de découvrir des personnes fantastiques malgré nos parcours bien différents.

Merci à Marie Potier-Cartereau, Caroline Goupille et Olivier Romito, qui m'ont encadrée durant mes stages de M1 et M2. Merci de m'avoir fait découvrir la recherche et de m'avoir donné l'envie de continuer dans ce domaine ! Vive les canaux !

Enfin, les meilleures pour la fin. A mes « collègues ». Les filles, MERCI. Merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir soutenue et encouragée tout le long sans aucune faille. Merci d'avoir été ce pilier dans cette thèse, qui n'aurait probablement jamais aboutie sans votre soutien. Et merci milles fois pour votre amitié.

Mélanie, un grand merci à toi. Merci pour ta gentillesse et ton soutien. Merci pour tous les petits services que tu m'as rendus au labo, et merci pour tous ces moments de rire et de partage, aussi bien au labo qu'en dehors. Je te souhaite tout le meilleur pour la fin de ta thèse.

Romane, ma Roro. Merci d'avoir été ma « grande sœur » du labo. Ta capacité à toujours trouver les mots justes et ta façon d'aborder les choses m'ont été d'une grande aide. Ton esprit critique, à la fois perspicace et constructif, m'a permis de voir les choses d'une autre façon.

Les conseils que tu m'as donnés ont été précieux, ton écoute et ton aide sont inestimables. Je suis reconnaissante d'avoir une amie comme toi, toujours prête à écouter et à offrir une perspective réfléchie. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière professionnelle, car tu le mérites largement ! Et n'oublie jamais que BAK >>> BAX ;).

Laura, ou devrai-je plutôt dire.... Docteure Laura ! Je te remercie pour ton soutien et tes conseils. Merci pour ta formation sur le modèle « CAM » : les poussins n'ont plus de secret pour moi ! Merci pour ta gentillesse, et merci d'avoir partagé ta passion des escapes games avec moi ! J'espère t'avoir convaincue que tu es une personne formidable et que tu peux avoir une véritable confiance en toi et en ce que tu fais.

Sophie, ma « tata soso », merci d'avoir été autant présente pendant ma thèse. Merci pour ton investissement dans ce projet, merci pour toutes les heures de manips que l'on a faites ensemble, toutes ses heures au trieur, mais aussi au cytomètre à tester beaucoup de choses... Merci de m'avoir initiée à la culture primaire, les prélèvements de sang ne me font plus peur ! Et merci infiniment pour encore bien d'autres choses... autant au labo qu'en dehors. Notre balade avec les rennes au village du Père Noël à Rovaniemi restera gravée à jamais !

Candice, ma petite Candoo. J'espère avoir su te transmettre ma passion pour la science (pas pour les canaux ça j'en suis certaine), pour que tu puisses la porter et l'enrichir à ta façon dans la suite de ta thèse. Ta joie de vivre et ton énergie débordante ont été bénéfiques pendant toute ma thèse et bien plus encore. Ton sourire, ta bonne humeur et ton sens de l'humour sont des rayons de soleil, même pendant les journées les plus difficiles. Garde très précieusement ta capacité à créer une ambiance conviviale, même dans les moments de stress. Merci pour ton amitié et ton énorme soutien. Alors que tu approches de la fin de ta thèse, je tiens à te souhaiter tout le courage dont tu auras besoin. Bim ne sera plus un obstacle pour toi ! Je n'ai aucun doute quant à ta réussite. Continue à briller et à partager ta lumière, et sache que je serai toujours là pour te soutenir.

Salomé, ma Salomé, tout d'abord j'aimerais te remercier pour ton accueil au sein de l'équipe. Merci d'avoir été ma partenaire du soir au labo. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour tout le soutien que tu m'as apporté tout au long de ma thèse. Dès le début, ta présence a été une véritable bouffée d'air frais dans cette aventure parfois éprouvante. Nos discussions après le laboratoire, où nous partageons nos doutes et nos réussites, ont non seulement été des moments de réconfort, mais aussi de profonde inspiration. Ton enthousiasme pour la recherche m'a motivée à continuer, même lorsque les choses devenaient difficiles. Tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager et me rappeler l'importance de croire

en mes capacités. Ton amitié m'a énormément aidée, et je suis tellement reconnaissante d'avoir croisé ton chemin. Je te souhaite tout le meilleur à Helsinki, ça a été un réel plaisir de venir te voir là-bas, et tout ce que nous avons vécu sur place est inoubliable. Merci d'être une amie aussi précieuse et d'un soutien indéfectible. J'espère que nous aurons l'opportunité un jour de travailler ensemble. Et surtout, fais toi confiance !

Merci à ma famille et mes amis, qui ont toujours été là pour moi durant ses 3 dernières années. Merci de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Merci Benjamin, de partager ma vie depuis maintenant plus de 11 ans, et de m'avoir soutenue pendant tout ce temps. A mes 4 étoiles, mamie, mimi et mes deux papis, tout ça c'est pour vous que je l'ai fait ...

| | |
|---|----|
| SOMMAIRE | 1 |
| INDEX DES FIGURES | 4 |
| LISTES DES ABREVIATIONS | 6 |
| INTRODUCTION | 10 |
| I) Le Myélome Multiple | 11 |
| a. Développement du Myélome Multiple et des Leucémies à Plasmocytes..... | 11 |
| 1. Origine des plasmocytes..... | 11 |
| 2. Développement et stratification de la maladie..... | 12 |
| 3. Épidémiologie..... | 14 |
| 4. Signes cliniques et diagnostic de la pathologie..... | 16 |
| b. Anomalies cytogénétiques dans le Myélome Multiple..... | 17 |
| 1. Anomalies génétiques primaires..... | 17 |
| 2. Anomalies génétiques secondaires..... | 19 |
| c. Thérapies actuelles et résistances aux traitements dans le Myélome Multiple..... | 22 |
| 1. Les traitements utilisés pour la thérapie du Myélome Multiple..... | 22 |
| 2. Le traitement des patients en première ligne..... | 24 |
| 2.1 Le traitement des patients éligibles à l'autogreffe..... | 24 |
| 2.2 Le traitement des patients non éligibles à l'autogreffe..... | 25 |
| 3. Le traitement des patients en rechute ou réfractaires..... | 26 |
| 4. Le traitement des leucémies à plasmocytes..... | 28 |
| II) L'apoptose et la famille BCL-2 | 29 |
| a. Généralités et découverte de l'apoptose..... | 29 |
| b. La mitochondrie..... | 30 |
| c. Les deux voies de l'apoptose..... | 31 |
| 1. 2 voies majeures..... | 31 |
| 2. L'apoptose extrinsèque..... | 31 |
| 3. L'apoptose intrinsèque..... | 34 |
| 4. Phase d'exécution de la mort..... | 36 |
| d. La famille BCL-2..... | 36 |
| 1. Origine de la famille BCL-2..... | 36 |
| 2. Structure des protéines de la famille BCL-2..... | 37 |
| 3. Les protéines anti-apoptotiques..... | 40 |
| 3.1.1 BCL-2..... | 40 |
| 3.1.2 MCL-1..... | 41 |
| 3.1.3 BCL-XL..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.1.4 BCL-W..... | 43 |
| 3.1.5 BFL-1 ou A1..... | 43 |
| 4. Les protéines pro-apoptotiques BH3-only..... | 44 |
| 4.1.1 BIM..... | 44 |
| 4.1.2 PUMA..... | 45 |
| 4.1.3 BID..... | 45 |
| 4.1.4 NOXA..... | 46 |
| 4.1.5 BMF..... | 46 |
| 4.1.6 HRK..... | 46 |
| 4.1.7 BAD..... | 47 |
| 4.1.8 BIK..... | 47 |
| 5. Les protéines pro-apoptotiques effectrices..... | 47 |
| 5.1.1 BAK et BAX..... | 48 |
| 5.1.2 BOK..... | 49 |
| e. Régulation de la famille BCL-2..... | 50 |
| 1. Affinités de liaison..... | 50 |
| 2. Les 3 modes de régulation entre les membres de la famille BCL-2..... | 51 |
| 3. Activation et oligomérisation des effecteurs..... | 54 |
| i. L'activation des effecteurs et leur oligomérisation..... | 54 |
| ii. Formation du pore et de la MOMP pour le relargage des facteurs..... | 56 |
| 4. Mécanisme d'activation des effecteurs..... | 56 |
| 5. Dérégulation de la famille BCL-2 dans le cancer..... | 58 |
| 6. Les BH3-mimétiques..... | 60 |
| 7. Notion de priming mitochondrial..... | 61 |
| 8. Famille BCL-2 et MM..... | 64 |
| a. Dérégulation de la famille BCL-2 dans le MM..... | 64 |
| b. Ciblage des protéines de la famille BCL-2 dans le MM..... | 66 |
| i. Ciblage de la protéine BCL-2 par les BH3-mimétiques..... | 66 |
| ii. Ciblage de la protéine MCL-1 par les BH3-mimétiques..... | 67 |
| iii. Ciblage de la protéine BCL-XL par les BH3-mimétiques..... | 69 |
| iv. Ciblage de la protéine BCL-XL par la technologie PROTAC..... | 69 |
| v. Ciblage des effecteurs BAK et BAX..... | 73 |
| III) Les canaux mitochondriaux VDACS..... | 74 |
| a. Introduction des canaux VDACS..... | 74 |
| 1. Origine..... | 74 |
| 2. Structure..... | 74 |

| | |
|--|------------|
| 3. Expression..... | 78 |
| b. Les différentes fonctions des VDACS..... | 79 |
| 1. Fonction physiologique et électrophysiologique..... | 79 |
| 2. Fonction métabolique..... | 81 |
| 3. Fonction dans l'apoptose..... | 82 |
| 4. Les souris déficientes en VDACS..... | 82 |
| c. VDACS et apoptose..... | 83 |
| 1. VDAC1, apoptose et famille BCL-2..... | 84 |
| 2. VDAC2, apoptose et famille BCL-2..... | 84 |
| i. VDAC2 et BAK..... | 84 |
| ii. Résidus impliqués dans l'interaction VDAC2-BAK..... | 86 |
| iii. VDAC2 et BAX..... | 90 |
| d. VDACS et cancer..... | 92 |
| 1. Expression des VDACS dans le cancer..... | 92 |
| 2. Ciblage pharmacologique de la protéine VDAC2..... | 93 |
| i. WEHI-9625..... | 93 |
| ii. Erastine..... | 94 |
| iii. Efsevin..... | 95 |
| IV) Objectifs..... | 98 |
| RÉSULTATS..... | 99 |
| I) Étude du rôle du canal mitochondrial VDAC2 dans la régulation des protéines effectrices de l'apoptose BAK et BAX dans le Myélome Multiple..... | 100 |
| II) Ciblage de la protéine BCL-XL par le DT2216 dans les leucémies secondaires à plasmocytes et dans le Myélome Multiple..... | 156 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 172 |
| I) VDAC2 prime les cellules myélomateuses à l'apoptose dépendante de BAK en stabilisant BAK et non BAX et représente une nouvelle cible thérapeutique..... | 173 |
| II) Le PROTAC DT2216 dégrade spécifiquement BCL-XL et cible efficacement la leucémie plasmocytaire secondaire dépendante de BCLXL pour sa survie..... | 183 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 187 |

INDEX DES FIGURES

- Figure 1** - Les différentes étapes de l'évolution d'un Myélome Multiple
- Figure 2** - Courbes de survie de patients atteints de Myélome Multiple ces 40 dernières années
- Figure 3** - Courbes de survie de patients atteints de Leucémies à Plasmocytes primaire ou secondaire
- Figure 4** - Traitements des patients éligibles à l'autogreffe
- Figure 5** - Traitements des patients non éligibles à l'autogreffe
- Figure 6** - Traitements des patients à la rechute ou réfractaires
- Figure 7** - La voie extrinsèque de l'apoptose
- Figure 8** - La voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose
- Figure 9** - Structure des membres de la famille BCL-2
- Figure 10** - Structure en 3D de la protéine BCL-XL en interaction avec le domaine BH3 de la protéine effectrice BAX
- Figure 11** - Affinités de liaison entre les BH3-only et les protéines anti-apoptotiques
- Figure 12** - Mécanismes fondamentaux proposés par 3 modèles pour la régulation de la MOMP par les protéines de la famille BCL-2
- Figure 13** - Changement de conformation de la protéine effectrice BAK lors de son activation et formation d'un dimère pour former le pore à la MOM
- Figure 14** - Notion de priming mitochondrial
- Figure 15** - Mécanisme d'action d'un PROTAC et structure du PROTAC DT2216 ciblant la protéine BCL-XL
- Figure 16** - Organisation génique des VDACS humains
- Figure 17** - Structures 3D des protéines VDAC1, VDAC2 et VDAC3

Figure 18 - Expression des gènes VDACs chez l'Homme dans différents tissus

Figure 19 - Résidus impliqués dans les interactions entre VDAC2 et BAK chez la souris

Figure 20 - Prédiction du site d'interaction entre VDAC2 et l'Efsevin

Figure 21 - Les effecteurs BAK et BAX interagissent avec les protéines anti-apoptotiques

Figure 22 - Structure des mitochondries des cellules CTR et VDAC2-KO dans les lignées KMM1 et KMS12PE

Figure 23 - Interaction endogène entre les protéines VDAC2 et BAX par cross-linking

Figure 24 - Localisation cellulaire de BAK et BAX dans les cellules CTR et VDAC2-KO

Figure 25 - VDAC2 joue un rôle dans la stabilité de la protéine BAK

Figure 26 - Les cellules BAX-KO ne présentent pas de modification de leur priming mitochondrial

Figure 27 - Sensibilisation à différents signaux apoptotiques par l'extinction transitoire de VDAC2

Figure 28 - Diminution du priming mitochondrial par un siRNA à long terme dirigé contre VDAC2

Figure 29 - La sensibilisation à la mort cellulaire avec l'Efsevin est proportionnelle à l'expression protéique de VDAC2

Figure 30 - L'Efsevin en combinaison avec le A1155643 sensibilise les HMCLs

Tableau 1 - Classification des anomalies génétiques primaires du Myélome Multiple

Tableau 2 - Classification des anomalies génétiques secondaires du Myélome Multiple

Tableau 3 - Les principaux BH3-mimétiques développés

LISTES DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

Acides aminés : aa

Ag : Antigène

AML : Leucémie Aigüe Myéloïde

APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (Facteur d'activation de la protéase apoptotique 1)

ASCT : Autologous Stem Cell Transplantation (Transplantation de cellules souches autologues)

BAD : Bcl-2 Associated Agonist Of Cell Death

BAK : Bcl-2 homologous Antagonist Killer

BAX : Bcl-2-like protein 4

BCL-2 : B-Cell Lymphoma-2

BCL-XL : B-Cell Lymphoma-extra large

BCL-W : BCL-2-like protein 2

BCMA : B-Cell Maturation Antigen (Antigène de Maturation des lymphocytes B)

BCR : Récepteur des Cellules B

BFL-1 ou BCL2A1 : BCL-2-related protein A1

BH : domaine d'Homologie Bcl-2

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

BIK : BCL-2-interacting killer

BIM : Bcl-2-like protein 11

BMF : Bcl-2-Modifying Factor

BN-PAGE : Électrophorèse sur gel bleu-natif

BOK : Bcl-2-related Ovarian Killer

Ca²⁺ : Calcium

Cycle TCA : Cycle des Acides Tricarboxyliques

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DLBCL : Lymphome diffus à grande cellule

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FasR : les Récepteurs Fas

FDA : Food Drug Administration

FISH : Hybridation Fluorescente *In Situ*

GPRC5D : Récepteur couplé aux Protéines G, de la famille C, groupe 5, membre D

HMCLs : Human Myeloma Cell Lines (Lignées cellulaires humaines de Myélome Multiple)

HRK : Harakiri, BCL2 Interacting Protein

HTRA2/Omi : Sérine à protéases oligomériques à haute température (HtrA) 2

HY : Hyperdiploïde

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein (Protéine inhibitrice de l'apoptose)

ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase

Ig : Immunoglobuline

IMiDs : Immunomodulateurs

IMS : InterMembrane Space (Espace intermembranaire)

IMWG : International Myeloma Working Group

IP3R : récepteurs à l'inositol triphosphate

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

K⁺ : Potassium

KO : Knock-Out

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LCM : Lymphome à Cellules du Manteau

MA : Millions d'Années

MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia sequence-1

MCU : Uniporteur de Calcium Mitochondrial

MEFs : Mouse Embryonic Fibroblasts (Fibroblastes embryonnaires de souris)

MGUS : Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (Gammopathie monoclonale de signification indéterminée)

MM : Myélome Multiple

MIM : Mitochondrial Inner Membrane (Membrane Interne Mitochondriale)

MO : Moelle Osseuse

MOM : Mitochondrial Outer Membrane (Membrane Externe Mitochondriale)

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation (Perméabilisation de la Membrane Externe Mitochondriale)

MRD : Minimal Residual Disease (Maladie Résiduelle)

mtADN : ADN mitochondrial

Na⁺ : Sodium

NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules

OS : Overall-Survival (Survie globale)

OXPHOS : Phosphorylation Oxydative

PCL : Plasma Cell Leukemia (Leucémie à plasmocytes)

PI : Inhibiteurs du Protéasome

pPCL : primary Plasma Cell Leukemia (Leucémie à plasmocytes primaire)

PROTAC : PROteolysis-Targeting Chimeras

PTP : Pore de Transition de Perméabilité

PUMA : P53 upregulated modulator of apoptosis

RAG : Recombination-Activating Genes

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces réactives à l'oxygène)

RRMM : Refractory or Relapsed Multiple Myeloma (Myélome Multiple en Rechute ou Réfractaire)

RyR2 : Récepteur à la Ryanodine 2

SMAC/DIABLO : Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI

SMM : Smoldering Multiple Myeloma (Myélome Multiple Indolent)

sPCL : secondary Plasma Cell Leukemia (Leucémie à plasmocytes secondaire)

SSP : Survie Sans Progression

TM : segment transmembranaire

TNF : Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

TNFRSF : Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (Super famille des récepteurs de mort cellulaire).

TOM : Transporter Outer Membrane

TRADD : TNF Receptor type 1 Associated Death Domain

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Récepteurs du ligand induisant l'apoptose liée au TNF)

Ub : Ubiquitine

VDACs : Voltage Dependent Anion Channels

VHL : Von Hippel-Lindau E3 ligase

XIAP : X-linked IAP

$\Delta\Psi_m$: dépolarisation du potentiel mitochondrial transmembranaire

INTRODUCTION

I) Le Myélome Multiple

a. Développement du Myélome Multiple et des Leucémies à Plasmocytes

1. Origine des plasmocytes

Les plasmocytes sont les cellules correspondant à la différenciation terminale de la lignée B, processus ordonné suivant des stades de maturation bien définis. Les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (MO) se développent en précurseurs très précoces des cellules B que l'on nomme cellules pro- puis pré-B. Ces cellules migrent dans le sang périphérique et sont considérées comme des cellules B immatures. Elles atteignent le centre germinatif des organes lymphoïdes périphériques, ou secondaires, et ces cellules B naïves peuvent être activées par des antigènes (Ags). Elles deviennent alors des cellules effectrices spécifiques qui finissent le processus de maturation. La différenciation des lymphocytes B aboutit à la génération de deux types cellulaires, les cellules B mémoires et les plasmocytes, sécrétants d'anticorps (Acs), qui colonisent à nouveau la MO (Johnsen et al., 2014).

Les plasmocytes permettent la production d'anticorps, ou immunoglobulines (Igs). Les Igs, composées de deux chaînes lourdes (IgG, IgA, IgD, IgE ou IgM) et deux chaînes légères (kappa ou lambda), permettent une grande diversité. Les Igs circulent dans le sang et permettent une réponse immunitaire humorale par la reconnaissance spécifique d'Ags à la surface des cellules ou des bactéries. L'acquisition d'anticorps de haute affinité nécessite divers processus de modifications génétiques des lymphocytes B qui peuvent aboutir à des erreurs (translocations, mutations...) et entraîner le développement d'hémopathies B (Nutt et al., 2015 ; Seifert et al., 2019). En effet, les cellules au stade pro-B présentent à leur surface des Igs constituées de deux régions : une région variable (V), permettant l'interaction avec l'Ag, et une région constante (C), qui assure les fonctions effectrices des Igs. Pour obtenir des Igs fonctionnelles, les cellules doivent établir des réarrangements des segments d'ADN qui codent pour les régions de la chaîne lourde (H). Pour permettre ces réarrangements, un processus de recombinaison des segments VH (variable), DH (diversité) et JH (jonction) sur le chromosome 14 se met en place. Cette recombinaison, nommée aussi commutation de classe ou « switch » de recombinaison des Igs, est médiée par les enzymes RAG (Recombination-Activating Genes). Elle permet de créer une diversité des Igs au sein du locus IgH (Nutt et al., 2015 ; Seifert et al., 2019).

Les réarrangements des loci des chaînes d'Igs permettent ainsi l'assemblage et l'expression des récepteurs des cellules B (BCR), et marque le stade des cellules B immatures. Ensuite, les cellules B peuvent passer de la MO à la périphérie et aux tissus lymphoïdes secondaires, où elles deviennent matures (Barwick et al., 2019a). Parallèlement, les marqueurs de surface

des cellules B sont exprimés de manière différentielle tout au long de la différenciation lymphocytaire B, où elles assurent et régulent la communication avec l'environnement extracellulaire et initient la signalisation des voies intracellulaires. Le marqueur de surface CD19 est spécifiquement exprimé sur toutes les cellules de la différenciation lymphocytaire B. Le CD38 est le marqueur spécifique exprimé à la surface des plasmocytes (Johnsen et al., 2014).

2. Développement et stratification de la maladie

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne B hétérogène, caractérisée par l'envahissement de plasmocytes tumoraux dans la MO. Dans le cas d'un MM, un plasmocyte anormal se multiplie et sécrète une Ig monoclonale. Les plasmocytes tumoraux, qui ne produiront plus qu'un seul type d'Ig, ne pourront pas jouer leur rôle dans la réponse immunitaire humorale. Bien que l'origine de la transformation tumorale des plasmocytes ne soit pas clairement définie, elle serait liée à une erreur lors du réarrangement V(D)J et les plasmocytes seraient encore aptes à migrer vers la MO (Barwick et al., 2019a). Les cellules myélomateuses peuvent s'accumuler dans la MO et passent rarement dans le sang. Dans de rares cas, les cellules malignes se disséminent dans le sang, on parle alors d'une forme leucémique de la pathologie, les leucémies à plasmocytes (Gundesen et al., 2019).

Le MM symptomatique est précédé de deux étapes dites « indolentes ou asymptomatiques » (Figure 1). Tout d'abord, l'étape pré-maligne asymptomatique de la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS pour « Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance ») (Landgren et al., 2009). Cette étape présente un faible pourcentage de cellules pré-malignes, inférieur à 10%, produisant une Ig monoclonale qui peut rester en dormance pendant plusieurs années, sans proliférer. Elle nécessite plusieurs facteurs pour contribuer à sa transformation maligne, comme par exemple une acquisition progressive d'altérations génétiques.

Après cette étape, il existe une étape définie comme un stade de « transition » avant l'apparition d'un MM symptomatique, un myélome indolent (SMM pour « Smoldering Multiple Myeloma »). Cette étape, asymptomatique, est caractérisée par la présence d'un nombre plus important de plasmocytes anormaux, plus de 10% sécrétant une Ig monoclonale ou par un pic d'Ig monoclonal supérieur à 30g/L. Les patients présentant un SMM à haut risque ont un risque de 50% de progresser vers un MM dans les deux années suivant leur diagnostic (Mateos et al., 2020).

Après ces deux étapes pré-malignes, c'est l'apparition de symptômes, que l'on nomme critères « CRAB » qui conduiront au développement d'un MM symptomatique. Après traitement, un faible pourcentage de cellules tumorales peut aussi réussir à persister dans le corps. Cette condition est connue comme maladie résiduelle ou MRD (Minimal Residual Disease). Elle est difficilement détectable et mesurable. Il peut s'écouler plusieurs années avant qu'un patient rechute. Aujourd'hui, il existe des technologies permettant sa détection, comme le séquençage nouvelle génération et la cytométrie en flux de nouvelle génération qui sont des procédures validées et standardisées capables d'évaluer des seuils de sensibilité élevés, idéalement 10^{-6} (Medina-Herrera et al., 2023).

Malgré les progrès thérapeutiques considérables, la maladie rechute constamment. On parle alors de MM réfractaire ou en rechute (RRMM pour « Refractory or Relapsed Multiple Myeloma ») (Rodriguez-Otero et al., 2021).

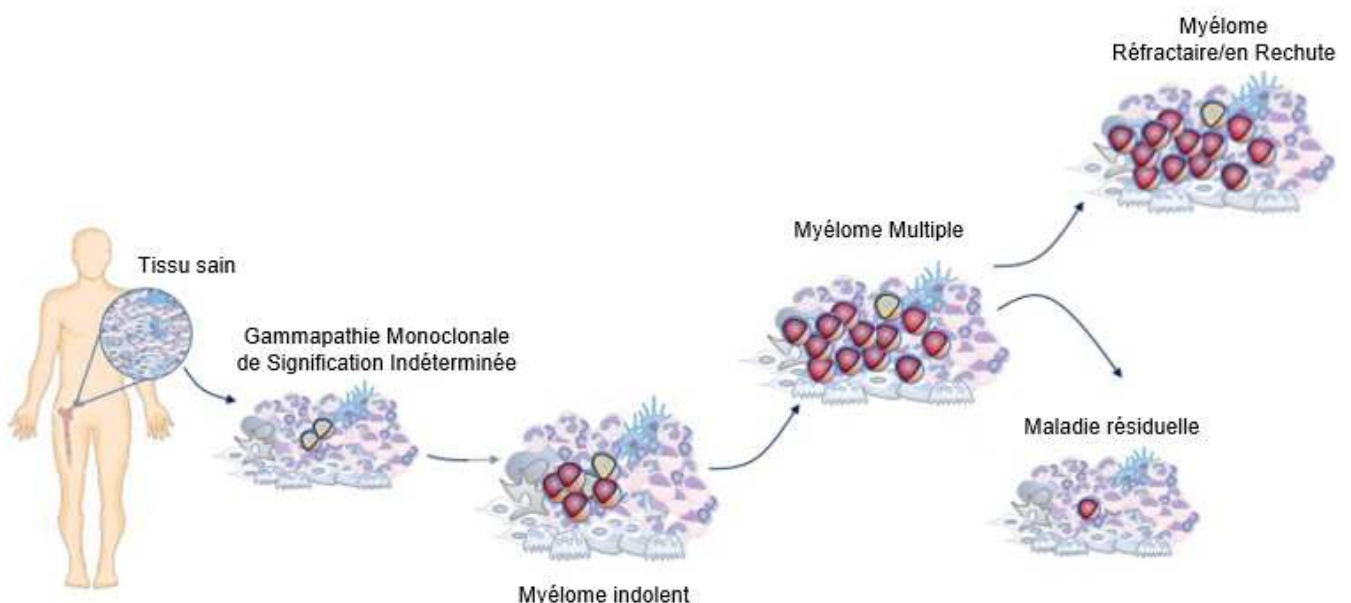


Figure 1 - Les différentes étapes de l'évolution d'un Myélome Multiple

Cette figure illustre l'évolution du myélome multiple (MM) à partir d'un état pré malin, la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), en passant par le myélome indolent (SMM), jusqu'au développement de la maladie (MM). Dans certains cas, suite au traitement, quelques cellules tumorales peuvent persister, on parle alors de maladie résiduelle (MRD). Dans d'autres cas, le patient peut soit rechuter de son traitement, soit en être réfractaire, c'est le stade RRMM. Adapté de Rodriguez-Otero P et al, Cancer Treatment Reviews (2021).

Les leucémies à plasmocytes ou Plasma Cell Leukemia (PCL), rare forme de la pathologie où les cellules se disséminent dans le sang, présentent des caractéristiques biologiques et cliniques distinctes par rapport au MM. C'est une forme rare de dyscrasie plasmocytaire. Cette pathologie est beaucoup plus rare que le MM et est associée à une faible survie des patients

(Ramsingh et al., 2009). Il existe deux formes de PCL. La première est définie comme une leucémie à plasmocytes « primaire » (pPCL) lorsque la pathologie est détectée au moment du diagnostic. La seconde est définie comme une leucémie à plasmocytes « secondaire » (sPCL) lorsqu'elle survient chez les patients ayant rechuté d'un MM (Mina et al., 2017). Concernant le ratio que l'on peut avoir entre les deux formes, on retrouve environ 60 à 70% de pPCL contre 30 à 40% de sPCL (Pagano et al., 2011).

3. Épidémiologie

Le MM est le deuxième cancer hématologique le plus fréquent derrière les lymphomes B, puisqu'il représente 2% de tous les cancers. Il est défini comme étant une pathologie du sujet âgé puisque l'âge médian au diagnostic est estimé entre 65 et 75 ans. Le stade MGUS représente 3% de la population de 50 ans et plus, et seulement 1% progressera chaque année vers un stade de MM (Kyle et al., 2018). En 2018, l'Observatoire mondial du cancer (GLOBOCAN) a recensé 160 000 cas de MM dans le monde, soit une estimation à 100 000 nouveaux cas tous les ans (Padala et al., 2021). Padala et ses collaborateurs démontrent que la survenue d'un MM chez les hommes est 1,5 fois plus fréquente que chez les femmes. De plus, le MM serait 2 fois plus fréquent dans la population afro-américaine que dans les autres populations.

La survie globale (pour Overall Survival « OS ») d'un patient est calculée à partir de l'entrée du patient dans une étude clinique, jusqu'à son décès. Dans les années 1960, l'OS des patients était estimée à 1-2 ans (Richardson et al., 2011). Avec l'apparition dans les années 1990 de l'autogreffe et des nouveaux traitements, l'OS des patients est passée à 5 ans (Kumar et al., 2014). Aujourd'hui, l'espérance de vie des patients s'est nettement améliorée et on peut maintenant estimer l'OS des patients à presque 10 ans (Figure 2) (Puertas et al., 2023). Cela montre que les traitements s'améliorent au fil des années, et la survie des patients pourrait bien encore être améliorée, notamment avec les nouvelles immunothérapies (Moreau et al., 2019). Malheureusement, même si la prise en charge et les traitements des patients s'améliorent au fil des années, le MM reste à ce jour une maladie incurable, avec environ 100 000 décès par an dans le monde (Cowan et al., 2018), soit environ 1,1% de l'ensemble des décès dus à un cancer.

La PCL est une maladie rare puisqu'elle représente entre 0,5 à 4% des patients diagnostiqués d'abord comme un MM (Musto et al., 2019). La survie des patients pour cette pathologie est médiocre. En effet, l'OS a été estimée à environ 12 mois pour les pPCL (Gonsalves et al., 2014). En revanche, la survie des patients atteints de sPCL est bien plus faible, avec une OS estimée à moins de 6 mois (Tiedemann et al., 2008). Malgré l'apparition de nouvelles

thérapies et de l'autogreffe, une étude récente a montré que l'OS des patients atteints de pPCL et sPCL ne s'améliore presque pas, puisque sur 25 échantillons de pPCL et 19 de sPCL, l'OS atteint les 17 mois pour les pPCL et seulement 5 mois pour les sPCL (Figure 3) (Papadimitriou et al., 2022).

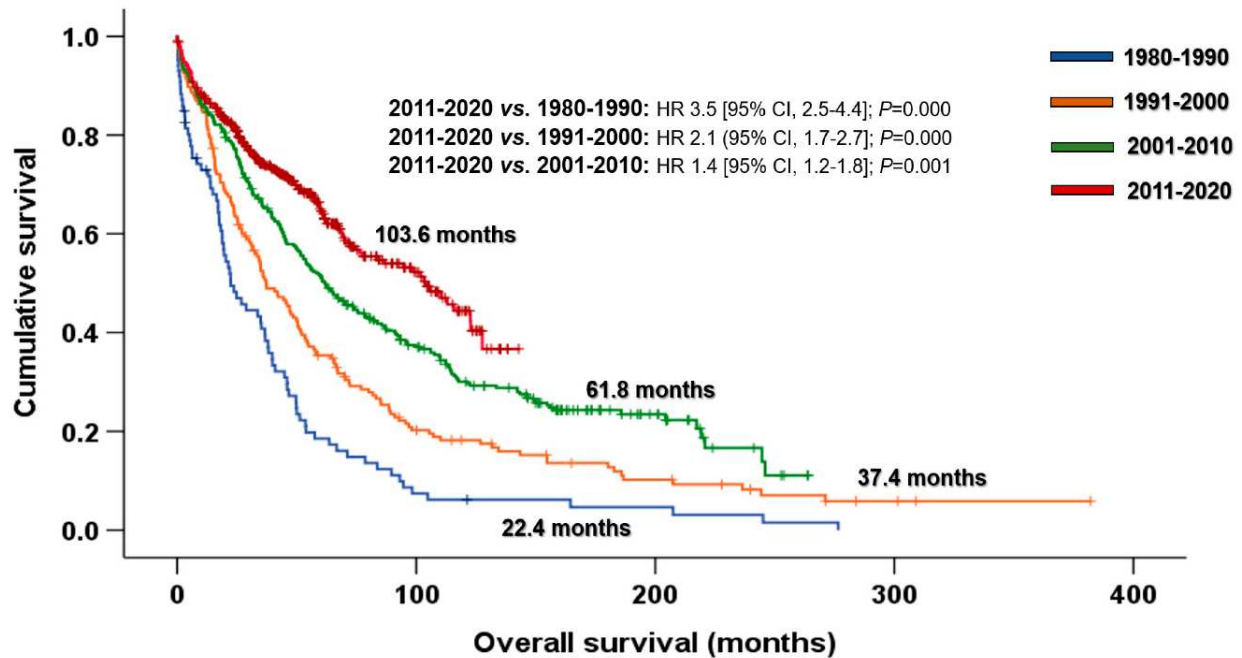


Figure 2 - Courbes de survie de patients atteints de Myélome Multiple ces 40 dernières années

Adaptation des courbes de survie (en mois) de patients atteints de MM, allant de 1980 à 2020, d'après Puertas B et al. *Cancers* (2023).

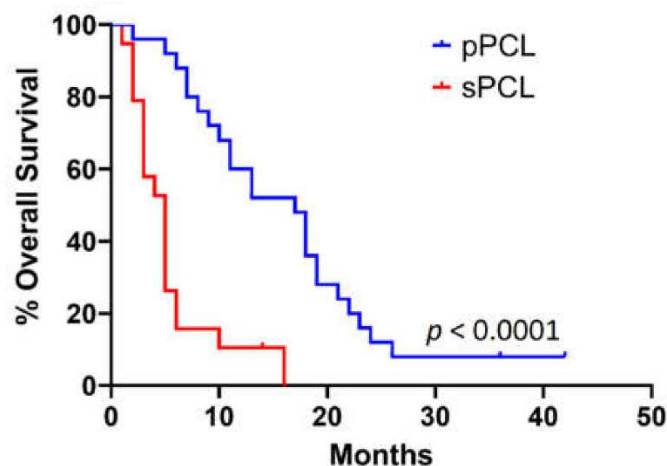


Figure 3 - Courbes de survie de patients atteints de Leucémies à Plasmocytes primaire ou secondaire

Adaptation des courbes de survie (en mois) de patients atteints de leucémie à plasmocytes primaire (pPCL) ou de leucémie à plasmocytes secondaire (sPCL), d'après Papadimitriou et al. *Biomedicines* (2022).

4. Signes cliniques et diagnostic de la pathologie

Un des premiers signes cliniques observés de la pathologie, souvent découvert de manière fortuite, est l'apparition d'un pic de l'Ig monoclonale. Cette Ig est aussi appelée « protéine M ». La protéine M produite par les plasmocytes malins est une IgG chez environ 55% des patients et une IgA dans environ 20% des cas. Les myélomes à IgM et à IgD représentent environ 1% des cas chacun ; le myélome à IgD étant plus fréquent chez les patients d'origine asiatique. Le myélome à IgE est extrêmement rare. Pour quantifier cette protéine M, une électrophorèse des protéines mais aussi une immunoélectrophorèse sont réalisées sur un prélèvement de sérum et sur un prélèvement d'urine concentrée (Sive et al., 2021).

Le stade MGUS est défini par un pourcentage de plasmocytes inférieur à 10%, un pic monoclonal d'Ig inférieur à 30g/L et l'absence de signes cliniques d'atteinte d'organe. A partir du stade SMM, la maladie se caractérise par la présence de plus de 10% de plasmocytes tumoraux dans la MO ou par un taux de protéine M dans le sérum supérieur ou égal à 30g/L (Rajkumar et al., 2014). Le MM symptomatique est défini par la présence de plus de 10% de plasmocytes. Ce qui va le différencier des stade MGUS et SMM, ce sont les caractérisations physiques de la maladie. On les définit par les critères « CRAB ». Le tout premier critère est l'hyperCalcémie, c'est-à-dire une augmentation anormale du taux de calcium dans le sang supérieur à 2.75mM. Ensuite, le MM est caractérisé par une insuffisance Rénale (clairance de la créatinine <40mL/min), puis une Anémie (<10g/dL, ou -2g/dL par rapport à la norme inférieure du laboratoire). Le dernier critère repose sur l'apparition de lésions osseuses ostéolytiques (lytic Bone lesions) (Rajkumar, 2022).

En 2014, l'« International Myeloma Working Group » (IMWG) se réunit afin de revoir les critères de diagnostic du MM. Etant donné le caractère hétérogène de la pathologie, différents biomarqueurs sont nécessaires pour la diagnostiquer (Rajkumar et al., 2014). Ainsi, ce groupe inclut 3 nouveaux biomarqueurs : Un taux de plasmocytes monoclonaux dans la MO supérieur à 60 % par rapport au nombre de cellules totales. Le dosage des chaînes légères d'Igs κ et λ qui circulent sans être liées aux chaînes lourdes dans le sérum doit être supérieur ou égal à 100mg/L. Enfin, plus d'une lésion focale doit être observée par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (Rajkumar, 2022).

Il a été établi en 1974 par Kyle et ses collaborateurs que le diagnostic de la PCL s'effectue par la présence de plus de 20% de plasmocytes tumoraux dans le sang périphérique correspondant à une numération absolue supérieure à $2 \times 10^9/L$ (Kyle et al., 1974). Plus récemment, un consensus a été établi par l'IMWG pour dire qu'au moins 5% de plasmocytes

tumoraux dans le sang périphérique étaient suffisants pour diagnostiquer une PCL (Fernández de Larrea et al., 2021). En effet, deux études récentes ont montré que les patients diagnostiqués avec une PCL par rapport à $\geq 20\%$ de plasmocytes tumoraux étaient les mêmes patients que ceux identifiés par la présence de $\geq 5\%$ de plasmocytes tumoraux. De plus, ils ont montré que la survie des patients avec moins de 5% de plasmocytes dans le sang est beaucoup plus importante que ceux supérieurs à 5% (Granell et al., 2017 ; Ravi et al., 2018).

b. Anomalies cytogénétiques dans le Myélome Multiple

Le MM est caractérisé par un spectre large d'anomalies génétiques, que l'on définit comme des événements oncogéniques, ayant lieu pendant le développement d'un MM. L'utilisation de la technique de Fluorescence par Hybridation *In Situ* (FISH) a permis d'identifier ses événements oncogéniques et de mieux comprendre la maladie. Cette technique est d'ailleurs maintenant utilisée en routine en clinique (Barwick et al., 2019a).

1. Anomalies génétiques primaires

Le MM se caractérise par une forte hétérogénéité moléculaire. Les translocations primaires du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgH), que l'on retrouve sur le chromosome 14, avec cinq partenaires chromosomiques récurrents (4p16, 6p21, 11q13, 16q23 et 20q11) (Fonseca et al., 2003) et l'hyperdiploïdie (typiquement avec des trisomies des chromosomes impairs 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21) (Avet-Loiseau et al., 2009) sont des événements précoces et associés à l'initiation d'une prolifération limitée de plasmocytes clonaux vers le premier stade de la maladie, à savoir le MGUS.

Un des événements oncogénique primaire majeur est la dérégulation des cyclines D, la cycline D1, la cycline D2 et la cycline D3 codants pour les gènes *CCND1*, *CCND2* et *CCND3* respectivement. Les cyclines sont des protéines essentielles dans la régulation du cycle cellulaire et de la transcription. Ainsi, les translocations t(11;14), t(12;14) et t(6;14) vont permettre la surexpression des gènes *CCND1*, *CCND2* et *CCND3*, respectivement. La translocation t(11;14) est la translocation récurrente la plus courante puisqu'elle est observée chez 15 à 20 % des patients atteints de MM et est actuellement classée comme un marqueur génétique de risque standard pour les patients nouvellement diagnostiqués. Certaines études récentes ont suggéré que la t(11;14) pourrait aussi être un marqueur de risque intermédiaire dans le MM (Kaufman et al., 2016). La translocation t(12;14) représente environ 1% des patients atteints de MM et la t(6;14) jusqu'à 4%. Cette surexpression des cyclines a pour conséquence une dérégulation du cycle cellulaire et semble être un événement précoce dans les tumeurs malignes plasmocytaires (Avet-Loiseau et al., 1998 ; Shaughnessy et al., 2001).

Cependant, il n'existe pas de corrélation directe entre la surexpression des cyclines D et l'index de prolifération cellulaire ([Bergsagel et al., 2005](#)).

La translocation t(4 ;14) ou translocation IgH-MMSET est la seconde translocation récurrente la plus courante, représentant environ 15% des patients atteints de MM et est de mauvais pronostic. Cette translocation entraîne une dérégulation de *MMSET* (aussi appelé *WHSC1* ou encore *NSD2*) mais aussi parfois de *FGFR3* ([Chesi et al., 1998b](#)). *MMSET* est une histone 3 lysine 36 (HEK36) méthyltransférase ; qui catalyse la di-méthylation de HEK36. Ceci entraîne une accessibilité à la chromatine. Ainsi, sa surexpression dans le MM va entraîner une dérégulation d'expression de gènes ([Popovic et al., 2014](#)). *FGFR3* est un gène responsable de la production de la protéine FGFR3, un récepteur à activité tyrosine kinase. Quand le récepteur est activé, il devient capable de lier et de phosphoryler des protéines effectrices déclenchant ainsi dans la cellule différentes cascades de signalisation, permettant notamment l'inhibition du développement osseux. De façon tout à fait surprenante, il a été montré que, parallèlement à son rôle inhibiteur dans le développement osseux, *FGFR3* est un proto-oncogène. La contribution réelle de *FGFR3* à la pathogénie du MM n'est cependant pas clairement établie ([Keats et al., 2003](#)).

Les translocations récurrentes primaires les moins courantes sont les t(14 ;16) et les t(14 ;20) qui induisent respectivement la surexpression des gènes *MAF* et *MAFB*. En effet, elles représentent entre 5 et 10% des patients ([Chesi et al., 1998a](#) ; [Hanamura et al., 2001](#)). *MAF* est un facteur de transcription qui peut induire l'expression de *CCND2*, ce qui entraîne une augmentation de l'adhésion aux cellules stromales de la MO ([Hurt et al., 2004](#)). En plus de la surexpression de *MAF*, la translocation perturbe l'expression de *WWOX*, un gène suppresseur de tumeur ([Bednarek et al., 2001](#)). La t(14;16) n'a pas d'impact pronostic si elle est isolée mais en combinaison avec d'autres anomalies cytogénétiques, elle peut être considérée comme un facteur de haut risque dans le MM ([Schavgoulidze et al., 2023](#)).

L'hyperdiploïdie est l'autre type d'événement génétique primaire fréquent dans les tumeurs plasmocytaires puisqu'il concerne la moitié des patients (Tableau 1). Ce groupe ne présente pas de translocation récurrente d'IgH, et les myélomes hyperdiploïdes ont tendance à avoir un meilleur pronostic ([Avet-Loiseau et al., 2009](#) ; [Barwick et al., 2019b](#) ; [Fonseca et al., 2003](#)). L'hyperdiploïdie se caractérise par la présence d'une copie supplémentaire (trisomies) d'un ou plusieurs des chromosomes impairs 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21. La base de la sélection non aléatoire des chromosomes impairs est à ce jour inconnue ([Brigle and Rogers, 2017](#)). Contrairement aux translocations récurrentes d'IgH, il est très difficile d'attribuer les effets oncogéniques de l'hyperdiploïdie à un ou plusieurs éléments causaux en raison de

l'aneuploïdie de nombreux chromosomes. Le bon pronostic du myélome hyperdiploïde et le faible nombre de modèles de lignées cellulaires suggèrent que l'hyperdiploïdie entraîne rarement une forme grave de la maladie comme une sPCL. L'hypothèse des chercheurs est que l'hyperdiploïdie se produit lors d'une prolifération rapide des centres germinatifs qui entraîne des erreurs de ségrégation chromosomique. Cependant, il n'est pas clair s'il s'agit d'un événement catastrophique ou une série d'erreurs séquentielles qui doivent se produire avant une excroissance clonale ([Barwick et al., 2019a](#)).

Le tableau 1 ci-dessous résume les anomalies génétiques primaires du MM :

| Sous-type | Gène/chromosomes affectés | % de patients MM concernés |
|--|--------------------------------|----------------------------|
| Hyperdiploïdie | 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 | 50 |
| Translocation IgH | | |
| t(11;14) (q13;q32) | <i>CCND1</i> (cyclin D1) | 20 |
| t(6;14) (p21;q32) | <i>CCND3</i> (cyclin D3) | 4 |
| t(4;14) (p16;q32) | <i>MMSET</i> (ou <i>NSD2</i>) | 15 |
| t(14;16) (q32;q23) | <i>MAF</i> | 5-10 |
| t(14;20) (q32;q11) | <i>MAFB</i> | <1 |
| Autres translocations IgH, autres anomalies cytogénétiques ou normaux | | 5 |

Tableau 1 - Classification des anomalies génétiques primaires du Myélome Multiple

Ce tableau est adapté de [Kumar S et al., Blood \(2012\)](#) et [Rajkumar SV, Am J Hematol \(2022\)](#).

Les translocations récurrentes et l'hyperdiploïdie sont clonaux à tous les stades de la gammopathie, ce qui est cohérent avec le fait qu'il s'agit d'événements génétiques fondateurs. Malgré ces changements génomiques importants, presque tous les myélomes présentent de multiples événements génétiques au moment du diagnostic, ce qui suggère que des événements primaires initient le MGUS, mais ne sont pas suffisants pour provoquer une maladie symptomatique ([Barwick et al., 2019a](#)).

2. Anomalies génétiques secondaires

L'acquisition d'anomalies chromosomiques secondaires, telles que des délétions de parties de chromosomes ou des translocations chromosomiques secondaires, et de mutations impliquant des gènes individuels entraîne une progression par étapes du MGUS vers le MM symptomatique, et enfin, vers des formes agressives de MM, telles que la sPCL ([van de Donk et al., 2012](#)). Les événements génétiques secondaires sont des facteurs aggravants de la pathologie puisque pour la plupart, ils seront considérés comme des facteurs de mauvais pronostic.

La délétion 13q (ou Del(13q)) touche près de la moitié des patients atteints de MM (44%) et est très rarement retrouvée au stade MGUS (Avet-Loiseau et al., 2007). Avant considérée comme un marqueur de mauvais pronostic, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de le surmonter (Jagannath et al., 2007). La perte du bras du chromosome 13q contribue à la pathogénie du MM et est souvent mono-allélique. La Del(13q) va induire l'inactivation du gène *RB1*, gène suppresseur de tumeur régulant négativement le cycle cellulaire (Kuehl and Bergsagel, 2002). Cette délétion peut aussi conduire à la mutation du gène *DIS3*, impliqué dans la dégradation des ARN (Walker et al., 2018).

Le gain du 1q (+1q) touche environ 40% des patients au diagnostic et 70% à la rechute et est associé à un mauvais pronostic (Fonseca et al., 2006 ; Gomez-Bougie et al., 2018). En effet, l'amplification de ce bras est associée à un mauvais pronostic, avec une signature génique dite à « haut risque » (Shaughnessy, 2005 ; Walker et al., 2019). Le gain du 1q décrit les patients avec seulement une copie supplémentaire de 1q (3 copies totales). Toutefois, certains patients peuvent avoir deux copies supplémentaires (4 copies au totales) ou plus, on parle alors d'une amplification du 1q ou amp(1q) (Schmidt et al., 2021). Parmi les gènes retrouvés sur le bras du chromosome 1q, on retrouve des oncogènes, comme *CKS1B* qui régule le cycle cellulaire. On retrouve aussi le gène codant pour la protéine MCL-1, protéine de la famille BCL-2 essentielle à la survie cellulaire (Peperzak et al., 2013). Ainsi, la surexpression de MCL-1 est très intéressante à cibler thérapeutiquement chez ses patients (Slomp et al., 2019).

La délétion du chromosome 1p (ou Del(1p)) survient dans 30% des cas de MM et est aussi associée à un mauvais pronostic mais aussi à une OS plus faible (Schavgoulidze et al., 2023; Walker et al., 2010). La Del(1p) entraîne notamment l'inactivation de *FAM46C*, gène suppresseur de tumeur, et conduit à la survie cellulaire (Zhu et al., 2017).

La délétion 17p (ou Del(17p)) est retrouvée chez 7% de patients atteints de MM au diagnostic et est associée à un facteur de mauvais pronostic du fait de la perte du gène *TP53*, entraînant une instabilité génomique (Corre et al., 2021 ; Durand et al., 2023). On retrouve des mutations de ce gène suppresseur de tumeur dans 7% des cas de MM au diagnostic, qui peut passer à près de 75% chez les patients en rechute (Jovanović et al., 2019).

D'autres délétions, moins étudiées dans le MM ont été identifiées. C'est le cas de la délétion 6q qui est fréquente chez les patients et s'accompagne souvent de la t(4;14). Cependant, elle n'est pas un facteur pronostic pour le MM (Chen et al., 2021). De plus, la perte de la région chromosomique 8p21 est un facteur pronostic indépendant associé à une faible survie chez les patients atteints de MM recevant une autogreffe standard notamment dû au fait que ses

patients présentent une résistance au bortézomib (Duru et al., 2015). Les cas présentant une délétion 16q ou une t(14;16) présentent une expression significativement réduite de *WWOX*, un gène suppresseur de tumeur connu, impliqué dans l'apoptose et la délétion 16q confère un mauvais pronostic (Jenner et al., 2007). L'incidence de la délétion 14q et 11q ont aussi étaient identifiées dans le MM, avec 38% et 7% respectivement (Liebisch et al., 2005).

En plus de toutes ces anomalies chromosomiques, on retrouve encore d'autres translocations. C'est le cas de *myc*, proto-oncogène essentiel dans la régulation de l'expression des gènes mais aussi dans la prolifération cellulaire. La surexpression de *c-myc* par la t(8;14) est retrouvée dans environ 20% des cas de MM, et est beaucoup plus fréquente chez les patients en rechute car elle serait impliquée dans la progression de la maladie (Shou et al., 2000).

De plus, on trouve des mutations fréquentes dans le MM. C'est le cas des mutations de Ras. Les mutations *KRAS* et de *NRAS* représentent environ 40% des cas, avec une répartition équivalente pour chacune des mutations. La voie de signalisation de Ras est impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire, et ses deux mutations peuvent aussi activer la voie de signalisation MAPK dans les lignées cellulaires humaines de MM (HMCLs) (Lin et al., 2019).

Enfin, chez 20% des patients atteints de MM, on peut retrouver des mutations de gènes impliqués dans la voie NFkB, entraînant une signalisation aberrante (Annunziata et al., 2007 ; Keats et al., 2007).

Le tableau 2 ci-dessous résume les anomalies génétiques secondaires du MM et sa fréquence chez les patients au diagnostic :

| Délétion ou Amplification de bras chromosomique / Translocation | Gène(s) affecté(s) | Fréquence MM au diagnostic (%) |
|---|-----------------------------|--------------------------------|
| Délétion 1p | <i>CDKN2C, FAF1, FAM46C</i> | 30 |
| Délétion 6q | | 33 |
| Délétion 8p | | 25 |
| Délétion 13q | <i>RB1, DIS3</i> | 44 |
| Délétion 11q | <i>BIRC2/BIRC3</i> | 7 |
| Délétion 14q | <i>TRAF3</i> | 38 |
| Délétion 16q | <i>WWOX, CYLD</i> | 35 |
| Délétion 17p | <i>TP53</i> | 7 |
| Amplification 1q | <i>MCL1, CKS1B, ILF2</i> | 30 |
| Translocation t(8;14) | <i>MYC</i> | 20 |

Tableau 2 - Classification des anomalies génétiques secondaires du Myélome Multiple

Ce tableau présente la fréquence des anomalies génétiques secondaires chez des patients au diagnostic. Adapté d'après Sonneveld et al Blood (2016).

Le séquençage de l'exome entier dans 33 HMCLs a mis en évidence des mutations et des défauts dans le cycle cellulaire, le gène *TP53*, les gènes impliqués dans la recombinaison/réparation de l'ADN, dans la voie NFκB ou encore des gènes impliqués dans la régulation épigénétique. Cela confirme l'hétérogénéité moléculaire qui peut exister dans le MM (Tessoulin et al., 2018).

La grande hétérogénéité dans le MM est principalement due aux anomalies cytogénétiques. La définition actuelle du profil à haut risque est restrictive et trop simple. Pour adapter le traitement du MM au risque, les chercheurs ont mis en place des « scores » permettant de définir une classification cytogénétique à haut risque. En 2014, le système international révisé de stadification (R-ISS) a été introduit pour développer un système pronostique robuste sur la base de biomarqueurs largement disponibles, et est désormais considéré comme un modèle standard de stratification du risque pour les patients atteints de MM (D'Agostino et al., 2022). Il a été défini que les patients présentant une del(17p), une t(4;14), ou une t(14;16) sont à haut risque (Perrot et al., 2019). De plus, les patients présentant un gain 1q ou une amplification 1q, sont aussi associés à un haut risque. Pour mon projet de thèse, nous allons utiliser différentes HMCLs ainsi que des échantillons primaires de patients atteints de MM afin de se rapprocher au mieux de cette hétérogénéité et de pouvoir comprendre et cibler les mécanismes mis en place lors de la résistance aux traitements.

c. Thérapies actuelles et résistances aux traitements dans le Myélome Multiple

La survie des patients atteints de MM a considérablement augmenté ces 15-20 dernières années (Kumar et al., 2012). Ceci peut être expliqué grâce au développement de plusieurs classes thérapeutiques, comme les immunomodulateurs (IMiDs), les inhibiteurs du protéasome (PI) ou encore les immunothérapies, comme les cellules « CAR-T ».

1. Les traitements utilisés pour la thérapie du Myélome Multiple

La chimiothérapie conventionnelle dans le MM repose principalement sur l'utilisation d'agents alkylants, tels que le melphalan, la bendamustine ou encore la cyclophosphamide (Costa et al., 2023). Les agents alkylants forment des liaisons covalentes avec l'ADN, entravant ainsi la réplication et la transcription, ce qui déclenche l'apoptose. En combinaison avec la chimiothérapie, on retrouve aussi des molécules appartenant à la famille des corticostéroïdes, comme la dexaméthasone et la prednisone (Kumar et al., 2017). Ces molécules ont un effet anti-inflammatoire.

C'est grâce à l'arrivée de nouvelles molécules, telles que les PI ou encore les IMiDs que des effets bien supérieurs ont pu être observés lors du traitement des patients. En effet, ces thérapies ciblées ont permis une nette amélioration de l'OS des patients (**Kumar et al., 2014**). Parmi les IMiDs, on retrouve le thalidomide, le lénalidomide (revlimid®) ou encore le pomalidomide (**Rajkumar et al., 2005 ; Richardson et al., 2006 ; Shah et al., 2015 ; Singhal et al., 1999**). Les IMiDs se lient à la protéine cereblon, activant son activité E3 ligase, pour permettre l'ubiquitination d'Ikaros et Aiolos, facteurs de transcription spécifiques des cellules B. Les IMiDs peuvent aussi induire des dommages à l'ADN, et avoir une activité anti-inflammatoire (**Ito et al., 2010 ; Lu et al., 2014 ; Parman et al., 1999**).

Pour les PI, on retrouve le bortézomib (velcade®), le carfilzomib ou encore l'ixazomib (**Gutman et al., 2009 ; Rajkumar et al., 2005b ; Richardson et al., 2005**). Les PI vont donc inhiber le protéasome, qui est le principal régulateur de la dégradation des protéines intracellulaires. Les PI inhibent la dégradation des protéines qui jouent un rôle critique dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules. Les cellules tumorales sont ainsi bloquées dans le cycle cellulaire. La perturbation de ces voies dérégule également les molécules de signalisation essentielles aux interactions entre les cellules myélomateuses et le microenvironnement de la MO, ce qui conduit finalement à l'inhibition de la croissance et à l'apoptose (**Richardson et al., 2006b**).

Enfin, les immunothérapies ont aussi permis d'améliorer ses traitements une nouvelle fois de manière significative. Parmi ces immunothérapies, on peut distinguer 4 groupes : les Acs monoclonaux, les Acs bispécifiques, les Acs conjugués et les cellules CAR-T. Un Ac monoclonal reconnaît spécifiquement un Ag à la surface de la cellule cancéreuse pour permettre son élimination par les cellules immunitaires. Parmi les Acs monoclonaux dans le traitement du MM, on retrouve l'elotuzumab ciblant SLAMF7 puis le daratumumab et l'isatuximab qui ciblent spécifiquement le CD38 (**Lokhorst et al., 2015 ; Lonial et al., 2015 ; Martin et al., 2017**).

Un Ac bispécifique quant à lui cible à la fois la cellule tumorale et un lymphocyte T pour les rapprocher et favoriser une réponse immunitaire. Pour les Acs bispécifiques dans le traitement du MM, on retrouve le teclistamab et l'elranatamab, qui ciblent l'Antigène de Maturation des Lymphocytes B (BCMA) des plasmocytes tumoraux et le CD3 des lymphocytes T normaux (**Lesokhin et al., 2023 ; Moreau et al., 2022**). Il existe un autre Ac bispécifique, le talquetamab. Il cible un autre récepteur à la surface des plasmocytes tumoraux, le GPRC5D (récepteur couplé aux protéines G, de la famille C, groupe 5, membre D) et cible toujours le CD3 des lymphocytes T (**Chari et al., 2022**).

Un Ac conjugué contient un agent cytotoxique avec une cible spécifique que l'on retrouve à la surface du plasmocyte tumoral. Ainsi, l'Ac conjugué que l'on retrouve pour le traitement du MM est le belantamab mafodotin. C'est un Ac ciblant le BCMA couplé à un agent perturbateur des microtubules, le maléimidocaproyl monométhyl auristatine F ([Lonial et al., 2020](#)).

Enfin, la technologie « CAR-T cells » consiste à prélever des lymphocytes T du patient afin de les modifier génétiquement en laboratoire pour obtenir des lymphocytes munis de récepteurs antigéniques chimériques « CAR » pour les réinjecter au patient. Les cellules CAR-T sont modifiées de sorte à reconnaître le BCMA des plasmocytes anormaux dans le cadre du MM. Actuellement, l'idecabtagene vicleucel (Ide-cel) et le ciltacabtagene autoleucel (Cilta-cel) sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des patients atteints de MM en rechute ([Berdeja et al., 2021](#) ; [Munshi et al., 2021](#) ; [Rodriguez-Otero et al., 2023](#)).

2. Le traitement des patients en première ligne

Le traitement des patients atteints de MM repose maintenant sur plusieurs choix. Pour recevoir un traitement particulier, notamment une autogreffe, les patients doivent répondre à certains critères d'éligibilité, résumés dans la revue de Rajkumar en 2022 ([Rajkumar, 2022](#)).

2.1 Le traitement des patients éligibles à t'autogreffe

Le traitement des patients éligibles à l'autogreffe comprend 4 étapes ([Dimopoulos et al., 2021](#)). Premièrement, avant récupération des cellules souches pour l'autogreffe, le patient reçoit 3 ou 4 cycles de thérapie. Cette thérapie est dite « d'induction ». De manière standard, une administration de bortézomib, lénalidomide et dexaméthasone (**VRd**) est effectuée ([Durie et al., 2017](#)). L'ajout de daratumumab avec la combinaison VRD (**DVRd**) montre une réelle efficacité et améliore la survie sans progression (SSP) des patients ([Sonneveld et al., 2024](#)). De plus, l'ajout de daratumumab à la combinaison bortézomib/thalidomide/dexaméthasone (**DaraVTD**) dans le cadre du traitement initial semble améliorer les résultats ([Abdallah and Kumar, 2019](#)).

Par la suite, le patient reçoit l'autogreffe. La Transplantation de Cellules Souches Autologues (ASCT pour « Autologous Stem Cell Transplantation ») de sang périphérique ne peut pas être envisagée chez tous les patients. En effet, ils doivent avoir des fonctions rénales, pulmonaires, cardiaques et hépatiques satisfaisantes. Des essais cliniques récents ont démontré une SSP plus longue, mais aucune amélioration de l'OS lorsque les patients subissent une ASCT lors du traitement initial ([Attal et al., 2017](#) ; [Richardson et al., 2022](#)).

Enfin, il est recommandé un traitement de maintenance par lénalidomide jusqu'à progression. Il a été montré que ce traitement par lénalidomide améliore la SSP mais aussi l'OS (McCarthy et al., 2012; Palumbo et al., 2014) (Figure 4).

2.2 Le traitement des patients non éligibles à l'autogreffe

Les patients qui ne sont pas éligibles à l'ASCT sont souvent les patients très âgés ou les patients présentant des comorbidités. On leur propose alors les mêmes traitements que les patients éligibles à l'ASCT, à savoir la combinaison VRd ou DRd. Chez certains patients, l'ixazomib peut être administré à la place du bortézomib (Facon et al., 2021). Plus récemment, la combinaison VRd avec l'isatuximab a montré une réelle efficacité chez ses patients non éligibles à l'autogreffe et a été récemment approuvé par la FDA (Facon et al., 2024). Enfin, la combinaison bortézomib/melphalan/prednisone (VMP) peut aussi être utilisée chez ses patients (Dimopoulos et al., 2021) (Figure 5). Le lénalidomide a aussi montré son efficacité chez les patients non éligibles à l'ASCT comme traitement de maintenance, et la combinaison bortézomib + lénalidomide est aussi efficace chez les patients considérés à haut risque (Benboubker et al., 2014 ; Dimopoulos et al., 2021).

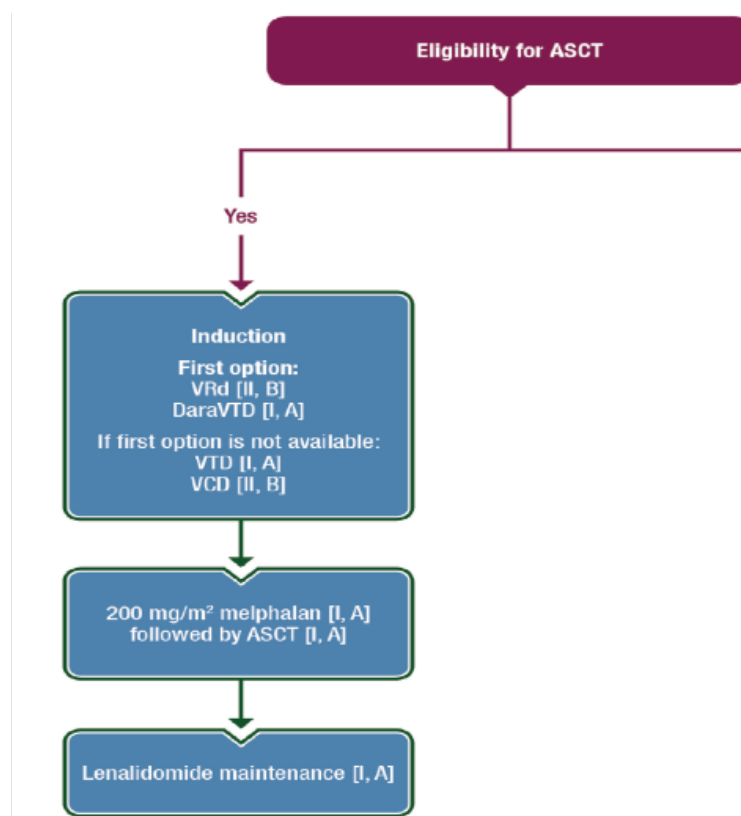


Figure 4 - Traitements des patients éligibles à l'autogreffe

Résumé des traitements administrés pour les patients éligibles à l'ASCT. Adapté de *Dimopoulos et al., Annals of Oncology (2021)*.

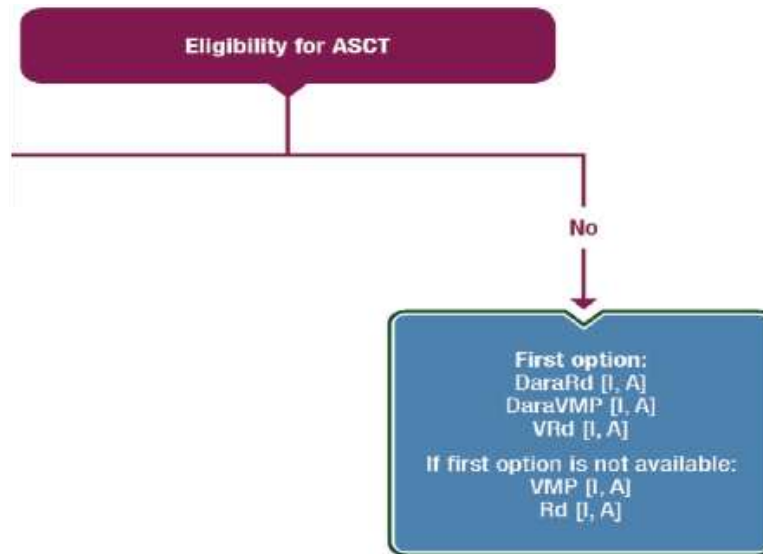


Figure 5 - Traitement des patients non éligibles à l'autogreffe

Résumé des traitements administrés pour les patients non éligibles à l'ASCT. Adapté de [Dimopoulos et al, Annals of Oncology \(2021\)](#).

3. Le traitement des patients en rechute ou réfractaires

Le traitement des patients en rechute est plus complexe, car selon l'agressivité de la rechute, le temps que le patient aura mis à rechuter et s'il devient résistant à certaines thérapies, différentes options pourront être envisagées. En général, il y a deux types de rechute, les patients réfractaires au légalidomide, et les patients non réfractaires au légalidomide. Puis pour chaque cas, les patients réfractaires ou non au daratumumab.

Parmi les traitements possibles pour ses patients, on retrouvera toujours du bortézomib (V), daratumumab (D), légalidomide (R) carfilzomib (K), pomalidomide (P), elotuzumab (E), ixazomib (I), isatuximab (isa), dexaméthasone (d) ou encore de la doxorubicine ou du teclistamab ([Moreau et al., 2022](#)). Pour ce faire, de nombreux essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de ces thérapies et la combinaison de certaines, comme la combinaison DRd, KRd ([Dimopoulos et al., 2020, 2017](#) ; [Siegel et al., 2018](#) ; [Stewart et al., 2015](#)), DVd ([Palumbo et al., 2016](#)), ERd ([Lonial et al., 2015](#)), IRd ([Moreau et al., 2016](#)), DPd, KPd isa-Pd ou encore isa-KPd ([Attal et al., 2019](#) ; [Moreau et al., 2021](#)).

De plus, l'utilisation de BH3-mimétiques ciblant les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, tels que le vénétoclax, ciblant BCL-2, a montré une efficacité, notamment chez les patients avec une t(11 ;14) ([Touzeau et al., 2014](#)). Il n'a pas encore été approuvé pour le

traitement du MM mais est commercialisé, il pourrait donc représenter une bonne option thérapeutique pour les patients en rechute.

Enfin, les CAR-T cells semblent être une thérapie très prometteuse chez les patients en rechute. En effet, une étude sur l'ide-cel a montré que sur 128 patients à la rechute, ce traitement a permis un taux de réponse à 73% (Munshi et al., 2021). Pour le cilta-cel, sur 97 patients, la réponse globale est de 97% avec 67% des patients ayant une réponse complète (Berdeja et al., 2021).

Toutes les possibilités de combinaisons en cours d'essai clinique sont résumées dans la figure ci-dessous adaptée du papier de Rajkumar (2022), et ces mises à jour sur le traitement du MM (Figure 6).

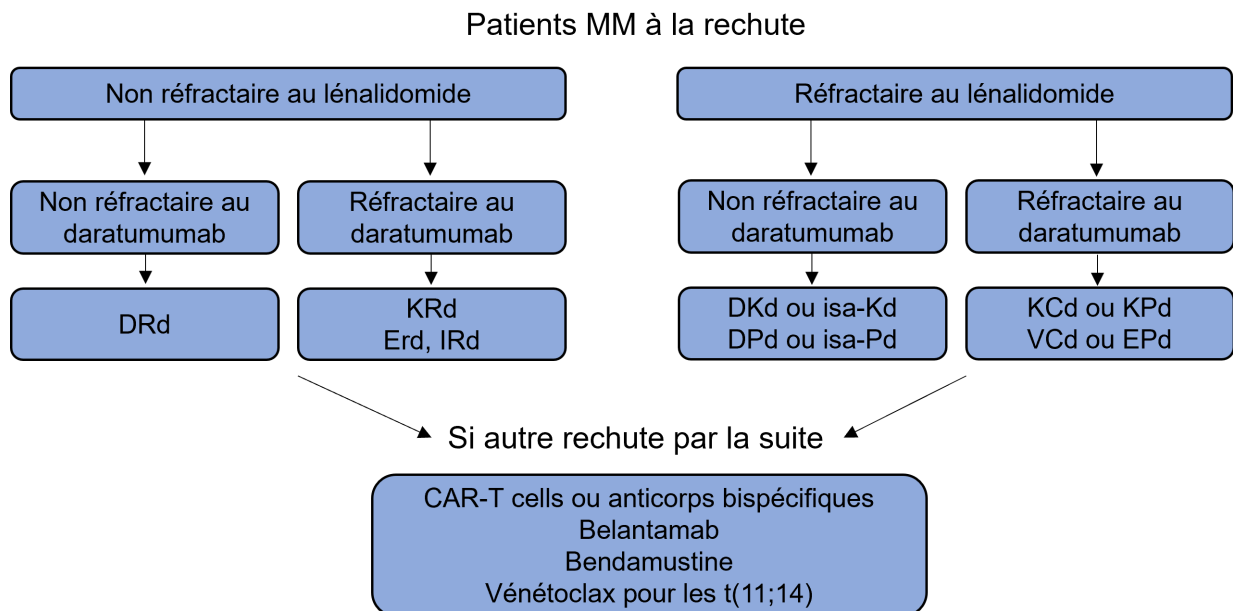


Figure 6 - Traitements des patients à la rechute ou réfractaires

Résumé des traitements administrés pour les patients en rechute ou réfractaires. Adapté de Rajkumar SV, Am J Hematol (2022).

4. Le traitement des leucémies à plasmocytes

Comme il s'agit d'une maladie rare, les essais spécifiquement axés sur le traitement de la PCL, primaire ou secondaire, ont été rares, et les nombreux essais cliniques existants pour le MM ont toujours exclus les patients atteints de PCL (Gowin et al., 2021).

Concernant la pPCL, les recommandations thérapeutiques sont assez similaires à celles du MM. Généralement, la pPCL nécessite un traitement intensif rapide afin de réduire la mortalité précoce et les complications liées à la maladie. Le traitement de ses patients repose sur les mêmes traitements donnés pour les patients atteints de MM, avec l'utilisation des PI, IMiDs, ou encore de la dexaméthasone. Pour les patients éligibles à une transplantation, il est recommandé de recourir à une ASCT suivie d'un traitement de maintenance, notamment avec le lénalidomide, comme pour le MM (Jung and Lee, 2022).

Concernant la sPCL, il n'existe pas de thérapie complètement définie, mais sa prise en charge reflète la prise en charge générale du MM en rechute/réfractaire, à la différence qu'aucune thérapie n'apporte généralement un bénéfice clinique durable. Une étude a démontré dans une cohorte de patients de MM que certains patients peuvent bénéficier d'un traitement avec un PI tel que le bortézomib, en combinaison avec une ASCT, et permettent 60% de taux de réponse. Hélas, le taux de survie à un an est de 19% seulement (Katodritou et al., 2014). Dans l'ensemble, les données publiées à ce jour montrent qu'il existe peu d'options thérapeutiques pour les sPCL permettant d'obtenir des rémissions durables (Gowin et al., 2021).

Récemment, l'activité clinique du vénétoclax a été rapportée à la fois dans la pPCL (Nalghranyan et al., 2020) que dans la sPCL, et les résultats sont encourageants (Kupsh et al., 2020). En effet, les patients atteints de pPCL ont pour 60% des cas une translocation t(11 ;14). Étant donné que le vénétoclax a été présenté par l'équipe et d'autres comme ayant une très bonne efficacité chez les patients présentant cette translocation, les résultats sont très encourageants concernant ce groupe (Nalghranyan et al., 2020).

Cibler la famille BCL-2 semble donc être une opportunité thérapeutique à saisir dans le traitement de cette pathologie mais aussi dans le traitement du MM. En effet, l'équipe s'intéresse à comprendre les mécanismes de résistances mis en place et comment peut-on cibler ces molécules dans le MM et les PCL pour que les patients puissent en bénéficier. L'équipe s'intéresse aussi à d'autres facteurs de résistances, notamment la ou les mutations, voir la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Durand et al., 2023).

II) L'apoptose et la famille BCL-2

a. Généralités et découverte de l'apoptose

A ce jour, il existe plusieurs formes de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, la pyroptose, la ferroptose ou encore la nécroptose. Le Comité de la Nomenclature sur la mort cellulaire de 2018 a abordé les défis à relever dans l'utilisation d'une nomenclature purement morphologique pour caractériser précisément les différents types de morts cellulaires qui sont aujourd'hui reconnus. Ainsi, le comité a proposé leur classification sur des critères génétiques, biochimiques, pharmacologiques et fonctionnels (Galluzzi et al., 2018).

L'apoptose est un processus physiologique qui est essentiel lors du développement normal d'un individu. C'est un processus vital et dynamique permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules non nécessaires ou endommagées (Kashyap et al., 2021). La nécrose quant à elle est décrite comme une mort accidentelle non physiologique en réponse à des stimuli physiques et chimiques sévères, comme des forces osmotiques élevées ou encore des variations de pH extrêmes (Galluzzi et al., 2018).

La toute première mention du terme « apoptose » vient des chercheurs Kerr, Wyllie et Currie en 1972. Ce terme vient du grec : *apo*, signifiant « au loin » et *ptosis*, signifiant « chute ». Leurs travaux mentionnent ainsi un type de mort cellulaire silencieuse qui évoque la chute des feuilles en automne, ou encore la chute des fruits de l'arbre lorsqu'ils sont mûrs (Kerr et al., 1972). Ainsi, ils décrivent cette mort comme une mort morphologiquement distincte de la nécrose. Par la suite, d'autres termes seront utilisés pour définir l'apoptose, comme « mort cellulaire programmée » ou encore « suicide cellulaire » (Alles et al., 1991 ; Eastman, 1993).

L'apoptose est un processus très conservé au cours du temps et de l'évolution. Les toutes premières études de ce processus ont été réalisées chez le nématode *Caenorhabditis Elegans* (nommé aussi *C elegans*) (Horvitz, 1999). Les travaux remarquables d'Horvitz, Brenner et Suston sur *C elegans* ont d'ailleurs menés à un Prix Nobel de Médecine en 2002 pour la compréhension des mécanismes de mort cellulaire dans ce modèle (Bruce, 2002). Depuis, de nombreuses études ont montré le mode de régulation des gènes impliqués dans l'apoptose chez l'Homme (Yarychkivska et al., 2024).

Weinberg et Hanahan ont démontré qu'une des caractéristiques du cancer parmi les 6 « Hallmarks of Cancer » est l'échappement à l'apoptose qui va en faveur de la survie des cellules cancéreuses (Hanahan, 2022 ; Hanahan and Weinberg, 2000).

b. La mitochondrie

La mitochondrie est un organite que l'on retrouve au sein des cellules eucaryotes. La mitochondrie est décrite dans les années 1960 par Peter Mitchell comme étant la « centrale énergétique » de la cellule. Ses travaux lui auront d'ailleurs permis de remporter le prix Nobel de Chimie en 1978 (Wojtczak, 1979).

La mitochondrie est constituée tout d'abord d'une membrane externe, que l'on nomme membrane externe mitochondriale ou « MOM » (Mitochondrial Outer Membrane). Cette membrane permet le passage de nombreuses molécules du cytosol vers la mitochondrie. Ceci est en majeure partie dû aux protéines Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs) et aux protéines Transporter Outer Membrane (TOM). On y retrouve par la suite une membrane interne, que l'on nomme membrane interne mitochondriale ou « MIM » (Mitochondrial Inner Membrane). Cette MIM permet de faire rentrer les molécules à l'intérieur de la mitochondrie, où l'on retrouve la matrice mitochondriale. Dans cette matrice mitochondriale, on retrouve notamment l'ADN mitochondrial (mtADN) (Mannella, 2006). Enfin, entre la MOM et la MIM, on retrouve un espace que l'on nomme espace intermembranaire, ou « IMS » (InterMembrane Space).

La mitochondrie a plusieurs rôles au sein de la cellule. La fonction première des mitochondries est de fournir de l'énergie. Pour se faire, on retrouve au sein de la mitochondrie la chaîne respiratoire, constituée de 5 complexes, qui permettent la production d'ATP (Vercellino and Sazanov, 2022). Au cours du processus de production d'énergie, les mitochondries intègrent plusieurs voies métaboliques, notamment le cycle TCA (cycle des acides tricarboxyliques), l'oxydation des acides gras, l'oxydation des acides aminés (aa) ou encore l'OXPPOS (phosphorylation oxydative) (Jin et al., 2022 ; Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

La mitochondrie joue un rôle central dans l'exécution de l'apoptose. En effet, cette véritable centrale intracellulaire contient dans son IMS plusieurs protéines cytotoxiques dont Omi, SMAC/Diablo et le cytochrome c. À la suite d'un stress cellulaire et de l'induction de l'apoptose, la MOM est perméabilisée, ce qui entraîne leur libération dans le cytosol et l'activation subséquente de protéases à cystéine-aspartique, appelées caspases. Cette perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) est étroitement contrôlée par les protéines de la famille BCL-2 (Morris et al., 2021).

c. Les deux voies de l'apoptose

1. 2 voies majeures

L'apoptose est un programme étroitement contrôlé et finement régulé, représentant un équilibre délicat entre la survie et la mort des cellules. Il existe deux grandes voies apoptotiques, qui aboutissent toutes deux à la mort cellulaire. La voie extrinsèque ou « récepteur de mort » est médiée par l'activation des récepteurs transmembranaires localisés à la surface des cellules par des stimuli pro-apoptotiques externes à la cellule, tandis que la voie intrinsèque ou mitochondriale, comme son nom l'indique, est activée par des signaux endogènes ou exogènes (Knight et al., 2019). Les deux voies sont morphologiquement indiscernables mais présentent des voies de signalisation d'activation différentes (Lossi, 2022). Elles aboutissent toutes deux à l'activation des caspases, qui jouent un rôle fondamental dans l'apoptose.

Les caspases sont des protéases à cystéines qui jouent un rôle primordial dans l'exécution de l'apoptose en clivant les protéines cibles qui maintiennent l'intégrité de la cellule (Yuan and Ofengeim, 2024). Ces protéases possèdent un site catalytique. Dans leur forme inactive (où on les appelle procaspase ou zymogène), les caspases sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité portant le site catalytique et d'une petite sous-unité. Il existe deux types de caspases : les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices ou exécutrices (caspases 3, 6, 7). Les caspases initiatrices sont les premières à être activées lors de l'apoptose (Donepudi and Grütter, 2002). L'activation des caspases initiatrices nécessite une dimérisation de certaines de leurs domaines et leur auto-clivage au niveau du prodomaine et entre les grandes et petites sous-unités. Les caspases effectrices quant à elles possèdent un prodomaine plus court leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser en dimère comme les caspases initiatrices. Les caspases effectrices vont être activées par clivage par une caspase initiatrice active. L'activation des caspases se fait en cascade. Cette activation permet une amplification du signal initial. Le clivage de ces différentes protéines substrats est à l'origine de la plupart des événements morphologiques et biochimiques de l'apoptose, notamment la fragmentation de l'ADN (Lossi, 2022).

2. L'apoptose extrinsèque

L'apoptose extrinsèque est une mort cellulaire causée par des stimuli extérieurs à la cellule, comme des perturbations du microenvironnement cellulaire, par exemple par des cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T. Ses perturbations peuvent activer des récepteurs que l'on retrouve à la membrane plasmique des cellules (Galluzzi and Vitale, 2018).

Ces récepteurs impliqués dans l'apoptose appartiennent à la super famille des récepteurs de mort que l'on appelle Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TNFRSF). Ces récepteurs contiennent un domaine de mort (cytoplasmique), mais ont aussi la capacité de se lier aux ligands spécifiques par un domaine extracellulaire enrichi en cystéine, qui transmettra *in fine* le signal de mort de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Papenfuss et al., 2008). Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs Fas (FasR), les récepteurs du TNF (TNFR), les récepteurs du ligand induisant l'apoptose liée au TNF (TRAIL-R) avec TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) notamment. On retrouve aussi le récepteur TNFRSF25 (Bridgham et al., 2003 ; Thomas et al., 2002 ; von Karstedt et al., 2017 ; Wajant, 2002 ; Zhou et al., 2017). Chaque récepteur à son ligand spécifique. Pour le FasR, son ligand est le CD95, pour les TNF-R, c'est le TNF- α , et pour les TRAIL-R1 et R2 (ou DR4 et DR5), c'est le ligand Apo2L.

Ainsi, il existe deux voies différentes dans l'apoptose extrinsèque. Dans la mort de type I, les récepteurs interagissent avec leurs ligands spécifiques à la surface des cellules, recrutent les protéines adaptatrices Fas-associated protein with death domain (FADD), tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein (TRADD), puis les facteurs en aval de la caspase 8 (Guicciardi and Gores, 2009). Ce recrutement conduit finalement à l'activation des caspases 8 et 10, ou peut conduire à la formation d'un complexe que l'on nomme DISC, pour « Death-Inducing Signaling Complex » (Sessler et al., 2013). Ce complexe sera composé de différentes protéines selon le récepteur et le ligand mis en jeu (Figure 7). Ce complexe conduit ensuite à l'activation de caspases 8 et 10. Ces deux caspases déclenchent l'apoptose en clivant et activant les caspases exécutrices à savoir les caspases 3, 6 et 7 (Brentnall et al., 2013).

Dans la mort de type II, la mort cellulaire nécessite une amplification du signal qui est obtenue par l'activation protéolytique de la protéine BID (protéine « BH3-only ») médiée par la caspase 8, qui engage ensuite la voie apoptotique médiée par les effecteurs de l'apoptose BAX/BAK (Strasser and Vaux, 2020). Cela va activer la caspase 9, permettant le clivage et l'activation les caspases exécutrices 3 et 7 (Figure 7).

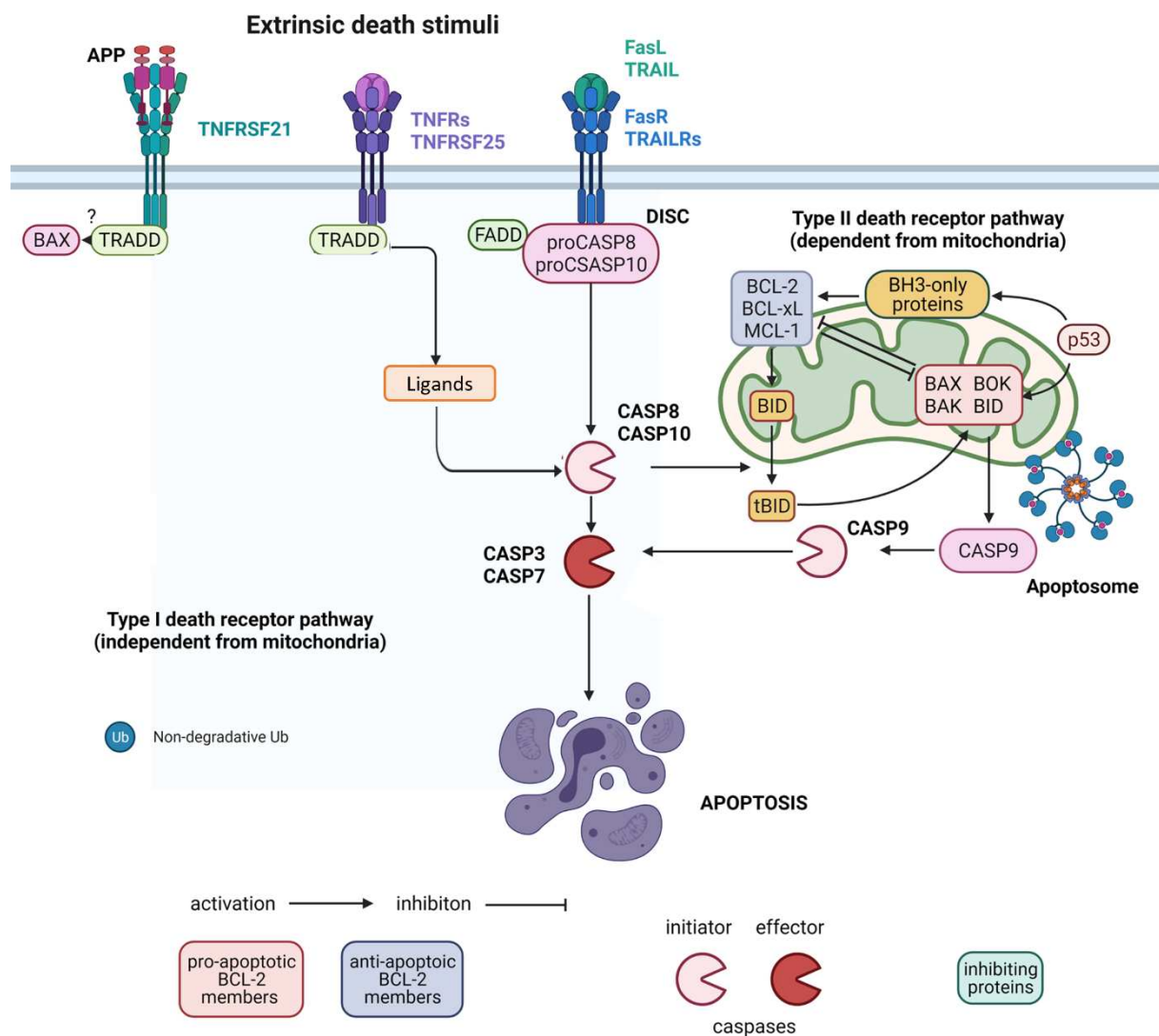


Figure 7 - La voie extrinsèque de l'apoptose

Il existe deux voies dans l'apoptose extrinsèque. Dans la voie des récepteurs de mort de type I, les cellules subissent l'apoptose de manière mitochondriale indépendante, alors que dans le type II, il y a une convergence vers la voie mitochondriale après l'activation de BID par la caspase 8 (CASP8). Certains membres du TNFRSF comme FasR et TRAILR déclenchent l'apoptose en se liant directement à la protéine adaptatrice FADD, tandis que d'autres (TNFRs, TNFRSF25) se lient d'abord à TRADD et FADD est donc recruté indirectement. Dans les deux cas, l'initiateur CASP8 (ou CASP10) est finalement activé. La formation du complexe « DISC » conduit tout aussi à l'activation des CASP8 et 10. L'activation des CAS8 et 10 entraîne l'activation des CASP3 et 7 à leur tour pour exécuter l'apoptose. Adapté d'après Lossi L, Biochem J (2022).

3. L'apoptose intrinsèque

L'apoptose intrinsèque ou apoptose mitochondriale est une voie qui induit l'apoptose après avoir été initiée par un large éventail de stimuli endogènes/exogènes non médiés par des récepteurs, qu'ils soient positifs ou négatifs. Les stimuli positifs sont ceux qui déclenchent directement l'apoptose, par exemple l'hypoxie, l'hyperthermie, le stress oxydatif provoquant un excès de radicaux libres comme une augmentation des espèces réactives à l'oxygène (ROS), le stress du réticulum endoplasmique (RE), les radiations ou les toxines. Les stimuli négatifs sont ceux qui, par leur absence, déclenchent l'apoptose, par exemple par le retrait ou la perte de cytokines ou de facteurs de croissance, ou la perte/régulation des facteurs anti-apoptotiques. (Czabotar et al., 2014 ; Fulda et al., 2010 ; Pihán et al., 2017 ; Roos et al., 2016). Bien que de nature différente, ces stimuli entraînent tous l'ouverture du pore de transition de perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie et la perte du potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) avec libération des protéines apoptogènes séquestrées entre les membranes dans le cytoplasme cellulaire, faisant basculer l'équilibre délicat entre les protéines pro- et anti-apoptotiques fermement vers la mort cellulaire (Knight et al., 2019).

Les membres de la famille BCL-2 sont des régulateurs de cette voie, dont l'équilibre peut faire basculer la cellule vers l'apoptose, en raison de la libération de protéines apoptogènes, notamment le cytochrome c, SMAC/DIABLO (« Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI ») et HTRA2/Omi (Sérine à protéases oligomériques à haute température (HtrA) 2). Le cytochrome c se complexe avec l'APAF1 (facteur d'activation de la protéase apoptotique 1) et la pro caspase 9 pour former l'apoptosome. Au sein de ce complexe, la caspase 9 est clivée et activée, puis elle procède elle-même au clivage et à l'activation des caspases exécutrices 3, 6 et 7 (Figure 8) (Wang and Youle, 2009). SMAC/DIABLO et HTRA2/Omi se lient tous deux aux membres de la famille anti-apoptotique IAP (« Inhibitors of Apoptosis Proteins »), et empêchent leur interaction avec les caspases. Il existe au moins 8 IAP humaines, dont la mieux caractérisée et la plus puissante est la XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis protein ; également appelée IAP3). XIAP est le seul membre de la famille à inhiber l'apoptose en se liant directement et en empêchant l'activation des caspases exécutrices 3 et 7, et de la caspase initiatrice 9 (Chai et al., 2000 ; Verhagen et al., 2000).

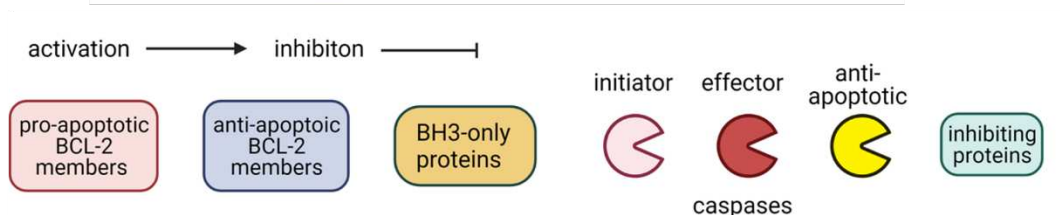
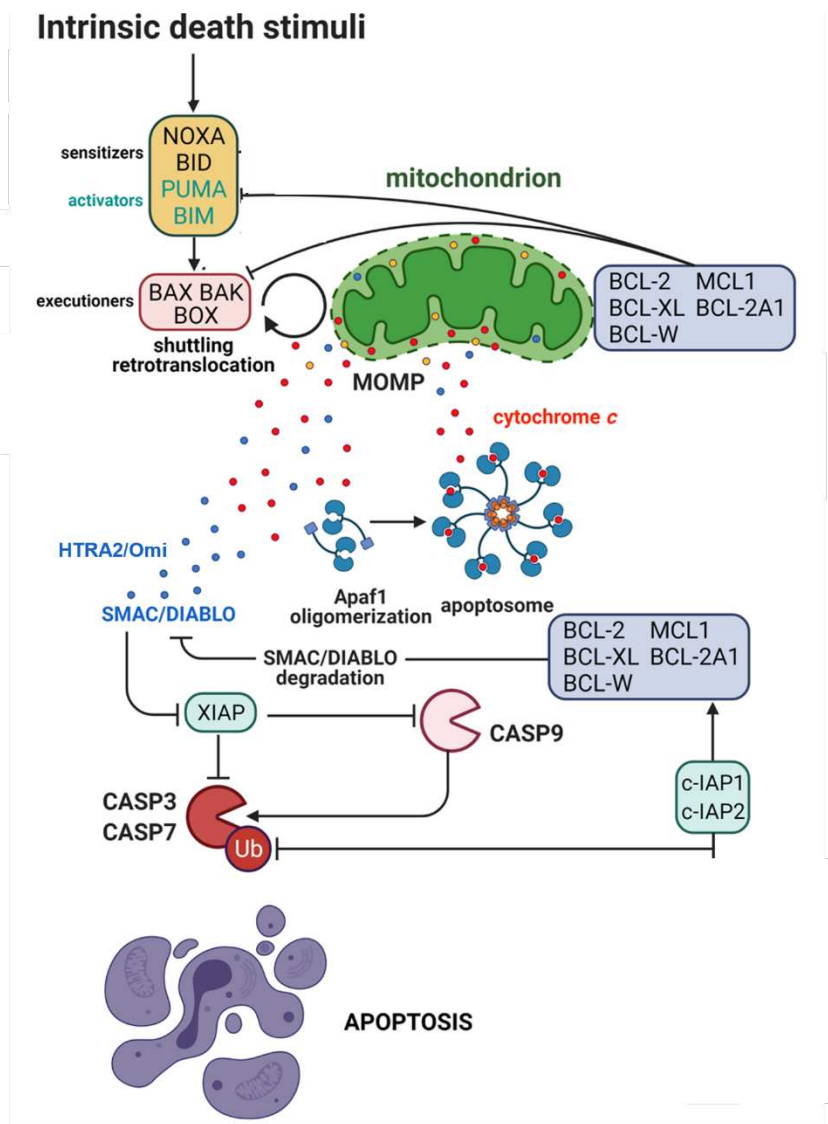


Figure 8 - La voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose

La formation de l'apoptosome est un événement crucial dans la voie apoptotique intrinsèque des mammifères. Pour ce faire, tout commence au niveau de la mitochondrie. L'oligomérisation de BAX/BAK, membres de la famille BCL-2 conduit à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP). L'apoptosome se forme alors sous l'effet de la MOMP, qui libère le cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial. D'autres protéines libérées dans le cytosol par la MOMP sont SMAC/DIABLO, ou encore HTRA2/Omi, qui favorisent indirectement l'apoptose en inhibant XIAP. Le cytochrome c cytoplasmique va alors former un complexe appelé « apoptosome » avec le facteur d'activation de la protéase apoptotique 1 (APAF1) et la procaspase 9. L'apoptosome, formé de cytochrome c, APAF1 et la procaspase 9 va permettre de cliver la procaspase 9 en caspase 9 qui va cliver et activer par la suite les caspases 3 et 7 pour induire la mort. L'apoptose intrinsèque est régulée négativement par XIAP, et d'autres protéines IAP. Adapté d'après Lossi L, Biochem J (2022).

4. Phase d'exécution de la mort

La voie apoptotique intrinsèque, tout comme la voie apoptotique extrinsèque, convergent vers la phase d'exécution qui consiste en une série d'étapes orchestrées par ce que l'on appelle les caspases exécutoires (caspases 3, 6 et 7). La phase d'exécution de l'apoptose est caractérisée par la fragmentation de l'ADN, le rétrécissement cellulaire, la condensation des chromosomes ou encore le développement de corps apoptotiques. (Arur et al., 2003 ; Bortner et al., 1995 ; Elmore, 2007). La caspase exécutoire majeure est la caspase 3. Elle catalyse l'inactivation protéolytique d'ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase) et clive et les protéines du cytosquelette pour provoquer la fragmentation cellulaire. De plus, la dépolymérisation des filaments d'actine permet le désassemblage des microtubules, pour disperser les fragments cellulaires tout en maintenant la membrane plasmique intacte. Enfin, la phagocytose permet d'éliminer les corps apoptotiques, que l'on nomme aussi « blebs », afin d'éviter une réaction inflammatoire (Yang et al., 2015). La famille BCL-2 est un acteur clé dans l'apoptose. En effet, la protéine BID joue un rôle de « cross-talk » entre les voies intrinsèques et extrinsèques puisqu'elle joue un rôle dans les deux voies (Luo et al., 1998).

d. La famille BCL-2

1. Origine de la famille BCL-2

Le premier membre de cette famille, à qui elle doit son nom, a été découvert dans les années 1980. C'est la protéine B-Cell Lymphoma-2 (« BCL-2 »). BCL-2 a été identifiée par Fukuhara et Rowley et leurs collaborateurs dans le lymphome folliculaire à cellules B portant la translocation t(14 ;18) (Fukuhara and Rowley, 1978 ; Tsujimoto et al., 1984). Cette translocation permet la surexpression de BCL-2, qui contribue au développement tumoral en ayant un rôle de pro-survie (Bakhshi et al., 1985 ; Cleary et al., 1986 ; Tsujimoto and Croce, 1986).

Par la suite, d'autres membres de cette famille ont été identifiés et on en retrouve aujourd'hui 16 membres essentiels. De manière intéressante, les protéines identifiées ne présentent pas toutes la même fonction. De ce fait, la famille BCL-2 est une famille de protéines qui est divisée en 3 groupes : les protéines anti-apoptotiques (ou protéines de survie), les protéines pro-apoptotiques initiateuses (ou BH3-only) et les protéines pro-apoptotiques effectrices.

Dans le groupe des protéines anti-apoptotiques, on retrouve BCL-2, MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia sequence 1), BCL-XL (B-Cell Lymphoma- extra large) et BCL-W (du gène *BCL2L2* d'où son nom BCL-2-like protein 2), mais aussi BFL-1 (nommée aussi A1 ou BCL2A1 pour BCL-2-related protein A1).

Dans le groupe des protéines pro-apoptotiques initiatrices, dites "BH3 only", on retrouve BAD (BCL2 Associated Agonist Of Cell Death), BID (BH3 interacting domain death agonist), BIK (BCL-2-interacting killer), BIM (du gène *BCL2L11* d'où son nom Bcl-2-like protein 11), BMF (Bcl-2-modifying factor), HRK (Harakiri, BCL2 Interacting Protein), NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 d'où son gène *PMAIP1*) et PUMA (P53 upregulated modulator of apoptosis, codée par le gène *BBC3*).

Enfin, dans le groupe des protéines pro-apoptotiques effectrices, les effecteurs majeurs de l'apoptose sont BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer) et BAX (Bcl-2-like protein 4). Plus récemment, une nouvelle protéine a été identifiée comme étant effectrice, BOK (Bcl-2-related Ovarian Killer).

L'activation de l'apoptose mitochondriale est caractérisée par la balance qui existe entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques, qui définit ainsi le destin cellulaire (Shamas-Din et al., 2013).

2. Structure des protéines de la famille BCL-2

En plus d'avoir comme point commun d'être impliquées dans l'apoptose mitochondriale, ces protéines présentent avant tout une structure commune. En effet, ces protéines présentent des homologies de séquences, avec notamment un ou plusieurs domaines conservés que l'on appelle « domaine d'homologie BCL-2 » ou « BH » (Shamas-Din et al., 2013). Il existe en tout 4 BH qui ont été nommés de BH1 à BH4 dans l'ordre de leur découverte (Aouacheria et al., 2013). Le domaine BH3 est le domaine commun à tous les groupes de cette famille. Les BH3-only, comme leur nom l'indique, ne présentent qu'un domaine BH3. Les protéines anti-apoptotiques et les protéines effectrices sont dites à multi-domaines puisqu'elles vont partager 4 domaines en commun (BH1 à BH4) (X. Luo et al., 2020) (Figure 9).

Concernant leur structure 3D, les membres de la famille BCL-2 sont des protéines globulaires composées de 9 hélices α , bien que les BH3-only soient pour la plupart des protéines non structurées car ne contiennent qu'un domaine BH3 (Czabotar et al., 2014). Les 9 hélices sont majoritairement amphipathiques, c'est-à-dire qu'elles présentent des groupements à la fois hydrophiles et hydrophobes. A l'exception des hélices α_5 et α_9 qui sont uniquement hydrophobes. Les hélices α_1 à α_8 forment le pli canonique particulier des protéines BCL-2 (que l'on appelle aussi « canonical BCL-2 fold »). L'hélice α_9 est séparée de ce corps globulaire et peut s'insérer dans la MOM. Elle forme ainsi le segment transmembranaire en C-terminal qui s'ancre à la MOM, segment que l'on appelle aussi « TM ». L'hélice α_5 forme le « noyau » de cette structure globulaire car elle est protégée de l'environnement aqueux par les hélices amphipathiques qui l'entourent. Le domaine BH4 est retrouvé dans l'hélice α_1 , le

domaine BH3 dans l'hélice α_2 , le domaine BH2 dans les hélices α_4 et 5 et le domaine BH1 dans les hélices α_7 et 8.

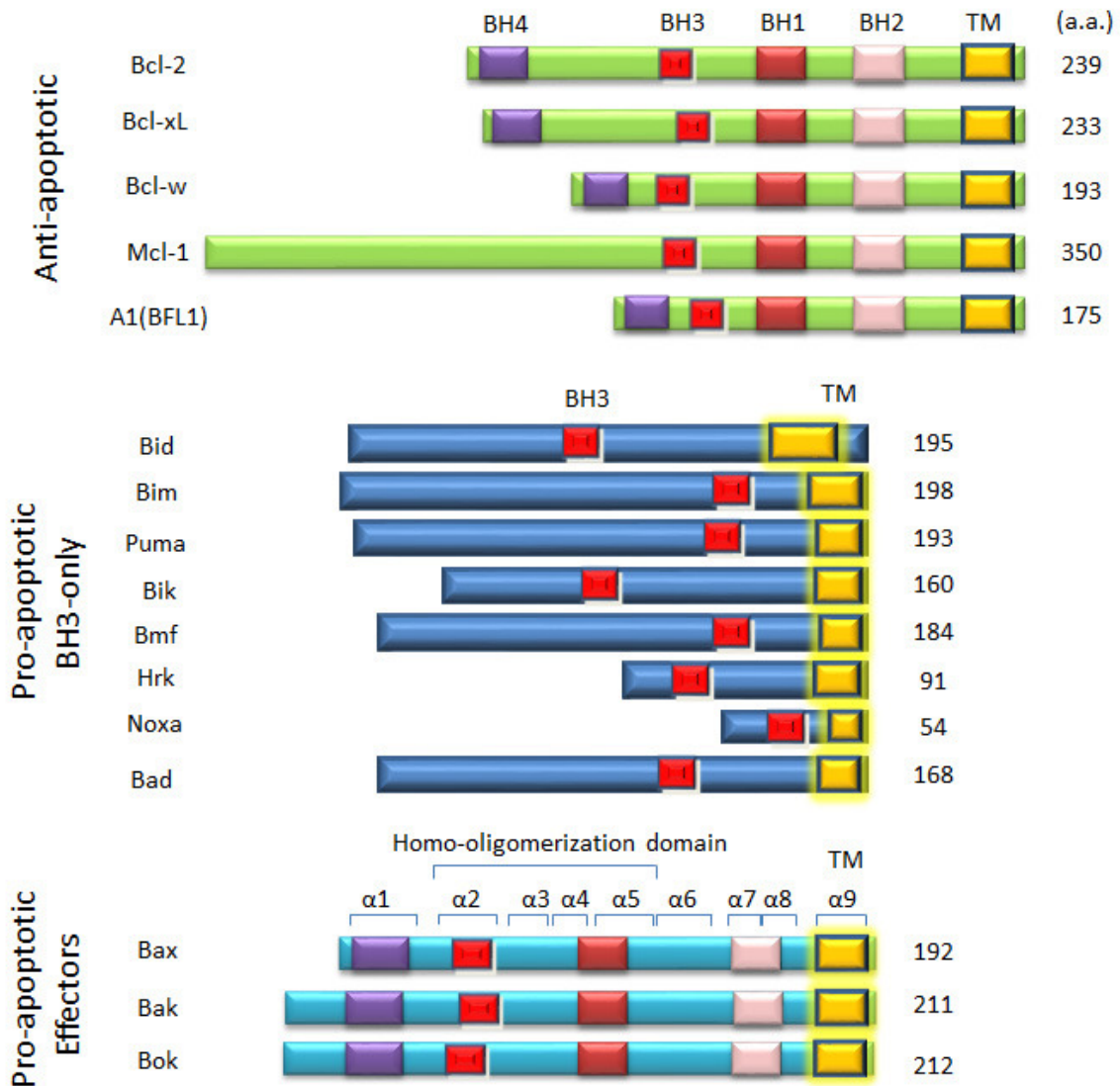


Figure 9 - Structure des membres de la famille BCL-2

Les 3 groupes de la famille BCL-2 les anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL1), les pro-apoptotiques effecteurs (BAX, BAK, BOK) et les pro-apoptotiques BH3-only (BID, BIM, PUMA, BIK, BMF, HRK, NOXA, BAD) contiennent des domaines d'homologies appelés « BH » (de BH1 à BH4). Les BH3-only n'ont qu'un domaine BH3. Ces protéines ont aussi un domaine transmembranaire d'ancrage à la membrane externe mitochondriale (TM). Enfin les effecteurs et les anti-apoptotiques (protéines de survie) sont structurées par des hélices α afin de former une protéine globulaire. Adapté d'après Xu Luo, Katelyn L O'Neill et Kai Huang, F1000Res (2020).

Les hélices $\alpha 2$ à 5 vont pouvoir former la poche hydrophobe permettant au domaine BH3 des protéines d'interagir entre elles, comme le montre la figure 10 en exemple avec l'interaction entre BCL-XL et BAX par le domaine BH3 de BAX (Birkinshaw and Czabotar, 2017). Ce sont ces interactions entre les différents groupes de la famille BCL-2 par ces hélices et ce domaine BH3 qui régulent l'apoptose.

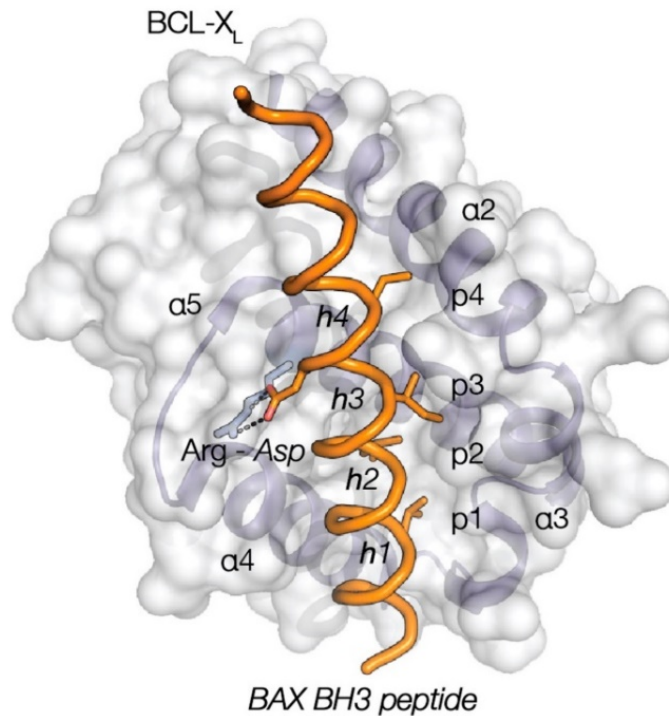


Figure 10 - Structure en 3D de la protéine BCL-XL en interaction avec le domaine BH3 de la protéine effectrice BAX

Représentation de la structure de la protéine globulaire BCL-XL, avec sa poche hydrophobe constituée des hélices $\alpha 2$ à $\alpha 5$ qui peut interagir avec le domaine BH3 de la protéine BAX. Adapté d'après Richard W. Birkinshaw & Peter E. Czabotar Seminars in Cell & Developmental Biology (2017).

3. Les protéines anti-apoptotiques

Les protéines anti-apoptotiques encore connues sous le nom de « gardiens » de la famille BCL-2 sont considérées comme des protéines « pro-survie », car leur surexpression inhibe la mort cellulaire et elles doivent être neutralisées pour que l'apoptose puisse avoir lieu. Le rôle de la famille BCL-2 dans l'apoptose a été découvert pour la première fois, lorsque la surexpression de BCL-2 s'est avérée bénéfique pour la survie de cellules de lymphomes en l'absence de cytokines (Fukuhara and Rowley, 1978). Les 5 membres les plus étudiés de ce groupe sont BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1 et BCL2A1, bien qu'il existe d'autres membres de la famille BCL-2 qui ont une activité pro-survie, tels que BCL-B (Czabotar and Garcia-Saez, 2023). Ces protéines, par leur domaine C-terminal TM, situé sur l'hélice $\alpha 9$, peuvent s'ancrer à la MOM afin de séquestrer les protéines pro-apoptotiques et ainsi prévenir la MOMP, étape clé dans le processus de mort cellulaire. (Giam et al., 2008).

3.1.1. BCL-2

C'est la découverte du gène *BCL-2* dans les années 1980 qui a permis par la suite de découvrir toute une série de protéines avec la même structure et des fonctions similaires de pro-survie dans l'apoptose (Fukuhara and Rowley, 1978). Le gène humain *BCL-2* est situé sur le chromosome 18q21.33 et code pour la protéine BCL-2 composée de 239 aa. Cette protéine contient 4 domaines BH ainsi qu'un domaine C-terminal permettant l'ancrage transmembranaire (TM). Elle est majoritairement exprimée par les cellules souches épithéliales rénales pendant l'embryogenèse, par les progéniteurs de mélanocytes, par un grand nombre de sous-ensembles de cellules hématopoïétiques mais aussi par les lymphocytes B et T matures (Bouillet et al., 2001 ; Veis et al., 1993). On retrouve aussi BCL-2 dans certaines populations de cellules neuronales. L'expression de BCL-2 diminue après la formation du tube neural dans le système nerveux central, alors que des niveaux élevés sont maintenus dans le système nerveux périphérique (Merry et al., 1994). La protéine BCL-2 est retrouvée à la surface du RE, dans l'enveloppe nucléaire et dans le noyau mais majoritairement à la MOM par son segment TM (Hausmann et al., 2000 ; Lithgow et al., 1994).

Concernant la fonction de cette protéine, il a été montré que BCL-2 n'affecte pas la prolifération cellulaire, mais favorise la survie des cellules en empêchant la mort des cellules dépendantes des facteurs de croissance cultivées sans cytokine. De plus, les souris transgéniques BCL-2 accumulent un excès de lymphocytes B et ces cellules sont protégées de la mort spontanée en culture (McDonnell et al., 1989). Outre son rôle dans l'apoptose, BCL-2 peut aussi à la membrane du RE interagir avec les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP3R) pour réguler la

libération du calcium (Ca^{2+}) depuis le RE pour éviter une surcharge calcique cytosolique qui pourrait induire l'apoptose (Li et al., 2007).

3.1.2. MCL-1

Le gène *MCL-1* a été initialement identifié comme un gène précoce induit dans les cellules de la leucémie myéloïde humaine (Kozopas et al., 1993). La régulation à la hausse de MCL-1 déclenche la différenciation des cellules de leucémies myéloïdes en monocytes ou en macrophages tandis que la régulation à la baisse de MCL-1 induit l'apoptose, suggérant un rôle de MCL-1 dans la survie cellulaire (Krajewski et al., 1995). Le gène humain *MCL-1*, situé sur le chromosome 1q21.20, contient trois exons et code pour la protéine de 350 aa appelée MCL-1 ou « MCL-1L ». L'épissage alternatif génère deux autres formes plus courtes, MCL-1S et MCL-1ES. Le variant MCL-1S (271 aa) est dépourvu de l'exon 2 et produit une protéine sans BH1, BH2 et TM. Le variant MCL-1ES (179 aa) possède un exon 1 tronqué, entraînant la perte de la partie N-terminale (Akgul et al., 2000).

La protéine MCL-1 possède 3 domaines BH (BH1-BH3), un domaine BH4, un segment TM C-terminal et une grande région N-terminale de 170 aa. Sa grande région N-terminale diffère des autres membres de la famille BCL-2 et contient un grand nombre de résidus typiques des protéines labiles que l'on nomme séquences « PEST ». Par conséquent, MCL-1 a une demi-vie courte et est hautement régulé, ce qui lui permet de moduler l'apoptose en réponse à des contextes cellulaires qui changent rapidement (Sancho et al., 2022). MCL-1 est localisée majoritairement à la MOM, mais il existe une part dans le cytosol qui peut être transloquée à la MOM durant l'apoptose par son domaine TM dans l'hélice $\alpha 9$. De plus, une faible quantité de MCL-1 peut être retrouvée à la membrane du RE (Nijhawan et al., 2003).

En plus de son rôle dans l'apoptose, il est important de noter que MCL-1 joue également des rôles non apoptotiques dans l'homéostasie mitochondriale, l'autophagie et le cycle cellulaire (Sancho et al., 2022). MCL-1 joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire précoce (Rinkenberger et al., 2000). MCL-1 est exprimée dans un large éventail de types de cellulaires. Il a été montré que MCL-1 joue un rôle essentiel dans la survie des hépatocytes, les cardiomyocytes, les cellules neuronales, les cellules épithéliales intestinales et mammaires. De plus, MCL-1 est nécessaire à la survie des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, au développement des lymphocytes B et T et des cellules NK, au développement et à la survie des plasmocytes et des cellules érythroïdes immatures (Kaloni et al., 2023). MCL-1 peut aussi être à la membrane du RE pour interagir avec les IP3R pour permettre un faible flux de Ca^{2+} et éviter une surcharge calcique cytosolique pouvant induire l'apoptose (Li et al., 2007). L'équilibre entre l'expression de MCL-1L/MCL-1S peut réguler la

machinerie contrôlant la fusion et la fission des mitochondries (Morciano et al., 2016). Enfin, MCL-1ES peut se lier à MCL-1L, se localiser à la MOM et induire la mort cellulaire mitochondriale indépendante de BAK et de BAX (Kim and Bae, 2013).

3.1.3. BCL-XL

C'est en 1993 que le gène *BCL2L1*, qui code pour la protéine BCL-XL (et le variant d'épissage plus court rarement détecté, BCL-XS) a été découvert par sonde d'hybridation (Boise et al., 1993). Le gène *BCL2L1* est retrouvé sur le chromosome 20q11.21.

BCL-X est une protéine transmembranaire mitochondriale qui régule la voie intrinsèque de l'apoptose. Un événement d'épissage alternatif dans l'exon 2 de BCL-X produit deux isoformes ayant des effets antagonistes sur la survie cellulaire. BCL-XL (isoforme longue) a un rôle anti-apoptotique tandis que BCL-XS (isoforme courte) a un rôle pro-apoptotique. BCL-XL contient les 4 domaines BH ainsi qu'une région C-terminale TM. L'isoforme BCL-XS est dépourvue des domaines BH1 et BH2, mais possède à la fois le domaine BH3 et le segment TM (Lee and Fairlie, 2019). BCL-XL, comprenant 233 aa, est la forme la plus abondante et a pour fonction d'inhiber l'apoptose par différents mécanismes, dont l'inhibition de BAX (Stevens and Oltean, 2019). La protéine BCL-XL est retrouvée la plupart du temps à la MOM, mais on retrouve aussi une part de cette protéine dans le cytosol qui pourra être transloquée à la MOM durant l'apoptose grâce à son domaine TM (Y.-T. Hsu et al., 1997).

La protéine BCL-XL est largement exprimée au cours du développement embryonnaire et ses niveaux sont particulièrement élevés tout au long de l'ontogenèse neuronale, y compris dans les cellules en cours de différenciation (Boise et al., 1993). L'absence de BCL-XL chez la souris entraîne la mort embryonnaire en raison de défauts dans la survie de certaines populations de cellules neuronales et de progéniteurs érythroïdes. La perte de BCL-XL provoque une apoptose aberrante dans les neurones du cerveau en développement, de la moelle épinière et du ganglion de la racine dorsale, ce qui démontre son rôle essentiel dans la survie cellulaire (Motoyama et al., 1995). Des études ont montré que chez les souris adultes, BCL-XL est essentiel pour la survie de certaines populations de cellules dans le rein (Roth et al., 1996). Enfin, une étude a montré que BCL-XL est essentiel pour la survie des plaquettes (Josefsson et al., 2011). BCL-XL permet aussi d'éviter une surcharge calcique cytosolique qui pourrait induire l'apoptose en interagissant avec les IP3R retrouvés à la membrane du RE (Li et al., 2007).

3.1.4. BCL-W

En 1996, le gène *BCL2L2* codant pour la protéine BCL-W a été identifié, permettant de le classer dans ce groupe des membres anti-apoptotiques (Gibson et al., 1996). La protéine BCL-W, d'une longueur de 193 aa, est codée par le gène *BCL2L2*, qui est situé sur le chromosome 14q11.2-q1235. *BCL2L2* se compose de deux exons codants et de deux exons non codants situés à l'extrémité 5'. Le promoteur de *BCL2L2* est hautement conservé chez les espèces (Hartman and Czyz, 2020). BCL-W est la protéine anti-apoptotique qui partage la plus grande similarité de séquence avec BCL-XL (51%) par rapport aux autres membres (Lee and Fairlie, 2019).

La protéine BCL-W est principalement trouvée à la MOM. Elle peut quelques fois être localisée dans le cytosol et être transloquée à la MOM durant l'apoptose (Wilson-Annan et al., 2003). Cette protéine est exprimée dans plusieurs tissus, tels que les testicules, le côlon, le cerveau et certaines populations de cellules myéloïdes et lymphoïdes (Kaloni et al., 2023). La protéine BCL-W est majoritairement impliquée dans la spermatogenèse. En effet, les souris mâles déficientes en BCL-W présentent une dégénérescence testiculaire progressive avec une mort des cellules de Sertoli. Cela entraîne une perturbation de l'architecture des testicules et la stérilité. Les souris Knock-Out (KO) pour BCL-W sont par ailleurs normales dans tous les autres types de cellules examinés (Print et al., 1998).

3.1.5. BFL-1 ou A1

Enfin, le gène *BCL2A1*, qui code pour la protéine BFL-1 ou A1 a été identifié comme un gène induit par le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages dans les cellules myéloïdes (Lin et al., 1993). Le gène *BCL2A1* a été localisé sur le chromosome 15. Un variant d'épissage court de BFL-1, BFL-1S, a été identifié par RT-PCR. Dans les tissus normaux, BFL-1S est détecté principalement dans les ganglions lymphatiques. La protéine BFL-1 contient les 4 domaines BH. Contrairement à la plupart des protéines de la famille BCL-2, l'extrémité C-terminale de BFL-1 ne fonctionne pas comme un ancrage membranaire car elle ne contient pas de domaine TM bien défini (Wang et al., 2022). Ce domaine est au contraire responsable de la régulation de la fonction anti-apoptotique de BFL-1 en permettant son renouvellement rapide dans des conditions d'équilibre. Cela s'explique notamment par sa demi-vie courte de moins d'une heure. On retrouve rarement une localisation BFL-1 à la mitochondrie et au cytosol (Brien et al., 2009).

BFL-1 est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, telles que les cellules B et T. Des études ont suggéré un rôle de BFL-1 dans la maturation des mastocytes, la survie des cellules B matures et le développement des cellules T précoces (Kaloni et al., 2023). En 1996, il a été découvert que BFL-1 peut supprimer l'apoptose induite par p53 comme d'autres membres de la famille BCL-2, clarifiant ainsi son rôle de protéine pro-survie impliquée dans la régulation de l'apoptose (D'Sa-Eipper et al., 1996).

4. Les protéines pro-apoptotiques BH3-only

Les « initiateurs » de la famille BCL-2 sont des protéines pro-apoptotiques souvent appelés « BH3-only » car la plupart ne possèdent que le domaine BH3 conservé (à l'exception de BID). Ces protéines répondent aux stimuli apoptotiques par divers mécanismes, par exemple par une modification post-traductionnelle ou une augmentation de la transcription, initiant ainsi le processus qui aboutit à la mort cellulaire. Le rôle principal des BH3-only est d'interagir avec les autres membres de la famille BCL-2 et de réguler ainsi leur activité. Les BH3-only peuvent interagir et neutraliser certains des membres anti-apoptotiques. Cependant, certaines sont capables de se lier directement à des partenaires exécuteurs et de les activer (Czabotar and Garcia-Saez, 2023). Selon leurs partenaires de liaison, les BH3-only peuvent être classifiées en 2 groupes fonctionnels : celles qui se lient aux protéines exécuteurs et les activent directement sont appelées « activatrices », et les protéines qui ne le font pas mais qui vont neutraliser les anti-apoptotiques sont appelées « sensibilisatrices » (Letai et al., 2002). Parmi les activatrices, on retrouve BIM, PUMA et BID. Parmi les sensibilisatrices, on retrouve NOXA, BMF, HRK, BAD et BIK.

4.1.1. BIM

L'identification du gène *BCL2L1* codant pour la protéine BIM a été réalisée en 1998 (O'Connor et al., 1998). Ce gène est retrouvé chez l'Homme sur le chromosome 2q13. *BCL2L1* possède 6 exons et subit un épissage alternatif pour former au moins 18 isoformes différentes. Les 3 principaux variants alternatifs de BIM décrits chez l'Homme correspondent à BIMEL (Extra Long, 198 aa), BIML (Long, 138 aa) et BIMS (Short, 108 aa). BIML et BIMS sont formés par un épissage alternatif dans l'exon 2. BIMEL est la forme la plus abondante dans les thymocytes et les cellules T, tandis que BIMS est presque indétectable. Les trois isoformes sont induites par les glucocorticoïdes dans les thymocytes (Sionov et al., 2015).

La protéine BIM contient un domaine BH3 ainsi qu'un domaine TM. Elle est principalement retrouvée à la mitochondrie, mais interagit aussi avec des structures cytosquelettiques lui permettant de rester en contact avec les protéines anti-apoptotiques (O'Connor et al., 1998). La protéine BIM est impliquée dans la régulation de la mort cellulaire intrinsèque induite par

un grand nombre de stimuli, y compris la privation de facteurs de croissance ou de cytokines, le flux de calcium, la perte d'adhésion, les glucocorticoïdes, la perturbation des microtubules et les inhibiteurs de tyrosine kinase (Sionov et al., 2015). Il a été démontré qu'elle est essentielle pour l'apoptose dans les lymphocytes B et T, les macrophages et les granulocytes (Strasser, 2005).

4.1.2. PUMA

Le gène *BBC3*, codant pour la protéine PUMA a été découvert en 2001 (Han et al., 2001 ; Nakano and Vousden, 2001). Ce gène est localisé sur le chromosome 19q13.32. Il code pour la protéine PUMA, de 193 aa, qui est très conservée parmi les vertébrés. Elle présente, comme toutes les autres protéines BH3-only, un domaine BH3 et un domaine TM. La protéine PUMA sous sa forme déphosphorylée est retrouvée dans le cytosol. Lors de l'induction de l'apoptose, PUMA est phosphorylée et se localise à la MOM (Xie et al., 2015).

Le gène qui code pour PUMA est une cible transcriptionnelle directe de p53. L'interaction mutuelle entre p53 et PUMA est un mécanisme efficace pour empêcher la croissance et la division des cellules anormales. p53 est nécessaire à l'induction de PUMA en réponse à des lésions de l'ADN, mais il peut également agir sur PUMA en réponse à un stress oxydatif, à une carence en facteurs de croissance ou à une infection virale. PUMA joue aussi un rôle très important dans l'apoptose indépendante de p53, qui intervient dans l'élimination des cellules endommagées en cas d'hypoxie, d'infection et d'épuisement des cytokines ou des facteurs de croissance. Enfin, l'induction de l'apoptose par PUMA, qu'elle soit dépendante ou indépendante de p53, est impliquée dans la réponse immunitaire après des infections bactériennes et virales (Roufayel et al., 2022).

4.1.3. BID

La protéine BID a été identifiée en 1996, avec sa forme active tronquée que l'on nomme t-BID (Wang et al., 1996). Le gène *BID* est localisé sur le chromosome 22q11.21. Ce gène code pour la protéine BID, de 195 aa contenant un domaine BH3 et un domaine TM. La protéine BID se trouve majoritairement dans le cytosol. Quand cette protéine est activée et clivée par la caspase 8, elle se présente sous sa forme tronquée, t-BID, et se localise à la mitochondrie (Lutter et al., 2001).

La protéine BID est impliquée dans la réponse au stress, dans la participation au point de contrôle de la mitose et dans le maintien de la stabilité génomique. Elle fonctionne essentiellement sous sa forme tronquée. Sa fonction principale est pro-apoptotique puisque la forme tronquée de BID est obtenue après clivage par la caspase-8, lui permettant d'activer les effecteurs de la mort (Billen et al., 2008).

4.1.4. NOXA

Le gène *PMAIP1* codant pour la protéine NOXA a été identifié en 2000 (Oda et al., 2000). Tout comme *BBC3*, le gène *PMAIP1* codant pour NOXA est un gène cible de p53. Ce gène est localisé sur le chromosome 18. NOXA est la plus petite protéine BH3-only puisqu'elle est composée de seulement 54 aa. Elle contient tout de même un domaine BH3 et un domaine TM (Roufayel et al., 2022). La protéine NOXA est sous sa forme phosphorylée dans le cytosol et est transloquée à la mitochondrie pour interagir avec MCL-1 par son domaine BH3 (Oda et al., 2000).

S'il a été établi que NOXA est un médiateur de l'apoptose induite par la p53, l'induction de NOXA peut également se produire en l'absence de p53 (Morsi et al., 2018). L'équipe a aussi mis en évidence que la protéine NOXA est dégradée par le protéasome et que l'inhibition du protéasome permet l'induction de NOXA et *in fine* l'induction de l'apoptose (Gomez-Bougie et al., 2007).

4.1.5. BMF

BMF a été identifié en 2001 (Puthalakath et al., 2001). Le gène *BMF* est retrouvé sur le chromosome 15q15.1. Il code pour la protéine BMF composée de 184 aa, et structurée par un domaine BH3 et un domaine TM. La protéine BMF est principalement retrouvée au cytosol. On peut la retrouver associée aux filaments de myosine et particulièrement attachée à la dynéine, favorisant ses interactions avec les protéines anti-apoptotiques et lui permettant d'aller à la MOM (Puthalakath et al., 2001).

BMF semble contrôler l'intégrité du cytosquelette grâce à sa liaison avec la myosine et les chaînes légères de la dynéine (Willis and Adams, 2005). Concernant son rôle dans l'apoptose, certains signaux de dommages, tels que la perte d'attachement cellulaire, libèrent BMF, lui permettant de migrer et de se lier aux protéines anti-apoptotiques (Puthalakath et al., 2001).

4.1.6. HRK

HRK, découvert par l'équipe d'Inohara en 1997, a été identifié comme un gène pro-apoptotique situé sur le chromosome 12q13.1 et qui est régulé transcriptionnellement dans divers types de cellules (Inohara et al., 1997). En effet, la protéine HRK, constituée de 92 aa, est principalement exprimée dans les tissus hématopoïétiques et les cellules neuronales, à la fois dans les systèmes nerveux central et périphérique, là où son rôle dans l'apoptose a été rapporté. Elle est aussi exprimée dans le pancréas, le foie, les poumons, les reins et la prostate (Nakamura et al., 2008). La protéine HRK est dans le cytosol, et quand l'apoptose a lieu, elle se localise à la mitochondrie (Inohara et al., 1997).

4.1.7. BAD

La protéine BAD a été découverte en 1997 (Otilie et al., 1997). Le gène *BAD*, situé sur le chromosome 11q13.1, code pour la protéine BAD constituée de 168 aa, avec un domaine TM et un domaine BH3. La protéine BAD possède de multiples sites de phosphorylation. Les sites de phosphorylation les plus étudiés sont la Sérine 75, la Sérine 99 et la Sérine 118. La phosphorylation des résidus S75 et S99 est essentielle à la séquestration de BAD par la protéine 14-3-3, ce qui conduit à la translocation de BAD de la MOM vers le cytosol, l'empêchant de se lier aux protéines anti-apoptotiques (Wang et al., 1999).

En l'absence de signaux de croissance ou de glucose, BAD est déphosphorylé, lui permettant de s'associer à des protéines anti-apoptotiques pour entraîner l'apoptose. Il a également été démontré que BAD interagit physiquement avec p53 et favorise l'apoptose. Cependant, dans son état phosphorylé, BAD se lie à la protéine 14-3-3 et devient plutôt favorable à la survie. La protéine BAD possède, en plus de son rôle dans l'apoptose, des fonctions non-apoptotiques telles que la régulation de la glycolyse. De plus, il a été démontré que l'expression et la phosphorylation de BAD jouent un rôle dans la fonction et le développement des lymphocytes. BAD possède également des fonctions dans la régulation de l'autophagie et peut favoriser la progression dans le cycle cellulaire (Bui et al., 2018).

4.1.8. BIK

La protéine BIK a été identifiée par l'équipe de Boyd en 1995 (Boyd et al., 1995). Le gène *BIK* est retrouvé sur le chromosome 22q13.3. BIK est une protéine de 160 aa et contient un domaine TM et un domaine BH3 (Chinnadurai et al., 2008).

Contrairement aux autres BH3-only, la protéine BIK est principalement retrouvée à la membrane du RE, et interagit avec les protéines anti-apoptotiques qui sont retrouvées à la mitochondrie ou directement au RE. La protéine BIK fonctionne à distance des mitochondries en se liant aux protéines anti apoptotiques BCL-2 et BCL-XL et en les séquestrant à la membrane du RE, favorisant ainsi la libération de Ca^{2+} et permettant de jouer le rôle de point de contact entre le RE et les mitochondries (Osterlund et al., 2023).

5. Les protéines pro-apoptotiques effectrices

L'étape cruciale de l'apoptose est la MOMP, un événement médié par les effecteurs de la famille BCL-2. Pendant de nombreuses années, BAX et BAK ont été considérés comme les principaux membres de ce groupe, et la plupart des études sur la MOMP se sont concentrées sur leur activation et leur activité. Cependant, des études menées ces dernières années ont révélé que d'autres membres de la famille BCL-2 sont également capables d'induire la MOMP, comme BOK (Czabotar and Garcia-Saez, 2023).

5.1.1. BAK et BAX

La découverte de la protéine BAX en 1993 par co-immunoprécipitation avec la protéine BCL-2 a permis de distinguer dans la famille BCL-2 au moins deux groupes avec des membres pro- et anti-apoptotiques, régulant la mort cellulaire en interagissant entre elles (Oltvai et al., 1993). Par la suite, en 1995, le gène *BAK1*, codant pour la protéine BAK a été découvert (Farrow et al., 1995 ; Kiefer et al., 1995). Le gène *BAK1* est localisé sur le chromosome 6p21.31 tandis que le gène *BAX* est localisé sur le chromosome 19q13.33. Les deux gènes sont composés de 6 exons. Les protéines exécutrices BAX et BAK ressemblent aux protéines anti-apoptotiques, puisqu'elles contiennent également 4 domaines BH, un domaine TM et qu'elles adoptent, sous leur forme inactive, le pliage typique de BCL-2, par leurs 9 hélices α (Kvansakul et al., 2008).

Les structures de BAX et BAK sont labiles et subissent d'importants changements de conformation afin d'induire la mort cellulaire. En général, BAX et BAK sont considérés comme des homologues fonctionnels, car la suppression des deux est nécessaire pour rendre une cellule résistante à la grande majorité des stimuli apoptotiques. Cependant, il existe une série de caractéristiques qui les différencient, notamment leur distribution tissulaire et leur localisation subcellulaire avant leur activation (Czabotar and Garcia-Saez, 2023).

La protéine BAX est majoritairement cytosolique, avec son segment TM C-terminal hydrophobe séquestré dans la poche du domaine de liaison BH3. Il a tout de même une petite fraction qui va être à la MOM. C'est lors de l'apoptose que BAX va être transloqué à la MOM (Y.-T. Hsu et al., 1997). On appelle alors ce phénomène la rétrotranslocation. La protéine BAK est constitutivement retrouvée à la mitochondrie, et est séquestrée par les protéines MCL-1 et BCL-XL (Willis et al., 2005). BAK est aussi séquestrée à la mitochondrie par le canal mitochondrial VDAC2 (Voltage Dependent Anion Channel 2). Néanmoins, une petite fraction de BAK se localise au niveau des peroxysomes dans les cellules dépourvues ou déficientes en VDAC2 (Fujiki et al., 2017 ; Hosoi et al., 2017). Enfin, BAK et BAX peuvent aussi se localiser au niveau de la membrane du RE pour augmenter le stockage du Ca^{2+} par le RE, par leurs interactions avec l'IP3R mais aussi avec les protéines anti-apoptotiques (Chami et al., 2004). De plus, des cellules dépourvues de BAK et BAX ont montré une diminution du Ca^{2+} dans le RE induisant une baisse du recaptage du Ca^{2+} par la mitochondrie lors de la décharge calcique du RE (Scorrano et al., 2003).

L'activité de BAX et de BAK peut être régulée de manière différentielle par des modifications post-traductionnelles. BAX peut être phosphorylé par AKT et BAK ubiquitinylé par Parkin (Bernardini et al., 2019; Kale et al., 2018).

BAK et BAX sont fonctionnellement redondants au sein de la mitochondrie (Lindsten et al., 2000). Dans les cellules « saines », les protéines BAK et BAX existent dans des conformations inertes ou inactives. Ainsi, l'hélice $\alpha 5$, considérée comme le noyau hydrophobe de la structure, y est entouré par les hélices $\alpha 1$ à 8 (Moldoveanu et al., 2006 ; Suzuki et al., 2000). Ce qui différencie BAK et BAX, c'est l'hélice $\alpha 9$. En effet, pour BAK, elle est constitutivement ancrée à la MOM par cette hélice. Pour BAX, cette hélice est séquestrée dans la poche hydrophobe, ce qui explique sa localisation majoritairement cytosolique en comparaison à BAK (Ferrer et al., 2012 ; Nechushtan et al., 1999).

5.1.2. BOK

La protéine BOK, dernier membre du groupe des protéines pro-apoptotiques effectrices, a été identifiée en 1997 (S. Y. Hsu et al., 1997). Son gène, *BCL2L9*, est localisé sur le chromosome 2q37.3. La structure de la protéine BAK est similaire aux autres membres effecteurs, BAK et BAX, puisque cette protéine de 212 aa contient 4 domaines BH et est structurée par 9 hélices α . BOK est une protéine exprimée de manière ubiquitaire et hautement conservée qui présente une homologie de séquence d'aa importante avec BAX et BAK (73 % ou 87 %, respectivement), mais sa fonction physiologique n'est pas encore bien définie (Ke et al., 2018). La protéine BOK est localisée principalement au cytosol et transloque à la MOM durant l'apoptose (Gao et al., 2005). Néanmoins, des études plus récentes ont démontré que la protéine BOK est retrouvée à la membrane du RE et au niveau de l'appareil de Golgi (Echeverry et al., 2013).

BOK semble réguler les flux de Ca^{2+} en interagissant avec l'IP3R et créant des sites de contact entre la mitochondrie et le RE (Carpio et al., 2021 ; Schulman et al., 2016). De plus, il a été montré que BOK joue un rôle dans la réponse au stress de RE et dans la régulation de la morphologie de la mitochondrie puisqu'il semble impliqué dans les mécanismes de fission-fusion mitochondriale (Carpio et al., 2015 ; Schulman et al., 2019 ; Walter et al., 2022). De plus, BOK semble être régulé différemment de BAX et BAK, c'est-à-dire qu'il ne nécessite pas d'activation par des protéines BH3-only et ne semble pas être contrôlé par les protéines anti-apoptotiques. BOK semble tout de même capable d'induire la MOMP (Ke et al., 2018 ; Llambi et al., 2016 ; Shalaby et al., 2023). En revanche, la manière dont BOK va pouvoir aller à la mitochondrie pour former la MOMP dans des conditions physio-pathologiques n'est pas encore connue.

e. Régulation de la famille BCL-2

1. Affinités de liaison

Les protéines de la famille BCL-2 régulent l'intégrité de la MOM grâce à un réseau dynamique d'interactions protéine-protéine dont l'équilibre ou le déséquilibre détermine le destin de la cellule (Sekar et al., 2022).

Ces interactions spécifiques se produisent par la liaison de la face hydrophobe du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques dans un sillon hydrophobe formé par les domaines BH1-BH3 des protéines anti-apoptotiques. Pour que l'apoptose se produise, les protéines anti-apoptotiques (pro-survies) doivent être « dépassées », c'est-à-dire qu'il doit y avoir un déséquilibre dans la balance BH3-only / anti-apoptotiques en faveur des BH3-only et de l'effecteur BAX et/ou BAK qui doit être activé (Sekar et al., 2022).

Chaque protéine de la famille BCL-2 a une affinité plus ou moins importante avec les autres membres. Ainsi, il existe comme une « danse » entre les membres de la famille BCL-2. Cette danse est régie à la fois par l'abondance de ses protéines, mais aussi les affinités qu'elles ont les unes avec les autres afin de pouvoir interagir et décider du destin cellulaire (Kale et al., 2018).

Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 s'opposent à la mort cellulaire en interagissant directement avec les molécules BH3-only ainsi que les effecteurs pro-apoptotiques. Cependant, la capacité des membres anti-apoptotiques individuels à s'opposer aux molécules pro-apoptotiques n'est pas uniforme (Opferman, 2016). Certains membres de la famille BH3-only (par exemple BIM, BID et PUMA) ont la capacité de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques avec des affinités similaires (Chen et al., 2005). En revanche, les protéines anti-apoptotiques BCL-2, BCL-XL et BCL-W ont des capacités similaires à se lier à BAD ; cependant, ni MCL-1 ni BFL-1 ne peuvent le faire. MCL-1 et BFL-1 sont les seuls capables d'interagir avec NOXA. HRK est capable de se lier à BCL-XL, mais n'interagit pas avec les autres molécules anti-apoptotiques (Youle and Strasser, 2008). Enfin, BIK peut interagir avec tous les membres anti-apoptotiques à l'exception de BFL-1 (Figure 11A et B).

BIM, t-BID et PUMA peuvent interagir directement avec BAX (Cartron et al., 2004; Marani et al., 2002). Les protéines BIM, BAD et BMF ne sont pas structurées en l'absence de partenaire de liaison, et seul leur domaine BH3 devient structuré lors de la liaison avec une protéine anti-apoptotique (Hinds et al., 2007). Le laboratoire de Korsmeyer a également décrit BID qui, après avoir été clivé par la caspase 8 pour générer la forme tronquée active, t-BID, se lie non seulement à la BCL-2 pour l'inhiber mais aussi à BAX pour l'activer (Wang et al., 1996).

A)

| | BID [†] | BIM [†] | PUMA [†] | BAD [*] | BIK [*] | BMF [*] | HRK [*] | NOXA [*] |
|--------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| BCL-2 | Light Gray | Dark Gray | Light Gray | Dark Gray | Light Gray | Dark Gray | White | White |
| BCL-XL | Dark Gray | Dark Gray | Dark Gray | Dark Gray | Dark Gray | Dark Gray | Light Gray | White |
| BCL-W | Dark Gray | Light Gray | Light Gray | Light Gray | Dark Gray | Dark Gray | White | White |
| BCL2A1 | Light Gray | Light Gray | Light Gray | White | White | White | White | White |
| MCL-1 | Dark Gray | Dark Gray | Dark Gray | White | Light Gray | Dark Gray | White | Dark Gray |

B)

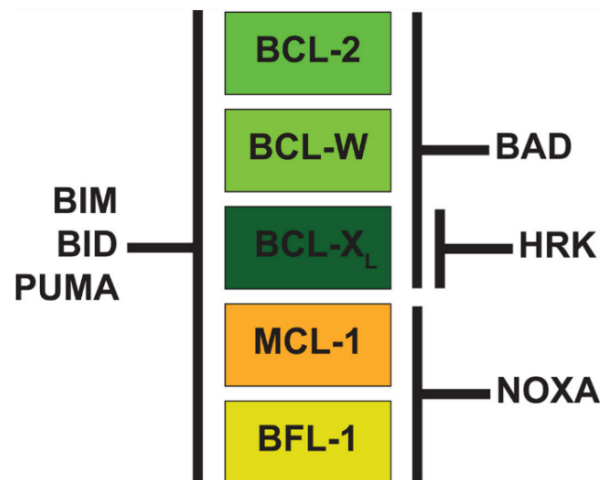


Figure 11 - Affinités de liaison entre les BH3-only et les protéines anti-apoptotiques

Les protéines BIM et PUMA peuvent interagir avec tous les membres du groupe anti-apoptotique. Au contraire, NOXA interagit uniquement avec MCL-1 et BFL-1 (ou BCL2A1), BAD interagit sélectivement avec BCL-W, BCL-2 et BCL-XL. Le BID activé, t-BID peut interagir avec MCL-1, BFL-1, BCL-W et BCL-XL et très rarement avec BCL-2. HRK interagit spécifiquement avec BCL-XL. BIK et BMF peuvent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques à l'exception de BFL-1. Pour le A) Les teintes plus foncées indiquent des affinités plus fortes. D'après *Knight et al Biochem Pharmacol (2019)* pour A) et *Opferman J FEBS Journal (2015)* pour B).

2. Les 3 modes de régulation entre les membres de la famille BCL-2

Pour comprendre les conséquences des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques BH3-only et effectrices, plusieurs modèles ont été proposés, dont 3 sont majoritaires ([Shamas-Din et al., 2013](#)).

Modèle d'activation directe (Mode 1)

La particularité du modèle d'activation directe, ou mode 1, est qu'une protéine BH3-only est nécessaire pour interagir avec les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK, et pour les activer. Le modèle d'activation directe classe les protéines BH3-only en activateurs ou en sensibilisateurs en fonction de leur affinité à se lier aux protéines anti-apoptotiques ou interagir avec les protéines effectrices (Letai et al., 2002). Les protéines BH3 activatrices (BIM, PUMA et BID) interagissent à la fois avec les protéines pro-apoptotiques effectrices et anti-apoptotiques (Kim et al., 2006). Les protéines BH3-only sensibilisatrices (NOXA, BMF, HRK, BAD et BIK) se lient directement aux protéines anti-apoptotiques, libérant ainsi les protéines BH3-only activatrices qui favorisent la MOMP (Certo et al., 2006 ; Kuwana et al., 2005). Les protéines anti-apoptotiques se lient à la fois aux activatrices et aux sensibilisatrices, mais sont incapables de se complexer avec BAX et BAK. Par conséquent, pour qu'une cellule échappe à l'apoptose, les protéines anti-apoptotiques doivent séquestrer les protéines BH3-only afin d'empêcher l'activation de BAX et BAK et ainsi déclencher l'apoptose (Shamas-Din et al., 2013) (Figure 12A).

Modèle de déplacement ou indirect (Mode 2)

Dans le modèle de déplacement, ou mode 2, les protéines BH3-only n'interagissent pas avec BAX et BAK pour provoquer leur activation. Au contraire, les effecteurs sont constitutivement actifs et doivent donc être inhibés par les protéines anti-apoptotiques pour que la cellule survive. Pour déclencher l'apoptose, les protéines BH3-only déplacent BAX et BAK des protéines anti-apoptotiques afin de promouvoir la MOMP (Figure 12B). Comme les protéines BH3-only interagissent sélectivement avec un spectre limité de protéines anti-apoptotiques selon leurs affinités, une combinaison de protéines BH3-only est nécessaire pour induire l'apoptose dans les cellules exprimant plusieurs membres anti-apoptotiques (Chen et al., 2005). À l'appui de ce modèle, des hétérodimères de BAK avec MCL-1 et BCL-XL sont présents dans les cellules en division, et la surexpression de NOXA déplace les hétérodimères BAK-MCL-1, libérant BAK et formant des complexes NOXA-MCL-1. Dans ces cellules, une combinaison de BAD et de NOXA est nécessaire pour neutraliser les effets de BCL-XL et de MCL-1 et finalement induire l'apoptose (Chen et al., 2005 ; Gomez-Bougie et al., 2007).

Modèle unifié

Le modèle unifié de la fonction de la famille BCL-2 s'appuie sur le modèle « embedded together » (Llambi et al., 2011). Ce modèle distingue les interactions connues des protéines anti-apoptotiques pour séquestrer les protéines BH3-only activatrices, comme le mode 1, et pour séquestrer les formes actives de BAX et BAK, comme le mode 2 (Figure 12C). Bien que les deux modes d'inhibition aient lieu simultanément dans les cellules, dans le modèle unifié,

l'inhibition de l'apoptose par le mode 1 est moins efficace et est plus facile à surmonter par les protéines sensibilisatrices pour promouvoir la MOMP que l'inhibition par le mode 2. Il est important de noter que le modèle unifié intègre également les fonctions de BAX et BAK dans la fission et la fusion des mitochondries et postule que seule la répression du mode 2 affecte ce processus. Ce modèle est donc le premier à lier explicitement les modes de régulation de la MOMP et la dynamique mitochondriale (Shamas-Din et al., 2013).

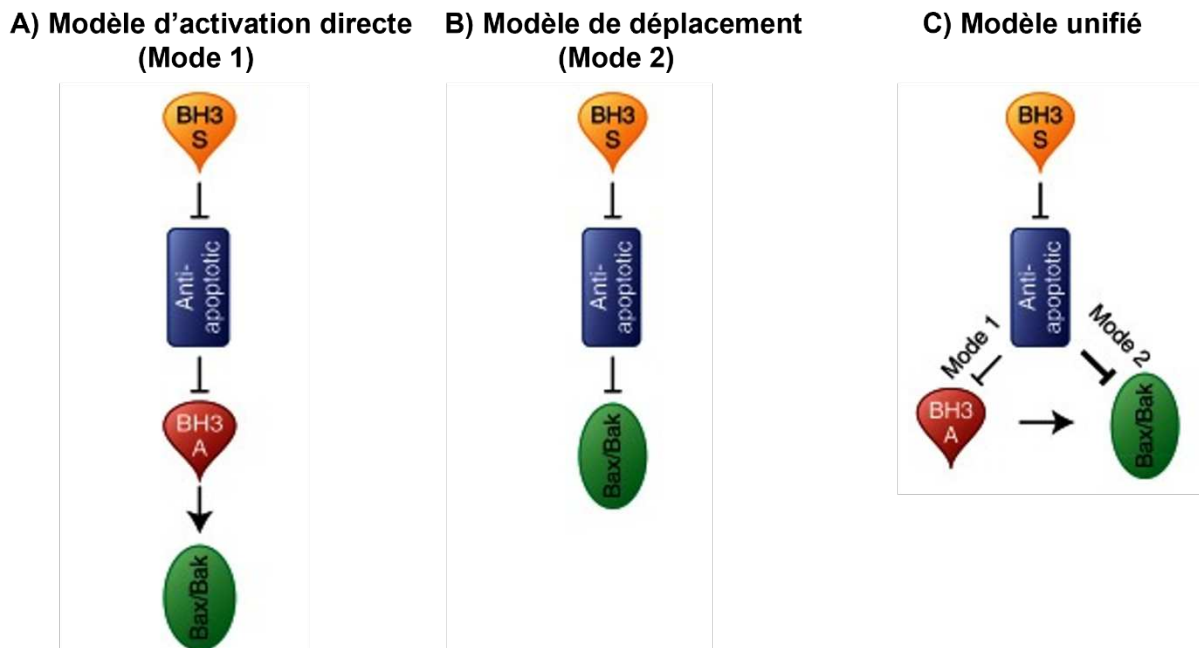


Figure 12 - Mécanismes fondamentaux proposés par 3 modèles pour la régulation de la MOMP par les protéines de la famille BCL-2

(↑) Activation ; (⊥) Inhibition. (A) Le modèle d'activation directe (mode 1) divise les différentes protéines BH3 par des différences qualitatives de fonction. Les protéines BH3-only activatrices interagissent directement avec BAX et BAK et les activent pour promouvoir le MOMP. Les protéines anti-apoptotiques inhibent le MOMP en séquestrant spécifiquement les activateurs BH3. Les protéines sensibilisatrices BH3 peuvent entrer en compétition pour se lier aux protéines anti-apoptotiques, libérant ainsi les protéines activatrices BH3 pour promouvoir avidement la MOMP par l'activation et l'oligomérisation de Bax et Bak. (B) Le modèle de déplacement (mode 2) classe les protéines BH3-only en fonction de leur affinité de liaison avec les protéines anti-apoptotiques. Dans ce modèle, BAX et BAK sont constitutivement actifs, s'oligomérisent et induisent le MOMP s'ils ne sont pas retenus par les protéines anti-apoptotiques. (C) Le modèle unifié s'appuie sur le modèle « embedded together » en proposant que les protéines anti-apoptotiques séquestrent les protéines BH3-only activatrices (mode 1) et séquestrent BAX et BAK (mode 2). La différence réside dans le fait que dans le modèle unifié, l'inhibition de l'apoptose par le mode 1 est moins efficace (plus petite flèche dans le panneau C) et donc plus facile à surmonter par les protéines BH3-only sensibilisatrices. D'après *Shamas-Din et al, Cold Spring Harb Perspect Biol. (2013).*

3. Activation et oligomérisation des effecteurs

i. L'activation des effecteurs et leur oligomérisation

L'ancrage à la MOM des protéines effectrices BAK et BAX est différente. En effet, vu que BAK est déjà inséré à la MOM, BAX doit déplier son hélice α_9 du noyau hydrophobe pour aller s'insérer à la MOM. Par la suite, les étapes sont identiques pour les deux effecteurs (Figure 13) (Uren et al., 2017). La première étape du changement conformationnel des effecteurs est le dépliement de l'hélice α_1 (extrémité N-terminale) du reste du corps globulaire (Alsop et al., 2015). Par la suite, ce sont les parties du corps α_2 - α_5 et α_6 - α_8 qui se détachent (Brouwer et al., 2014 ; Czabotar et al., 2013). L'hélice α_2 , qui contient le domaine BH3, peut alors interagir avec d'autres molécules BAK ou BAX activées et leur sillon BH3, pouvant ainsi former des homodimères symétriques (Bleicken et al., 2014 ; Dewson et al., 2012, 2008 ; Oh et al., 2010). Les dimères de BAK et de BAX formés sont amphipathiques. Ainsi, la surface α_4 - α_5 hydrophobe et les hélices α_5 et α_6 ont une activité de formation de pore (Griffiths et al., 1999) et interagissent avec les lipides de la membrane mitochondriale (Birkinshaw et al., 2021 ; Cowan et al., 2020). De plus, une étude montre que la troncature de BAX avec seulement les hélices α_2 -5, là où se trouve le domaine BH3, en combinaison avec un domaine transmembranaire ciblant les mitochondries, serait suffisante pour la dimérisation et la MOMP (George et al., 2007).

Il a été montré que BAK est une protéine capable d'auto-activation. En effet, en utilisant des anticorps capables d'activer BAK, des chercheurs ont montré que la protéine BAK activée, et non BAX, est capable d'activer d'autres molécules BAK, mais aussi des molécules BAX. L'auto-activation par BAK implique notamment des interactions transitoires, car BAK et les molécules BAX qu'elle active peuvent se dissocier et s'homo-dimériser. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'auto-activation par BAK pourrait jouer un rôle important dans l'apoptose, notamment en recrutant BAX dans les mitochondries (Iyer et al., 2020). Des anticorps ont été générés et sont capables de reconnaître les différents stades d'activation des deux effecteurs. Ainsi, il est possible de voir l'activation des effecteurs par ses anticorps en détectant les épitopes exposés lors de l'activation. Ainsi, Gavathiotis et ses collaborateurs ont mis en évidence l'utilisation de l'anticorps « 6A7 », permettant de reconnaître la partie N-terminale de BAX, dans l'hélice α_1 qui ne peut être reconnue que lorsque les changements conformationnels sont effectués, étant donné que la dissociation de l'hélice α_1 est la première étape après l'ancrage à la MOM (Gavathiotis et al., 2010). Plus récemment, un panel d'anticorps a été testé pour l'activation de BAK, et ce sont les anticorps « Ab-1 » et « G-317 » qui ciblent plutôt l'état « pré-activé » de BAK, dans la région N-terminale, dans l'hélice α_1 , et c'est l'anticorps « 7D10 » qui reconnaît et permet aussi d'activer BAK (Alsop et al., 2015 ; Iyer et al., 2020).

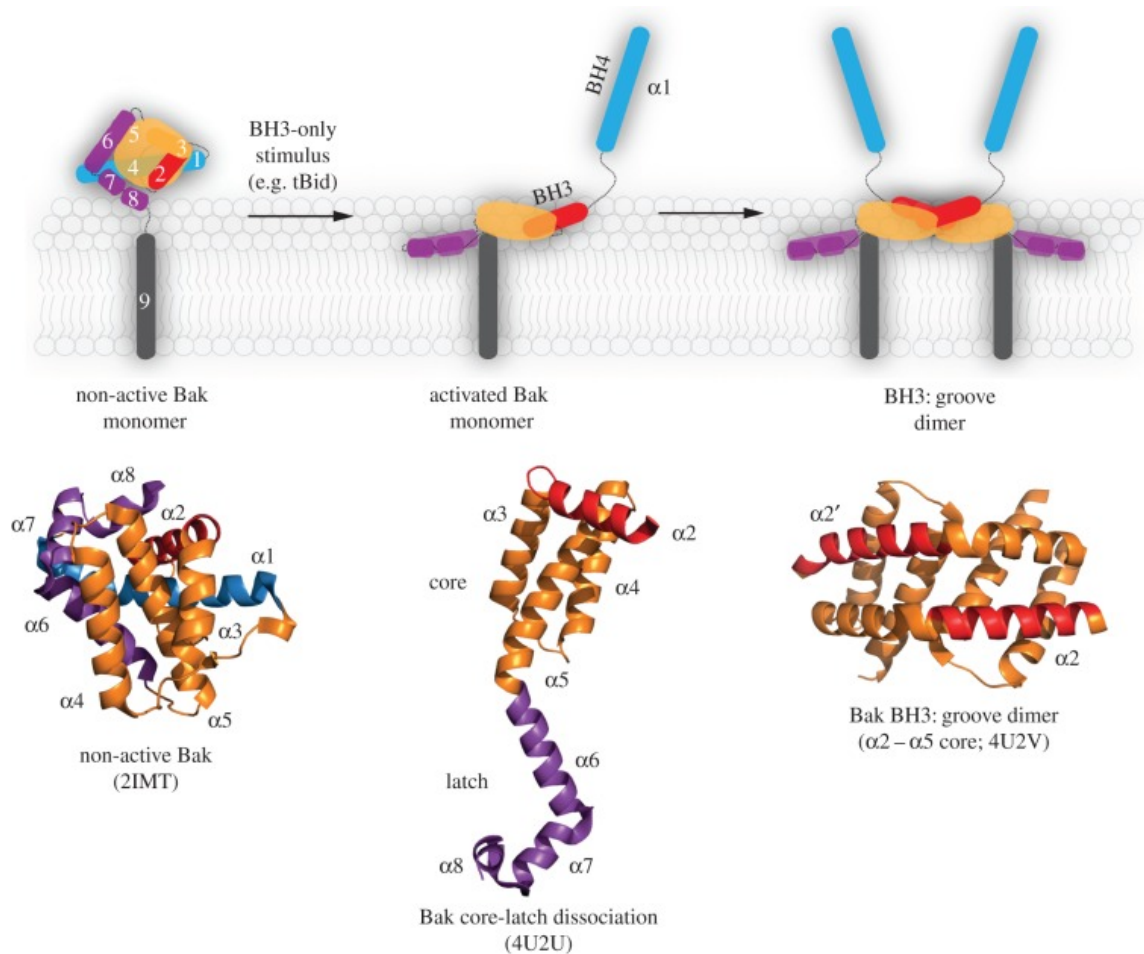


Figure 13 - Changement de conformation de la protéine effectrice BAK lors de son activation et formation d'un dimère pour former le pore à la MOM

L'activation de la protéine BAK permet d'induire un changement de conformation aboutissant à des homodimères symétriques. Ainsi, BAK se déplie en séparant l'extrémité N-terminale ($\alpha 1$, bleu) et l'extrémité C-terminale ($\alpha 6$ - $\alpha 8$, magenta) du noyau $\alpha 2$ - $\alpha 5$ (orange, rouge). Les régions hydrophobes du noyau et du corps principal s'effondrent alors sur la membrane, tandis que le domaine BH3 exposé (en $\alpha 2$) se lie au sillon hydrophobe d'une autre molécule Bak activée. La liaison réciproque entre le domaine BH3 et le sillon hydrophobe donne lieu à des homodimères symétriques. Les structures cristallines en dessous montrent les principaux changements de conformation impliqués lors du processus. Les changements conformationnels sont les mêmes pour l'autre protéine effectrice BAX, à la différence qu'elle nécessite une étape en amont pour déloger l'hélice $\alpha 9$ du corps hydrophobe et pouvoir s'insérer par la suite dans la MOM. D'après Uren RT, Iyer S et Kluck RM, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2017).

ii. Formation du pore et de la MOMP pour le relargage des facteurs

Les dimères symétriques peuvent s'assembler pour former les pores (Figure 12). Pendant la formation du pore, des parties du dimère peuvent tapisser et stabiliser le pore (Bleicken et al., 2014 ; Mandal et al., 2016 ; Dana Westphal et al., 2014) Selon les niveaux de BAK et de BAX dans les cellules, une hétérogénéité dans la formation des complexes BAK/BAX et ainsi des pores pourra être retrouvée. De plus, bien qu'on ne connaisse pas vraiment combien de dimères BAK/BAX sont nécessaires à la formation du pore, des études ont montré que des protéines et des lipides semblent capables d'élargir les pores apoptotiques, un processus qui assurerait une mort cellulaire rapide (Uren et al., 2017). Des études de super-résolution et de microscopie à force atomique ont révélé que BAX peut former différentes formes de pores, comme de grandes lignes, des arcs et des anneaux sur la MOM (Salvador-Gallego et al., 2016). Ces structures peuvent être de taille variable, les formations en arc et en anneau générant des pores d'une taille allant de 25 nm à plus de 100 nm (Große et al., 2016 ; Kuwana et al., 2002). Ces grands pores pourraient contenir entre 6 à 10 de molécules BAX ou BAK, pouvant expliquer une hétérogénéité de la taille des pores dans ces études. Physiologiquement, la MOM est perméable à des molécules allant jusqu'à 5kDa (Walther and Rapaport, 2009). Lors de la MOMP, les pores formés par BAK et BAX (BOK aussi) laissent passer des protéines faisant plus de 100kDa. Ainsi, la MOMP permet le passage par exemple du cytochrome c qui fait 12kDa et de SMAC/DIABLO qui fait 22kDa (Tait and Green, 2010). Cette étape de MOMP est considérée comme un point de non-retour, puisqu'elle est considérée comme irréversible. L'activation de la MOMP cause la $\Delta\Psi_m$. C'est elle qui permet de déclencher la cascade d'activation des caspases, permettant *in fine* la dégradation de la cellule (Griffiths et al., 1999 ; Lovell et al., 2008).

Ainsi, les membres de la famille BCL-2 sont des acteurs majeurs dans l'induction de l'apoptose. La compréhension des mécanismes qui sont mis en place lors de ce processus, notamment par les interactions entre ces différents membres, est essentielle. De plus, les effecteurs BAK et BAX sont indispensables à l'exécution de la mort, et leur régulation peut se faire à plusieurs étapes, jusqu'à leur oligomérisation. Pour ce faire, les effecteurs peuvent avoir deux modes d'activation (D Westphal et al., 2014).

4. Mécanisme d'activation des effecteurs

En réponse à l'augmentation des niveaux stables de protéines BH3-only à l'intérieur de la cellule, les protéines pro-apoptotiques effectrices BAK et BAX sont activées, provoquant la libération de facteurs tels que le cytochrome c (Tait and Green, 2010). La façon dont ces molécules inactives se transforment en véritable « machines à tuer » a fait l'objet d'études

intenses. Deux modèles d'activation ont alors été proposés : l'activation directe et l'activation indirecte (Doerflinger et al., 2015).

Activation directe

BAX et BAK peuvent être activés par la liaison directe de certaines protéines BH3-only. Alors que les membres de la famille BH3-only se lient facilement aux protéines anti-apoptotiques, une interaction de ces dernières avec BAX et BAK a été difficile à mettre en évidence (D Westphal et al., 2014). Dans le modèle « hit and run », il a été proposé que la liaison des protéines BH3-only aux effecteurs BAX et BAK n'est que transitoire, probablement parce que les changements induits dans la conformation des effecteurs conduisent au désengagement des protéines activatrices de BAX et BAK (Wei et al., 2000). Les preuves de l'activation directe (décrite plus tôt dans le mode 1) proviennent d'un mutant de BID incapable de se lier aux protéines anti-apoptotiques mais qui pouvait toujours se lier à BAX et l'activer (Wang et al., 1996). Depuis lors, plusieurs études ont montré l'implication de la liaison directe et l'activation de BAX et BAK par les protéines BH3-only en utilisant des approches biochimiques, structurales ainsi que génétiques (Czabotar et al., 2013 ; Mérino et al., 2009 ; Moldoveanu et al., 2013 ; Ren et al., 2010). Cependant, l'activation de BAX et BAK peut également être causée par d'autres facteurs tels que des changements dans l'environnement intracellulaire, des modifications post-traductionnelles et l'interaction avec des composants de la membrane mitochondriale et des protéines ne faisant pas partie de la famille BCL-2 (D Westphal et al., 2014). Il reste donc à déterminer si l'activation directe de BAX et BAK par les protéines BH3-only est nécessaire dans toutes les circonstances (Willis et al., 2007). La MOM peut jouer un rôle important dans l'activation directe, car deux articles de référence utilisant des protéines BCL-2 recombinantes ont montré que BAX et t-BID n'interagissent qu'en présence d'une membrane. Après l'insertion dans la membrane, t-BID pourrait alors entraîner l'insertion de BAX dans la membrane (Lovell et al., 2008).

Activation indirecte

L'activation indirecte, ou modèle de « déplacement » (mode 2), a été proposée pour la première fois dans deux études importantes. Premièrement, il a été démontré que BAK est normalement séquestré par MCL-1 et BCL-XL, mais qu'il est déplacé par les protéines BH3-only (Willis et al., 2005). Deuxièmement, en opposition directe au modèle d'activation directe, il a été démontré que l'apoptose peut être induite par des protéines BH3-only « sensibilisatrices » ou des mutants d'« activateurs » incapables de se lier à BAX ou BAK, même dans des cellules déficientes pour les 3 protéines activatrices PUMA, BIM et BID (Willis et al., 2007). Ceci est cohérent avec l'observation que des protéines telles que BIM et PUMA sont des activateurs puissants puisqu'ils montrent une liaison « promiscuous », c'est-à-dire une liaison

de haute affinité avec les protéines anti-apoptotiques, alors que les autres protéines BH3-only, les sensibilisatrices, sont moins puissantes car elles ne lient qu'un sous-ensemble spécifique de protéines de pro-survie (Doerflinger et al., 2015 ; X. Luo et al., 2020). Ces résultats ont donné naissance au modèle d'activation indirecte, qui propose que les effecteurs BAX et BAK sont constitutivement actifs mais sont normalement séquestrés par les protéines anti-apoptotiques. Au cours de l'apoptose, les protéines BH3-only se lient aux protéines anti-apoptotiques et activent indirectement les effecteurs en les déplaçant et les libérant. Bien que ce modèle soit cohérent avec l'activation de BAK, il est moins facile d'expliquer l'activation de BAX. L'hypothèse a donc été émise qu'une petite fraction de BAX est constitutivement active mais est séquestrée par les protéines anti-apoptotiques à la mitochondrie (X. Luo et al., 2020). Les protéines BH3-only libèrent le BAX actif, qui à son tour recrute le BAX cytosolique dans les mitochondries et l'active par un mécanisme d'auto-activation (Iyer et al., 2020). Cependant, cette hypothèse ne tient pas compte de l'origine de la fraction de BAX active et de la pertinence physiologique de l'auto-activation. Par conséquent, on peut supposer que si l'activation indirecte est le mode d'activation le plus probable pour BAK, des preuves pondérées suggèrent que l'activation directe est le scénario le plus probable pour l'activation de BAX (Doerflinger et al., 2015).

5. Dérégulation de la famille BCL-2 dans le cancer

L'expression anormalement élevée des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 est souvent corrélée avec le développement tumoral et le mauvais pronostic de nombreux cancers (Fernald and Kurokawa, 2013). Parmi ces protéines, BCL-2, MCL-1 et BCL-XL sont fréquemment surexprimées dans les lymphomes et les leucémies (Czabotar et al., 2014). Les régions génomiques contenant les gènes codant pour MCL-1 et BCL-XL sont amplifiées somatiquement dans environ 15 % de divers types de tumeurs (Beroukhim et al., 2010). En outre, des translocations chromosomiques ou une transcription accrue des gènes peuvent entraîner cette surexpression anormale (Certo et al., 2006).

La translocation t(14;18) est responsable de la surexpression dérégulée de BCL-2 dans le lymphome folliculaire (Tsujiimoto et al., 1984). Des niveaux élevés de BCL-2 ont aussi été détectés dans plusieurs autres hémopathies malignes comme la leucémie lymphoïde chronique (LLC), le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) et le lymphome à cellules du manteau (LCM) (Adams et al., 2018; Ma et al., 2021), ainsi que dans certains cancers solides, tels que ceux du cerveau, du sein et du poumon (Kelly and Strasser, 2011). La surexpression de BCL-2 rend les cellules malignes résistantes à divers agents anticancéreux, qu'ils agissent de manière dépendante ou indépendante de TP53 (Kaloni et al., 2023).

Environ 3 % des cancers humains de diverses origines présentent une amplification somatique de la région génomique contenant le gène BCL-XL (Beroukhim et al., 2010). BCL-XL joue un rôle crucial dans la progression du gliome (Weiler et al., 2006) et du cancer du sein (Martin et al., 2004). Les cellules mélanome expriment également des niveaux élevés de BCL-XL (Leiter et al., 2000), ce qui les rend sensibles aux inhibiteurs de BCL-XL. Des niveaux élevés de BCL-XL ont aussi été observés dans les lymphomes B et T, les lymphomes folliculaires et la DLBCL. Les cellules de lymphomes T/NK associés au virus d'Epstein-Barr dépendent de BCL-XL pour leur croissance et leur survie (Sejic et al., 2020). De plus, de nombreux cancers colorectaux présentent des niveaux élevés de BCL-XL, et son inhibition améliore la réponse à la chimiothérapie dans ces cancers (Ramesh et al., 2021).

MCL-1 est exprimée à des niveaux relativement élevés dans de nombreuses hémopathies malignes, comme la leucémie myéloïde aiguë (AML), ainsi que dans les cancers du sein, du pancréas, de la prostate, du poumon et de l'ovaire (De Blasio et al., 2018). Environ 12 % des cancers humains présentent une amplification somatique de la région contenant le gène MCL-1 (Beroukhim et al., 2010). Chez la souris, la surexpression de MCL-1 dans les cellules hématopoïétiques conduit au développement de malignités lymphoïdes ou myéloïdes (Campbell et al., 2010). D'autres études montrent que les cellules d'AML et de cancers pulmonaires dépendent de MCL-1 pour leur survie (Glaser et al., 2012 ; Munkhbaatar et al., 2020).

Dans le cancer gastrique, des niveaux élevés de BCL-W favorisent la survie, la migration et l'invasion des cellules malignes (Bae et al., 2006). BCL-W est aussi exprimé dans les adénocarcinomes colorectaux, avec des niveaux plus élevés dans les stades avancés (Wilson et al., 2000). Certains lymphomes semblent dépendre de BCL-W pour leur survie (Diepstraten et al., 2020).

La réduction des niveaux des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 a également été impliquée dans le développement et la résistance aux thérapies de plusieurs cancers. En effet, les protéines BH3-only comme BIM ou PUMA présentent des niveaux anormalement bas dans divers cancers (Garrison et al., 2008 ; Zantl et al., 2007). Une diminution de l'expression de PUMA a également été observée dans le mélanome sous-cutané, ce qui a été corrélé avec un mauvais pronostic (Karst et al., 2005). De plus, la down-regulation de BIM, causée par une délétion ou une hyper-méthylation du gène, a été signalée dans le LCM (Tagawa et al., 2005) et la DLBCL (Mestre-Escorihuela et al., 2007). De faibles niveaux de NOXA et BIM ont également été observés dans le cancer du côlon et le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Sinicrope et al., 2008). Des études ont rapporté une perte d'expression de BAX dans certains cancers humains, y compris les cancers de l'endomètre et du côlon (Miquel et

al., 2005 ; Sakuragi et al., 2002). Cependant, la perte combinée de BAX et BAK, qui serait nécessaire pour rendre les cellules résistantes à l'apoptose en raison de leur chevauchement fonctionnel important, est rarement observée dans les cancers humains, à l'exception de certains cas d'AML (Glaser et al., 2012).

6. Les BH3-mimétiques

Étant donné la dérégulation fréquente des membres anti-apoptotique de la famille BCL-2 dans le cancer, plusieurs sociétés pharmaceutiques ont développé des composés qui imitent les protéines BH3-only, les "BH3-mimétiques". Ces molécules organiques se lient avec une grande affinité et spécificité au sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, les inhibant et déplaçant les protéines pro-apoptotiques liées en imitant l'action des protéines BH3-only grâce à leur domaine BH3 (Montero and Haq, 2022). L'approbation réglementaire récente du vénétoclax pour le traitement de la LLC par la FDA en 2016 marque l'aboutissement de 30 ans de recherche dans de nombreux laboratoires à travers le monde. Parmi les étapes clés, on peut citer la découverte et le clonage de BCL-2 lors de la translocation t(14;18) dans les lymphomes folliculaires, la démonstration que BCL-2 inhibe la mort cellulaire et son expression élevée dans la LLC (Delbridge et al., 2016). Les principaux BH3-mimétiques existants sont cités dans le tableau ci-dessous (Tableau 3) :

| BH3-mimétique | Cible | Développeur |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| A1210477* | MCL-1 | Abb-Vie |
| AMG-176 | MCL-1 | Amgen |
| AZD-5991 | MCL-1 | AstraZeneca |
| PRT1419 | MCL-1 | Prelude Therapeutics |
| S64315/MIK665 (S63845) | MCL-1 | Servier/Novartis |
| ABT-263 (ABT-737) | BCL-2, BCL-XL, BCL-W | Abb-Vie |
| ABT-199 | BCL-2 | Abb-Vie |
| A1155463* | BCL-XL | Abb-Vie |
| A1331852* | BCL-XL | Abb-Vie |
| WEHI-539* | BCL-XL | WEHI |

Tableau 3 - Les principaux BH3-mimétiques développés

Liste des principaux BH3-mimétiques existants, avec leur cible et leur développeur (boîte pharmaceutique). Les BH3-mimétiques suivis d'une * sont ceux qui sont seulement en phase d'étude préclinique et qui n'ont pas donné suite pour des essais cliniques. Adapté d'après Montero & Haq Cancer Discov (2022).

Toutefois, bien que des avancées significatives aient été réalisées dans la compréhension des protéines de la famille BCL-2 et des agents comme le vénétoclax, d'autres BH3-mimétiques sont encore en phase de tests précliniques ou de tests *in vitro*, ce qui souligne la nécessité de poursuivre les recherches pour optimiser les traitements contre divers types de cancers (Dai et al., 2016).

Une autre notion clé émerge dans la compréhension de la réponse des cellules tumorales à ces thérapies : celle du priming mitochondrial (Ryan and Letai, 2013).

7. Notion de priming mitochondrial

Le priming, également appelé priming mitochondrial, est régulé par les protéines de la famille BCL-2. L'équilibre entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille BCL-2 et la disponibilité respective de leurs sites d'interaction déterminent le degré de priming d'une cellule et, par conséquent, l'apparition de la MOMP (Potter and Letai, 2016). Le priming est relatif ; plus une cellule est primée, plus le seuil apoptotique et la tolérance aux stimuli apoptotiques sont bas. Comme l'apoptose, le priming est affecté par un certain nombre de conditions physiologiques telles que la privation de facteurs de croissance, les changements de métabolisme ou les aberrations génétiques (Certo et al., 2006). Afin d'éviter l'apoptose, une cellule doit exprimer une quantité suffisante de protéines anti-apoptotiques pour se lier et inactiver les homologues pro-apoptotiques également présentes (Sarosiak et al., 2013).

Certo et Letai ont montré que certaines cellules vivent dans un état qui se distingue par leur dépendance à l'égard des protéines anti-apoptotiques pour survivre. Ces cellules sont « préparées à la mort », c'est-à-dire « primées » car la signalisation de la mort a amené les membres anti-apoptotiques à séquestrer des quantités significatives de protéines BH3-only, et ce, en fonction de leurs affinités spécifiques. L'inhibition des protéines anti-apoptotiques dans ces cellules, mais pas dans les cellules non primées, entraîne l'oligomérisation de BAX/BAK et la MOMP. Ils suggèrent qu'il existe trois états fonctionnels distincts en ce qui concerne la mort cellulaire programmée : non primé, primé pour la mort et mort. L'état de priming de la mort est un continuum, car l'ampleur des protéines BH3-only primant la mitochondrie peut, bien sûr, varier continuellement jusqu'à ce que la réserve anti-apoptotique soit dépassée, surmontée et que la cellule s'engage dans la mort cellulaire programmée en dépassant un certain « seuil apoptotique » (Figure 14) (Certo et al., 2006 ; Letai et al., 2002 ; Sarosiak et al., 2013).

Le BH3-profiling a été développé comme un outil fonctionnel pour mesurer expérimentalement le priming (Certo et al., 2006, p. 20 ; Letai et al., 2002 ; Ryan et al., 2010). Le test utilise des peptides BH3 synthétiques dérivés du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques BH3-only pour provoquer une réponse de la mitochondrie. Le priming est mesuré par le cytochrome c libéré par les mitochondries, induit par la MOMP (Ryan et al., 2016 ; Ryan and Letai, 2013). Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines BH3-only vont avoir des affinités différentes avec les protéines anti-apoptotiques. Les activatrices ont la capacité de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques avec des affinités similaires (Chen et al., 2005) alors

que les protéines sensibilisatrices vont avoir des liaisons plus sélectives avec les protéines anti-apoptotiques. Par conséquent, la spécificité des peptides BH3 pour les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 permet au BH3 profiling de différencier le priming global promiscuous (déterminé par l'augmentation de la MOMP après l'exposition à BIM, BID ou PUMA) d'une mesure plus sélective de la dépendance anti-apoptotique. Par exemple, si le BH3 profiling révèle que le peptide BH3 HRK, sensibilisateur, provoquait une MOMP, cela suggérerait que ces cellules sont probablement dépendantes de BCL-XL puisque HRK est un antagoniste sélectif de BCL-XL (Certo et al., 2006 ; Letai et al., 2002). Le peptide NOXA/MS1 est utilisé pour reconnaître la dépendance spécifique à MCL-1 (Opferman, 2016). Les BH3-mimétiques, qui sont spécifiques pour chaque membre anti-apoptotique, peuvent aussi être utilisés pour reconnaître la dépendance. C'est le cas du vénétoclax, qui permet de reconnaître spécifiquement la dépendance et le priming des cellules à BCL-2 (Touzeau et al., 2016).

Lorsqu'un panel de peptides BH3 sélectionnés est utilisé, le BH3-profiling peut permettre d'identifier la dépendance spécifique des cellules cancéreuses quelles sont susceptibles d'utiliser pour échapper à l'apoptose et fournit ainsi une mesure du degré de préparation de cette cellule et ainsi une indication sur le traitement qui pourra être utilisé pour induire l'apoptose (Deng et al., 2007). Le priming est en corrélation avec la réponse clinique au traitement ; par conséquent, des mécanismes visant à améliorer ce priming seraient bénéfiques pour les patients. Les mécanismes visant à améliorer le priming ont conduit au développement du BH3-profiling (Potter and Letai, 2016). Les cellules tumorales sont prétraitées avec un médicament et l'effet sur le priming est mesuré. Il peut être utilisé pour prédire la réponse cytotoxique d'un traitement *in vitro*, *in vivo* et, surtout, en clinique (Montero et al., 2015).

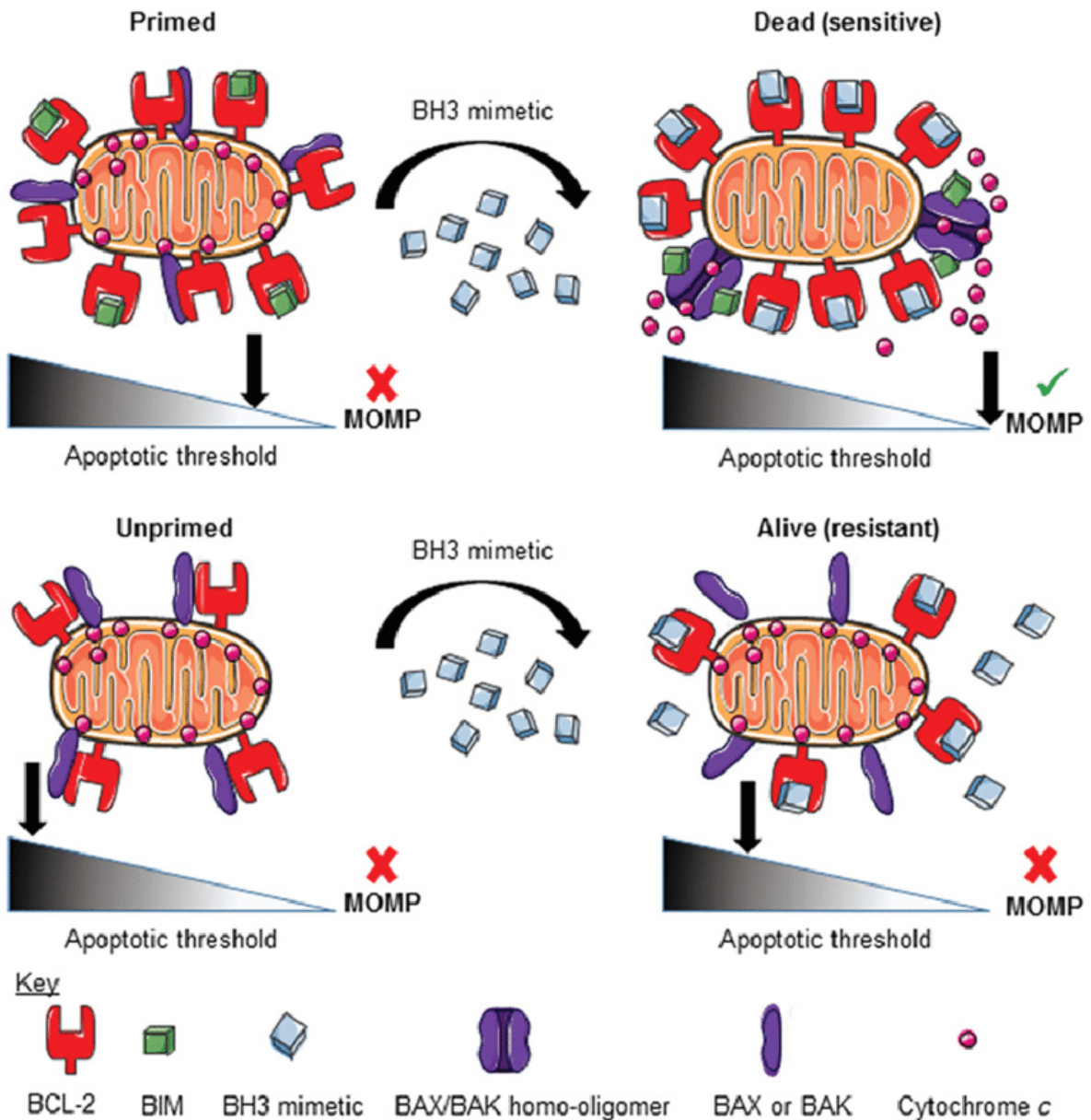


Figure 14 - Notion de priming mitochondrial

*Etat « primé » (primed) et « non primé » (unprimed) de la cellule en réponse à des stimuli apoptotiques. Le priming est relatif. Une cellule primée a un seuil apoptotique relativement plus bas qu'une cellule non primée. La conduite d'une réponse apoptotique par une molécule comme un BH3 mimétique peut provoquer la MOMP dans une cellule primée et non dans une cellule non primée. Ainsi, la MOMP avec une **x** indique qu'il n'y a pas eu de MOMP alors que celle avec un **✓** indique qu'il y a eu perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. D'après Potter SD et Letai A, Cold Spring Harb Symp Quant Biol (2016).*

Dans le MM, les taux sériques de la protéine M sont mesurés comme indication de la charge tumorale (Durie et al., 2006). Le BH3-profiling utilisant les peptides BMF et PUMA pour mesurer le priming a été réalisé sur 51 patients atteints de MM avant traitement. Cette étude a montré que le priming était corrélé à une diminution de la protéine M et donc de la charge tumorale après chimiothérapie. Le priming est également corrélé à de meilleurs résultats cliniques pour les patients après chimiothérapie. Les patients hautement sensibilisés ont une SSP plus longue que les patients mal sensibilisés (Chonghaile et al., 2011). Bien que les cellules de MM soient fortement primées pour la mort cellulaire, c'est-à-dire qu'elles présentent un priming mitochondrial élevé, elles parviennent néanmoins à échapper à l'apoptose (Punnoose et al., 2016).

8. Famille BCL-2 et MM

a. Dérégulation de la famille BCL-2 dans le MM

Les interactions entre les membres de la famille BCL-2 sont essentielles au devenir des cellules. L'échappement à l'apoptose promeut la survie des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000). Pour comprendre cet échappement à l'apoptose, notamment dans le MM, il est essentiel d'étudier l'expression des différents membres de la famille dans ce cancer.

Tout d'abord, l'équipe a comparé l'expression génique des membres de la famille BCL-2 au stade MGUS avec le stade MM. Elle a mis en évidence que parmi les membres anti-apoptotiques, seul MCL-1 était significativement régulé positivement dans le MM par rapport au stade MGUS alors que BCL-2 et BCL-XL restaient inchangés ou légèrement diminués. L'expression de toutes les protéines BH3-only n'a pas été modifiée au cours de la progression de MGUS vers MM. En revanche, l'expression de BAX et BAK est significativement augmentée dans le MM (Gomez-Bougie and Amiot, 2013). La surexpression des effecteurs est probablement due aux protéines anti-apoptotiques qui régulent leur expression, et notamment l'augmentation de MCL-1, qui forme des complexes majoritairement avec BAK (Gomez-Bougie et al., 2018).

Concernant le MM, l'équipe et d'autres ont montré le rôle majoritaire de la protéine anti-apoptotique MCL1 (Ferrarini et al., 2022). Au moins un tiers des cas de MM sont principalement dépendants de MCL-1, tandis que les autres sont soit dépendants de BCL-2, soit caractérisés par une co-dépendance BCL-2/MCL-1 (Gomez-Bougie et al., 2018 ; Punnoose et al., 2016 ; Slomp et al., 2019 ; Touzeau et al., 2016). En outre, une minorité de lignées cellulaires et d'échantillons primaires de MM présentent un certain degré de dépendance à la BCL-XL, autant au diagnostic qu'à la rechute (Gomez-Bougie et al., 2018). Le gène *MCL-1* est situé sur 1q21, qui est amplifié chez 43% au diagnostic à 72% à la rechute

des patients atteints de MM. Le gain de copies en 1q21 est en corrélation directe avec l'abondance du transcrit *MCL-1* et l'expression de la protéine MCL-1 (Slomp et al., 2019). Il est important de noter que les plasmocytes provenant de cas d'amplification en 1q21 sont particulièrement sensibles à l'inhibition de MCL-1, tout en se révélant relativement résistants au vénétoclax (Slomp et al., 2019). Un screening d'ARN interférents dans des échantillons de MM montre que *MCL-1* est un des gènes les plus importants dans la survie des patients (Tiedemann et al., 2012), ce qui a été confirmé par une étude démontrant que plus de 70% des HMCLs répondent à l'inhibition de MCL-1 (Gong et al., 2016). Enfin, l'équipe a démontré le rôle essentiel de MCL-1 dans la survie du MM puisque la dépendance à MCL-1 passe de près de 40% au diagnostic à 70% à la rechute (Gomez-Bougie et al., 2018). D'autre part, les cas de dépendance à BCL-2 sont enrichis parmi les MM présentant la translocation t(11;14)(q13;q32), qui est détectée dans 20 % des cas. Des rapports d'expression ARNm *BCL-2/MCL-1* et *BCL-2/BCL2L1* élevés sont d'ailleurs en corrélation avec la sensibilité au vénétoclax (Bodet et al., 2011 ; Gomez-Bougie and Amiot, 2013).

Concernant les membres pro-apoptotiques, l'équipe a fait une analyse comparative des 4 sous-groupes majeurs de MM, définis respectivement comme hyperdiploïde (HY) ou les translocations récurrentes d'IgH en 11q13 (*CCND1*), 16q23 (*MAF*) et 4p16 (*MMSET*). Ainsi, l'analyse des membres pro-apoptotiques a montré que les groupes *MAF* et *MMSET*, au pronostic le plus défavorable, présentent des niveaux plus élevés de BAX et BAK, contrairement au groupe *CCND1*, qui exprime les niveaux les plus faibles des deux effecteurs (Gomez-Bougie and Amiot, 2013).

Les protéines BH3-only activatrices (BIM, PUMA, BID) sont exprimées de manière homogène dans les 4 sous-types, ce qui suggère qu'indépendamment du sous-type, les cellules de MM sont primées à la mort (Gomez-Bougie and Amiot, 2013). Contrairement aux activatrices, les sensibilisatrices (BIK, NOXA, BAD) sont exprimées de manière hétérogène dans les différents sous-types de MM. Cependant, chaque sous-groupe MM exprime fortement au moins un sensibilisateur. En effet, BIK est majoritairement exprimé dans le sous-groupe *MAF*. De plus, NOXA a permis de discriminer le groupe *CCND1* des patients hyperdiploïdes et également le groupe *MMSET* des patients *MAF* avec une expression plus élevée dans les groupes *CCND1* et *MMSET*. Bien que la différence d'expression de NOXA soit impressionnante entre les 4 sous-types, son rôle dans la physiopathologie du MM reste à déterminer. Les patients hyperdiploïdes ont des niveaux de BAD significativement plus élevés que tous les autres sous-groupes, ce qui pourrait s'expliquer par la localisation de BAD sur le chromosome 11q1 car la trisomie du chromosome 11 est l'anomalie la plus fréquente dans ce sous-groupe (Gomez-Bougie and Amiot, 2013).

b. Ciblage des protéines de la famille BCL-2 dans le MM

Les cancers hématologiques, notamment le MM, présentent un fort priming mitochondrial. Dans ce type de cancers, l'évasion apoptotique repose sur l'activité de plusieurs protéines anti-apoptotiques visant à neutraliser de grandes quantités de pro-apoptotiques qui circulent dynamiquement entre le cytoplasme et les mitochondries. Le besoin d'un arsenal anti-apoptotique efficace crée une vulnérabilité spécifique qui est ciblée avec succès par le vénétoclax et d'autres BH3-mimétiques. Cette classe de petites molécules, développée au début des années 2000, cible l'interface d'interaction entre les membres anti- et pro-apoptotiques, permettant ainsi à ces derniers de déclencher la cascade apoptotique. Alors que dans certains cas une seule protéine anti-apoptotique constitue la seule barrière au déclenchement de l'apoptose, dans d'autres, plusieurs membres anti-apoptotiques agissent ensemble pour s'opposer à la MOMP (Diepstraten et al., 2022 ; Ferrarini et al., 2022 ; Merino et al., 2018).

i. Ciblage de la protéine BCL-2 par les BH3-mimétiques

L'utilisation du Vénétoclax (ABT-199) pour cibler BCL-2 en clinique est bien connu, puisqu'approuvé par la FDA pour les traitements de patients atteints de la LLC et de l'AML (Ma et al., 2021 ; Thol and Ganser, 2020). Du fait de la forte expression de BCL-2 dans le sous-groupe *CCDN1*, il se pose la question de l'efficacité de ces BH3-mimétiques dans le MM. Ainsi, il a été démontré que la sensibilité au vénétoclax dans le MM corrèle avec la surexpression de BCL-2 (Punnoose et al., 2016). L'équipe a démontré que les patients présentant une t(11;14) et un ratio BCL-2/MCL-1 ou BCL-2/BCL-XL élevé répondent au vénétoclax. Ceci s'explique par une mort induite par le décrochage de BIM de BCL-2 entraînant une mort caspase-dépendante (Touzeau et al., 2014). De plus, une forte expression de MCL-1 est corrélée avec la résistance au vénétoclax. Le laboratoire a mis en évidence que cibler les cellules avec le vénétoclax et le S63845 (BH3 mimétique ciblant MCL-1) induit la mort des cellules étant résistantes pour l'un ou l'autre de ses inhibiteurs seuls (Seiller et al., 2020). Des essais cliniques utilisant le vénétoclax sont actuellement en cours. L'essai NCT02755597 a donné de très bons résultats avec un taux de réponse à 84% sur la combinaison Vénétoclax/Bortézomib/Dexaméthasone (Kumar et al., 2020). Un autre essai de phase 1, NCT01794507, a aussi étudié chez des patients atteints de MM en rechute/réfractaire cette même combinaison. Le taux de réponse global est de 67 %. Les patients avec une expression élevée de BCL-2 avaient une réponse globale plus élevée (94 %) que les patients avec une faible expression de BCL-2 (59 %) (Moreau et al., 2017). Ces deux essais ont permis d'établir très récemment un nouvel essai clinique (NCT03123029) pour donner du vénétoclax seul aux patients. Enfin, un autre essai clinique, le NCT02899052, étude de phase 2 se base sur

l'utilisation du vénétoclax en combinaison avec du carfilzomib et de la dexaméthasone chez les patients réfractaires ou en rechute d'un MM, et a montré un taux de réponse global à 80% chez tous les patients et 92% chez les patients présentant une t(11 ;14). Le taux de réponse complète est de 41% avec une survie médiane sans progression de 22,8 mois (Costa et al., 2021). L'utilisation du vénétoclax en combinaison avec des PI, IMiDs ou encore avec du daratumumab ou de la dexaméthasone lors de ses différents essais semble donc très prometteuse quant à la future utilisation de ce BH3-mimétique, notamment chez les patients avec une t(11 ;14) (Aksoy et al., 2023).

Un autre inhibiteur de BCL-2, l'APG2575 a récemment montré son efficacité dans la DLBCL. Il a notamment montré une forte activité pour les cellules avec une forte expression de BCL-2 et une régulation positive de la protéine BIM (Q. Luo et al., 2020). De ce fait, un essai clinique est en cours avec cet inhibiteur chez les patients en rechute d'un MM, en combinaison avec de la dexaméthasone et du daratumumab et du lénalidomide ou du pomalidomide (NCT04942067).

L'ABT-737, ainsi que son analogue, le navitoclax (ABT-263) sont des BH3-mimétiques développés pour inhiber à la fois BCL-2, BCL-XL et BCL-W (Oltersdorf et al., 2005). Ces inhibiteurs permettent d'induire la mort de cellules de MM (Ackler et al., 2010 ; Bodet et al., 2011 ; Kline et al., 2007). De plus, l'efficacité de l'ABT-737 a été démontrée sur des cellules de patients de MM résistantes à différentes thérapies, comme le bortézomib, le melphalan ou encore la dexaméthasone (Chauhan et al., 2007 ; Trudel et al., 2007). Malheureusement, leur utilisation en clinique ne peut pas se faire en raison de thrombocytopénie causée par l'inhibition de BCL-XL.

Enfin, pour contrecarrer la thrombocytopénie induite par l'inhibition de BCL-XL en même temps que BCL-2, un autre inhibiteur spécifique de BCL-2 a été développé, le LOXO-338 et est en phase d'essai clinique dans plusieurs cancers hématologiques, dont le MM (NCT05024045).

ii. Ciblage de la protéine MCL-1 par les BH3-mimétiques

Etant donné le rôle de la protéine MCL-1 dans la survie des cellules de MM, et le fait que les patients ayant une amplification 1q surexpriment d'autant plus cette protéine (Slomp et al., 2019), il est d'un intérêt majeur de pouvoir cibler MCL-1. C'est pourquoi plusieurs BH3-mimétiques ciblant MCL-1 ont été développés au cours de ces dernières années. C'est le cas de l'A1210477 (Leverson et al., 2015), du S63845 (Kotschy et al., 2016), de l'AMG176 (Caenepeel et al., 2018) et de l'AZD5991, par exemple (Tron et al., 2018). Cependant, pour cause d'une toxicité cardiaque, ces BH3-mimétiques ne sont pas utilisés en clinique, notamment dans le traitement du MM.

Le BH3-mimétique S63845 a montré une très haute affinité pour MCL-1. Ainsi, les chercheurs ont démontré son efficacité à induire la mort dans plusieurs cancers, et notamment dans le MM (Kotschy et al., 2016). Notre équipe a montré que des lignées de MM *TP53*^{-/-} ont une expression diminuée de BAX, et que cette perte de BAX est liée à une résistance au S63845. La réponse au S63845 semble donc BAX dépendante dans des cellules TP53 sauvages (WT) (Durand et al., 2023). De plus, notre équipe et d'autres ont démontré que l'utilisation du S63845 avec le vénétoclax permet une forte synergie dans la mort induite à la fois dans les lignées de MM, mais aussi sur des cellules de patients (Algarín et al., 2020 ; Seiller et al., 2020). Mais du fait de sa forte toxicité cardiaque, le S63845 n'a pas pu aller jusqu'en clinique.

D'autre part, AstraZeneca a développé l'AZD5991. Cet inhibiteur déclenche l'apoptose en libérant la protéine effectrice BAK de MCL-1 pour induire une mort dépendante de la mitochondrie dans le MM (Tron et al., 2018).

On retrouve aussi les deux inhibiteurs développés par Amgen, l'AMG-397 (murizatoclax) et l'AMG-176 (tapotoclax). En inhibant MCL-1, ces deux molécules inhibent le complexe entre MCL-1 et BIM, déclenchant l'activité des caspases 3 et 7 pour induire la mort (Wei et al., 2020). Un essai clinique pour l'AMG-397 dans le MM a eu lieu (NCT03465540) mais a été arrêté pour des raisons stratégiques pour mieux se concentrer sur l'AMG-176. En effet, il semble avoir une meilleure affinité pour MCL-1 que l'AMG-397 et moins d'affinité pour les protéines BCL-2 et BCL-XL (Caenepeel et al., 2018). Malheureusement, l'essai clinique sur cette molécule a aussi été stoppé en raison de cardiotoxicité (NCT02675452).

Enfin, très récemment, un nouvel inhibiteur de MCL-1 a été développé : le PRT1419. Cet inhibiteur est très sélectif de MCL-1 et permet de bloquer son interaction avec BIM. Un essai clinique est en cours dans plusieurs tumeurs solides (NCT04837677).

Il semble donc complexe de cibler MCL-1 dans le MM, étant donné la dépendance des cardiomyocytes à MCL-1 (Wang et al., 2021).

iii. Ciblage de la protéine BCL-XL par les BH3-mimétiques

Il a été démontré que de nombreuses cellules cancéreuses dépendent de BCL-XL pour leur survie, ce qui a conduit au développement des BH3-mimétiques ciblant BCL-XL, comme le WEHI-539 (Lessene et al., 2013). Cependant, il n'existe pas d'études de cet inhibiteur dans le MM. Par la suite, deux autres molécules, aussi sélectives pour BCL-XL, ont été développées : le A1155463 et le A1331852. L'équipe a testé ces deux molécules, et très peu de HMCLs sont sensibles (21%) (Gomez-Bougie et al., 2018). L'utilisation de l'ABT-737 et le navitoclax, ciblant à la fois BCL-2 et BCL-XL ont montré leur efficacité dans le MM, bien que ces molécules ne puissent pas être utilisées en clinique (Bodet et al., 2011).

L'activité anticancéreuse encourageante de l'inhibition de BCL-2 et BCL-XL n'a cependant pas été ignorée et les sociétés pharmaceutiques développent de nouveaux inhibiteurs doubles. Premièrement, l'APG-1252 (pelcitoclax) induit une cytotoxicité et réduit la viabilité des lignées cellulaires MM résistantes au vénétoclax (Yamamoto et al., 2021). Plus récemment, le LP-118 a été conçu avec une structure spécifiquement modifiée pour optimiser son affinité pour BCL-XL, dans l'espoir que cela empêchera la toxicité provoquée par le navitoclax (Fonseca et al., 2022). Le LP-118 a montré une forte activité anticancéreuse dans les cellules de MM primaires et dans les HMCLs résistantes au vénétoclax. Un essai de phase I en cours évalue l'inhibiteur chez les patients en rechute ou réfractaires d'un MM, des patients atteints d'AML ou de leucémie aiguë lymphoblastique (NCT04771572). Si cet essai progresse vers des phases ultérieures, il est possible que le LP-118 réduise l'incidence de la thrombocytopénie par rapport au navitoclax chez les patients atteints d'une maladie hématologique. Cela constituerait une preuve de principe importante selon laquelle la thrombocytopénie ciblée peut être réduite par des modifications des BH3-mimétiques basées sur la structure qui améliorent la sélectivité. De nouvelles technologies peuvent aussi être envisagées pour cibler BCL-XL.

iv. Ciblage de la protéine BCL-XL par la technologie PROTAC

Les PROTACs (PROteolysis-TARgeting Chimeras) sont des molécules hétéro-bifonctionnelles qui favorisent la dégradation sélective et rapide de protéines intracellulaires par le protéasome en recrutant les complexes E3 ligases sur les substrats protéiques (Negi and Voisin-Chiret, 2022).

Le concept de PROTAC a été décrit pour la première fois dans les années 2000 par Zhou, Howley et leurs collaborateurs (Zhou et al., 2000). L'objectif du PROTAC est de créer une molécule chimérique qui relie une protéine cible à une E3 ligase.

D'un point de vue chimique, le PROTAC comprend deux pharmacophores distincts, qui sont reliés entre eux par un lien (« linker »). La structure d'un PROTAC ciblant BCL-XL contient un pharmacophore à une extrémité qui l'aide à se lier à la protéine BCL-XL, tandis que l'autre pharmacophore de l'autre côté se lie à l'E3 ligase. La liaison ultérieure de PROTAC à BCL-XL et l'E3-ligase amène l'E3 ligase à proximité de la protéine BCL-XL, ce qui favorise le transfert d'unités d'ubiquitine (Ub) vers les aa lysine exposés présents à la surface de la protéine BCL-XL. Le succès d'une molécule PROTAC repose sur sa capacité à former un complexe ternaire (dans ce cas, BCL-XL:PROTAC:E3-Ligase) (Figure 15A, [Negi and Voisin-Chiret, 2022](#)). Pour le ciblage spécifique de BCL-XL, l'accent a été mis sur le choix des ligands des E3 ligases, car l'expression des E3 ligases est spécifique à chaque cellule ([Bricelj et al., 2021](#)). Un niveau faible d'enzymes E3 ligase Von Hippel-Landau (VHL), a été trouvé dans les plaquettes humaines. Cette découverte a conduit les chercheurs à incorporer des ligands de VHL dans la stratégie du PROTAC ciblant BCL-XL afin de réduire la toxicité plaquettaire ciblée ([Khan et al., 2019](#)).

Les avantages que l'on peut donner à un PROTAC par rapport à un BH3-mimétique est le fait qu'il agisse de manière catalytique pour induire la dégradation d'une protéine cible. Le PROTAC est spécifique de sa cible et a généralement une activité plus longue mais une toxicité moindre que les inhibiteurs traditionnels, comme les BH3-mimétiques par exemple ([Sakamoto, 2010, 2005](#)). Comme les PROTACs s'appuient sur les E3 ligases pour induire la dégradation des protéines, il leur est possible d'atteindre une sélectivité cellulaire/tissulaire même lorsque leurs protéines cibles sont exprimées de manière ubiquitaire. Ils peuvent atteindre une telle sélectivité en ciblant les protéines sur une E3 ligase qui est exprimée de manière différentielle dans les cellules tumorales par rapport aux tissus normaux ([Bondeson et al., 2015](#) ; [Huang et al., 2018](#) ; [Lai et al., 2016](#) ; [Lu et al., 2015](#) ; [Raina et al., 2016](#) ; [Saenz et al., 2017](#) ; [Winter et al., 2015](#)).

C'est en 2019 que Khan et ses collaborateurs étudient un PROTAC qui cible BCL-XL, le DT2216. Le but du développement de ce PROTAC était de pouvoir inhiber BCL-XL en le dégradant afin de s'affranchir des effets de thrombocytopenies observés lors de l'utilisation d'un BH3-mimétique, comme l'ABT-263 ([Khan et al., 2019](#)).

Ainsi, ils montrent que le DT2216 a une activité anti-tumorale plus importante mais une toxicité plaquettaire réduite par rapport à l'ABT-263. Le test NanoBRET a mesuré la capacité du DT2216 à former des complexes ternaires avec les protéines BCL-XL et BCL-2 dans des cellules vivantes. Un complexe ternaire a été observé pour BCL-XL mais pas pour BCL-2, bien que le DT2216 ait montré une affinité de liaison plus élevée pour la protéine BCL-2 que pour BCL-XL ([Negi and Voisin-Chiret, 2022](#)). En effet, le DT2216 est composé de l'ABT-263, qui

cible donc spécifiquement BCL-XL, et du ligand qui reconnaît spécifiquement VHL. La protéine VHL fait partie du complexe E3 ubiquitine ligase VBC-Cul2. (Figure 15B). Le DT2216 cible ainsi directement BCL-XL, exprimé dans les cellules cancéreuses, tout en préservant les plaquettes (Khan et al., 2019). L'utilisation du DT2216 fait d'ailleurs l'objet d'un essai clinique en phase I dans des tumeurs malignes solides et hématologiques (NCT04886622).

D'autres études ont été menées, notamment sur des cancers hématologiques. En effet, de faibles doses de DT2216 ont permis d'induire la mort cellulaire dans les lymphomes à cellules T dépendants de BCL-XL *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (He et al., 2020 ; Jaiswal et al., 2023). Outre l'intérêt du DT2216 pour cibler les cellules cancéreuses dont la survie dépend de BCL-XL, il a été récemment démontré que le DT2216 pouvait améliorer l'immunothérapie du cancer en éliminant les cellules T régulatrices (Kolb et al., 2021).

v. Ciblage des effecteurs BAK et BAX

Étant donné que BAX et BAK sont les effecteurs critiques de l'apoptose, il est possible que des agents perméables à la membrane plasmique qui peuvent activer ces protéines soient efficaces dans le traitement du cancer.

Un des premiers activateurs à avoir été identifié est un activateur de BAX : le BTSA1. Cette molécule a été découverte dans le cas d'une étude sur l'AML. Les chercheurs montrent dans plusieurs lignées cellulaires mais aussi dans des échantillons de patients que le BTSA1 permet l'activation de BAX, ce qui permet *in fine* l'apoptose (Reyna et al., 2017).

Néanmoins, d'après le groupe d'Iyer, le fait de cibler directement BAK plutôt que BAX pourrait s'avérer particulièrement efficace pour empêcher l'apoptose non désirée ou, au contraire, pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. En effet, ils ont démontré grâce à l'anticorps 7D10 que quand on active la protéine BAK avec cet anticorps, BAK est capable d'aller auto-activer d'autres molécules de BAK mais aussi de BAX pour induire la mort. Ce qui n'est pas observé lorsque l'on active BAX avec un anticorps, comme le 6A7 (Iyer et al., 2020).

D'un autre côté, des agents qui inhibent directement l'activité de BAX ont été développés, notamment le MSN-125. Cet agent peut protéger les neurones contre les dommages toxiques *in vitro*. Ces agents doivent encore être optimisés avant de faire l'objet d'essais cliniques. Le développement de ces agents et d'autres devraient offrir de nouvelles possibilités pour inverser la progression des maladies due à une apoptose excessive, comme les maladies neurodégénératives (Niu et al., 2017).

De plus, l'émergence de protéines comme de nouveaux régulateurs de l'apoptose semblent être de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. C'est le cas notamment de la famille des VDACs, qui semblent jouer un rôle important dans l'apoptose en interagissant directement avec les membres de la famille BCL-2. En effet, un des objectifs majeurs de ma thèse est de comprendre comment VDAC2 régule les membres de la famille BCL-2 dans le contexte du MM, et plus particulièrement la régulation des effecteurs BAK et BAX.

III) Les canaux mitochondriaux VDACS

a. Introduction des canaux VDACS

1. Origine

Les VDACS (Voltage Dependent Anion Channels) sont également connus sous le nom de porines mitochondriales. Ils ont été découverts dans la membrane mitochondriale externe il y a presque 50 ans lorsque Schein et ses collaborateurs ont détecté une activité de formation de pore dans un extrait de mitochondries de la paramécie (*Paramecium tetraurelia*) (Schein et al., 1976). Après cette découverte, de nombreuses données sur les autres organismes vivants ont été publiées, et on ne parlait à l'époque que de la porine « VDAC ». Toutes ses études ont permis de dire que VDAC est une protéine qui présente des caractéristiques fonctionnelles et structurales très bien conservées au cours de l'évolution, montrant son rôle important (Benz, 1994 ; Colombini et al., 1996). Plusieurs protéines VDACS auraient pu évoluer au cours du temps et la 1^{ère} forme découverte est en 1993, lors d'un criblage génétique d'une bibliothèque d'ADNc. Ainsi, on lui donna le nom de VDAC1. La même année, VDAC2 fut isolée, puis l'année suivante VDAC3 (Blachly-Dyson et al., 1994, 1993 ; Ha et al., 1993).

Même si VDAC1 est la première protéine à avoir été bien caractérisée et que par la suite, on a donné aux autres protéines caractérisées les noms VDAC2, VDAC3, VDAC_n..., l'hypothèse est que VDAC3 est la protéine la plus ancienne. Il y aurait eu au cours de l'évolution chez les mammifères une divergence entre VDAC3 et VDAC1/2 il y a 365 ± 60 Millions d'Années (MA), tandis que la divergence entre VDAC1 et VDAC2 serait de 289 ± 63 MA (Mannella, 1996 ; Runke et al., 2000). VDAC1 peut donc être considérée comme la porine mitochondriale la plus récente, et c'est à l'heure actuelle la plus étudiée et la mieux comprise parmi les 3 porines (Young et al., 2007).

2. Structure

Organisation génique

Si les protéines VDAC1, VDAC2 et VDAC3 se ressemblent beaucoup, d'un point de vue de leur séquence et de leur structure, on ne peut pour autant pas parler d'isoformes. En effet, ces 3 protéines sont codées par des gènes que l'on retrouve sur 3 chromosomes différents. Mais dans toutes les publications sur les VDACS, le terme « d'isoforme » est employé pour parler de VDAC1, 2 et 3.

La toute première publication sur la localisation des gènes humains *VDAC1* et *VDAC2* (*hVDAC1* et *hVDAC2*) avait révélé une localisation respective sur les chromosomes X et 21

(Blachly-Dyson et al., 1994). Mais en 1999, Messina et ses collaborateurs montrent par la technique FISH que finalement le *hVDAC1* est sur le chromosome 5 et le *hVDAC2* sur le chromosome 10 (Messina et al., 1999). Quelques années plus tard, ils montrent la localisation du gène *VDAC3* humain (*hVDAC3*) sur le chromosome 8 (Messina et al., 2012).

Les mammifères, notamment l'Homme et la souris qui sont très étudiés pour les VDACs, ont la même organisation de ses gènes. En effet, *VDAC1* et *VDAC3* comportent 9 exons, tandis que *VDAC2* en a 10 (Figure 16). L'exon supplémentaire dans la séquence de *VDAC2* s'explique par 11 à 12 acides aminés supplémentaires que l'on retrouve dans l'extension N-terminale (Messina et al., 2012 ; Raghavan et al., 2012 ; Sampson et al., 1996). Il existe 70% d'identité de séquence nucléotidique entre les VDACs humains (*hVDACs*), et près de 90% de similitudes entre les VDACs humains et ceux de la souris (*mVDACs*) (Sampson et al., 1996a).

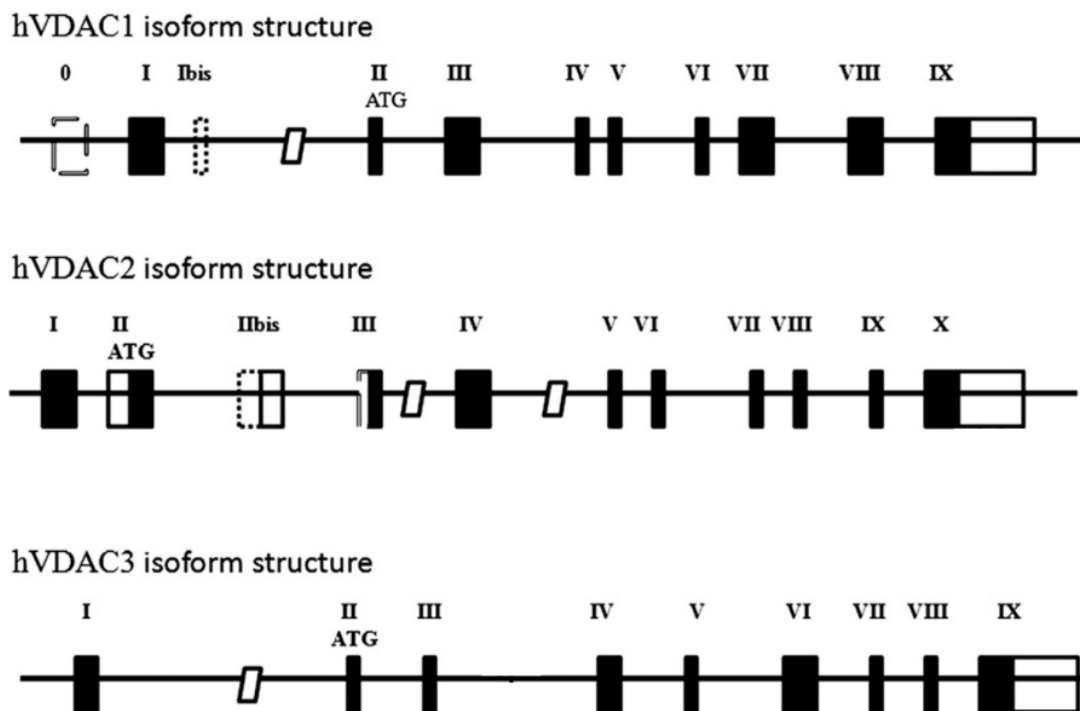


Figure 16 - Organisation génique des VDACs humains

*Les séquences géniques ne sont pas représentées à l'échelle. VDAC1 et VDAC3 ont 9 exons, et VDAC2 en comporte 10. Les codons de départ sont indiqués par « l'ATG ». L'ATG se trouve dans le 2^{ème} exon pour tous les VDACs. Les régions traduites sont remplies en noir et les régions non traduites sont laissées en blanc. Adapté d'après Raghavan A, Sheiko T, Graham BH et Craigen WJ, *Biochim Biophys Acta* (2012).*

Les recherches sur les gènes des VDACs chez l'Homme et la souris ont révélé l'existence de variants d'épissage alternatifs, apportant des informations importantes sur la diversité et la complexité de ces gènes (Zinghirino et al., 2021). Ces chercheurs ont fait l'analyse des séquences des transcrits humains de VDACs grâce aux bases de données publiques, telles qu'ENSEMBL et GenBank, via le Genome Browser de UCSC. Pour le gène humain *VDAC1*, deux exons supplémentaires ont été identifiés dans la région non traduite 5' (5'-UTR), suggérant la présence de deux variants de transcrits (Ha et al., 1993). Il y aurait jusqu'à 5 transcrits différents pour *VDAC1*. Cependant, ces variants ne modifient pas la séquence d'acides aminés et donneront *in fine* la même protéine (Raghavan et al., 2012 ; Zinghirino et al., 2021). Le gène *VDAC2* humain contient un exon 2 supplémentaire, ce qui entraîne une séquence N-terminale plus longue de 11 acides aminés (Ha et al., 1993). Cette caractéristique a été conservée au cours de l'évolution des mammifères, bien qu'elle soit absente chez certaines espèces. Ainsi, on peut retrouver jusqu'à 14 transcrits différents de *VDAC2*, et 3 transcrits semblent pouvoir former une protéine (Zinghirino et al., 2021, 2020). Pour le gène *VDAC3* humain, on retrouve jusqu'à 12 transcrits différents. Un transcrit alternatif a été découvert dans divers tissus. Il commence par un codon ATG supplémentaire situé entre les exons 3 et 4 et est traduit en une protéine plus courte et tronquée, possédant des caractéristiques similaires aux deux autres isoformes (Sampson et al., 1998). Cette étude des gènes *VDACs* et de leurs variants de transcrits chez l'Homme révèle une complexité génétique significative, avec des implications pour la compréhension de la régulation des protéines *VDAC* et leurs rôles (Zinghirino et al., 2021). De plus, des études sur l'activité transcriptionnelle des 3 *VDACs* a permis de montrer que c'est le promoteur de *VDAC3* qui a la plus forte activité transcriptionnelle tandis que *VDAC1* présente l'activité la plus faible. Le promoteur de *VDAC1* est le moins méthylé, tandis que celui de *VDAC2* est fortement méthylé (Zinghirino et al., 2021).

Structure protéique

Les protéines *VDACs* sont des protéines qui font environ 30 à 35kDa. La séquence principale des *VDACs* fait 285 acides aminés, et *VDAC2* présente 11 à 12 acides aminés en plus dans son extension N-terminale. Les *VDACs* partagent environ 70% de similitude dans leur séquence nucléotidique. Leur structure en 3D a permis de montrer que ce sont des canaux transmembranaires, constitués de 19 feuillets β et une région N-terminale constituant une hélice α (Bayrhuber et al., 2008 ; De Pinto et al., 2008, 2007 ; Hiller et al., 2008). Tous les feuillets β sont antiparallèles, sauf les feuillets 1 et 19, qui ferment le tonneau (« barrel ») avec leurs feuillets parallèles (Hiller et al., 2010). Une des particularités de *VDAC2* par rapport à *VDAC1* et *VDAC3* est que cette protéine a un enrichissement de cystéines dans sa séquence et notamment dans sa région N-terminale (Naghdi et al., 2015).

Tout d'abord, il y a eu la cristallisation VDAC1 à la fois chez l'Homme ([Hosaka et al., 2017](#)) et chez la souris ([Ujwal et al., 2008](#)). Il a été montré que le repliement (« folding ») de VDAC1 est très conservé entre l'Homme et la souris. La structure de VDAC2 a été cristallisée chez le poisson zèbre ([Schredelseker et al., 2014](#)) et caractérisée chez l'Homme, sans pour autant avoir une structure cristallisée ([Eddy et al., 2019](#)). VDAC3 n'a été modalisé qu'avec des outils prédictifs en se servant de la structure de VDAC1 ([Queralt-Martín et al., 2020](#)) (Figure 17).

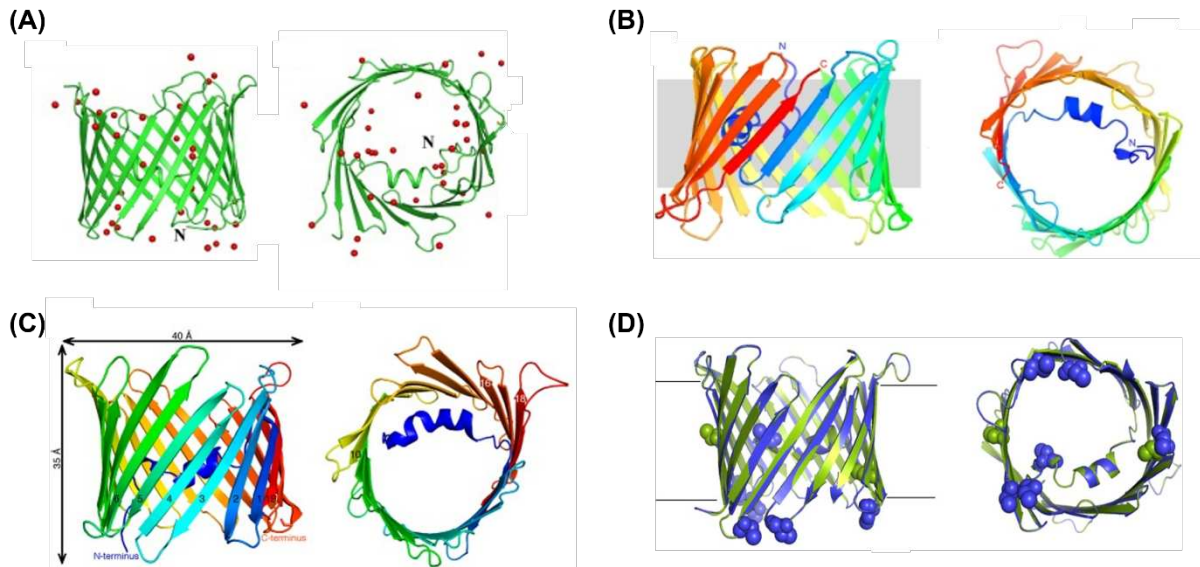


Figure 17 - Structures 3D des protéines VDAC1, VDAC2 et VDAC3

Chez les mammifères, les protéines VDACs sont constituées de 19 feuillets β et une hélice α N-terminale. Elles sont transmembranaires et s'intègrent dans la MOM. (A) Structure cristallisée du VDAC1 humain. Vue en parallèle (gauche) ou perpendiculaire (droite) à la membrane plasmique. La partie N-terminale est indiquée par la lettre « N » et les sphères rouges correspondent à des molécules d'eau. Adapté d'après [Hosaka T et al Protein Sci \(2017\)](#). (B) Structure cristallisée du VDAC1 chez la souris. Vue en parallèle (gauche) ou perpendiculaire (droite) à la membrane plasmique. La structure de la protéine mVDAC1 est colorée allant du bleu au N-terminal au rouge au niveau du C-terminal. Adapté d'après [Ujwal R et al Proc Natl Acad Sci USA \(2008\)](#). (C) Structure cristallisée de VDAC2 chez le poisson zèbre. Vue en parallèle (gauche) ou perpendiculaire (droite) à la membrane plasmique. La structure de la protéine est colorée allant du N-terminal (bleu) au C-terminal (rouge). Adapté d'après [Schredelseker J et al J Biol Chem \(2014\)](#). (D) Représentation schématique de la structure de VDAC1 chez la souris (en vert) superposée à un modèle de VDAC3 humain (en bleu). Vue en parallèle (gauche) ou perpendiculaire (droite) à la membrane plasmique. Les résidus cystéines sont représentés par des sphères. Adapté d'après [Queralt-Martín M et al J Gen Physiol \(2020\)](#).

3. Expression

Les premières informations sur l'expression tissulaire spécifique des VDACs chez les mammifères ont été obtenues par des expériences de Northern blot et de RT-PCR dans les années 1990. Il a été observé un niveau comparable de transcrits VDACs dans presque tous les tissus humains et murins, avec pour les deux espèces une prédominance de VDAC1. Ainsi, ils ont montré qu'il y avait une grande quantité de transcrits de VDAC1 et VDAC2 dans le cerveau, le muscle squelettique, le cœur, le système digestif et le système reproducteur (Ha et al., 1993; Sampson et al., 1996a, p. 199).

De plus, VDAC2 et VDAC3 sont fortement exprimés dans les organes reproducteurs, dans des endroits spécifiques des spermatozoïdes et des ovocytes, tandis que VDAC1 est exclusivement présent dans les régions nécessaires au développement des gamètes, c'est-à-dire dans les cellules de Sertoli (De Pinto et al., 2008 ; Hirsch et al., 2001).

À ce jour, les informations disponibles sur les niveaux de VDACs sont principalement liées à l'étude des changements entre les conditions physiologiques et pathologiques. Ces données sont issues de nombreux projets sur des données de séquençage à haut débit et de données transcriptomiques, sur les VDACs humains et de souris (Baldarelli et al., 2021 ; GTEx Consortium, 2015 ; Zinghirino et al., 2021, 2020). Ainsi, l'expression ubiquitaire des VDACs dans les tissus humains a été confirmée, surtout dans le muscle squelettique et le cœur. En général, le niveau d'ARNm de VDAC1 reste le plus important, suivi de près par VDAC2, et VDAC3 est moins exprimé à l'exception des testicules où VDAC3 est le plus exprimé. La forte expression de VDAC1 peut aussi être expliquée par le fait de la faible méthylation de son promoteur (Figure 18, Zinghirino et al., 2020).

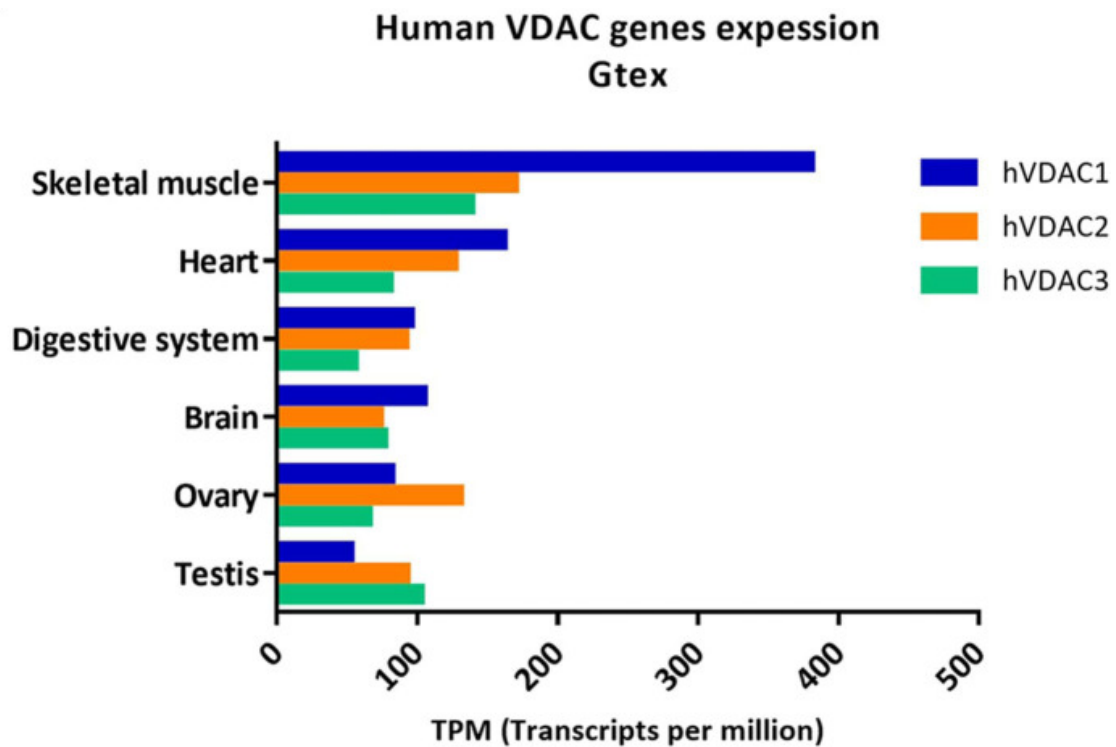


Figure 18 - Expression des gènes des VDACS chez l'Homme dans différents tissus

Le niveau d'expression des gènes VDAC de l'homme dans les tissus les plus courants est obtenu à partir de Genotype-tissue expression (GTEx) lié à l'Atlas d'expression de EMBL-EBI open science ressource (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) D'après *Zinghirino et al Front Physiol (2021)*.

b. Les différentes fonctions des VDACS

Les protéines VDACS sont considérées comme les protéines les plus abondantes à la MOM. De ce fait, elles ont un rôle majeur à la mitochondrie et sont importantes dans la régulation métabolique, dans les flux ioniques, mais aussi dans l'apoptose et dans la régulation des organes reproducteurs (*Heslop et al., 2021*).

1. Fonction physiologique et électrophysiologique

D'un point de vue physiologique, VDAC2 et VDAC3 semblent jouer un rôle dans la mobilité des spermatozoïdes. En effet, une équipe a montré que VDAC2 et VDAC3 ont un rôle essentiel pour maintenir l'interaction entre les mitochondries et le cytosquelette et pour stabiliser les spermatozoïdes pendant leur motilité (*Liu et al., 2011 ; Triphan et al., 2008*).

Comme tout canal, les protéines VDACS sont définies par leur capacité à être en conformation canal « ouverte » ou « fermée », qui définira le passage des molécules au travers du canal. Elles sont aussi définies par leur conductance, c'est-à-dire leur capacité à faire traverser les ions par leur pore aqueux. Les canaux VDACS sont insérés dans la MOM, où la membrane est non polarisée voire faiblement polarisée. Cela leur permet de rester dans une conformation ouverte, avec une haute conductance. Des potentiels de membranes à la fois positifs ou négatifs peuvent induire des changements de conformation vers un état fermé qui conduira à une conductance inférieure (Zhang and Colombini, 1990, 1989).

Actuellement, il n'est pas encore possible de déterminer les potentiels de membrane à travers la MOM dans des cellules vivantes, mais des chercheurs ont fait l'hypothèse qu'il existe une polarisation de la MOM (Lemeshko, 2021). Cela pourrait notamment s'expliquer par la différence de pH entre le cytosol et l'IMS qui est de 0.6 et qui correspondrait à un potentiel de membrane d'environ -15mV (Porcelli et al., 2005). Ainsi, il est possible que le voltage contribue à l'ouverture des VDACS (Zizi et al., 1998).

Plusieurs groupes ont donc montré que les canaux VDACS vont être sélectifs pour les anions quand le canal est en conformation « ouverte », et ils vont être sélectifs aux petits cations, comme le sodium (Na^+), le potassium (K^+) et le Ca^{2+} quand le canal est en conformation « fermée » (Choudhary et al., 2010 ; Colombini, 2016, 2012 ; Sander et al., 2021 ; Tan and Colombini, 2007 ; Villinger et al., 2014). Le diamètre d'ouverture du pore est de 3.1 – 3.5 nm dans la MOM quand le canal est en conformation ouverte, permettant le passage de molécules allant jusqu'à environ 5kDa (Colombini, 1980 ; Mannella, 2021).

Quand le canal est fermé, ce diamètre diminue, d'où le fait que seules de petites molécules comme certains cations peuvent passer. La fermeture des VDACS augmenterait le flux de Ca^{2+} jusqu'à 10 fois (Tan and Colombini, 2007). Seuls VDACC1 et VDACC2 semblent impliqués dans la signalisation calcique à ce jour (Sander et al., 2021b). Il reste encore des choses inconnues concernant ses flux de Ca^{2+} . En effet, un flux élevé de Ca^{2+} qui passe au travers des VDACS à la MOM n'est pas corrélé à une augmentation de la teneur en Ca^{2+} dans la mitochondrie.

Après avoir passé la MOM par les VDACS, le Ca^{2+} est dans l'IMS, et doit passer la MIM, notamment par l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU) (Fan et al., 2020), ou encore d'autres transporteurs spécifiques (Palmieri and Pierri, 2010). Ainsi, cela pose la question de connaître le devenir de ce flux de Ca^{2+} qui passe par les VDACS jusqu'à l'arrivée dans la matrice mitochondriale, pouvant notamment influencer le métabolisme mitochondrial.

La conductance des VDACs peut être modulée par d'autres protéines, telles que la tubuline α/β (Maldonado et al., 2013 ; Rostovtseva et al., 2008), l'hexokinase II (Al Jamal, 2005 ; Pastorino et al., 2002), les membres de la famille BCL-2 (Tsujimoto and Shimizu, 2000), le glutamate (Gincel and Shoshan-Barmatz, 2004) ou encore le NADH (Zizi et al., 1994). Il a également été démontré que les modifications post-traductionnelles, principalement la phosphorylation par les protéines kinases, GSK3 β , PKA et la protéine kinase C ϵ , bloquent ou inhibent l'association des VDACs avec d'autres protéines, telles que BAX et t-BID, et régulent l'ouverture des VDACs (Baines et al., 2007 ; Das et al., 2008 ; Vander Heiden et al., 2001). L'ouverture des canaux VDACs peut également être modulée par des interactions protéine-protéine avec l'actine, la protéine p53, la créatine kinase mitochondriale et l' α -synucléine, notamment (Kanwar et al., 2020 ; Rovini et al., 2020).

2. Fonction métabolique

L'ouverture des canaux VDACs permet le passage des anions, et peut permettre à des molécules jusqu'à 5 kDa de passer. Ainsi, le passage de tous les métabolites pour aller dans la mitochondrie passe par ses canaux, à l'état ouvert seulement. Un modèle structurel propose d'ailleurs que l'extrémité N-terminale de VDAC1 (l'hélice α) située à l'intérieur du pore, parallèlement à la paroi, se déplace vers la lumière en bloquant le passage des métabolites lors de la conformation « fermée » du canal (Shuvo et al., 2016).

Indépendamment du mécanisme contrôlant le gating, c'est-à-dire l'état « ouvert » ou « fermé » du canal, le flux de métabolite à travers les VDACs est principalement déterminé par leur charge et leur taille (Colombini, 2004, 1980). De ce fait, VDAC1, VDAC2 et VDAC3 sont stratégiquement situés à l'interface entre les mitochondries et le cytosol afin de contrôler le flux de métabolites et d'ATP entrant ou sortant des mitochondries. Un des rôles majoritaires de la mitochondrie est de produire de l'ATP par la chaîne respiratoire. L'ATP nouvellement synthétisé est transportée vers le cytosol par le translocateur de nucléotides d'adénine, situé dans la MIM, et est échangé contre de l'ADP dans un rapport molaire de 1:1 pour être finalement libéré dans le cytosol par les canaux VDACs (Klingenberg, 2008).

L'AMP, un autre nucléotide adénine, traverse également la MOM par l'intermédiaire des VDACs. Par conséquent, la régulation de l'ouverture du VDAC influence le rapport ATP/AMP qui, à son tour, module l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (Colombini, 2016 ; Shevade et al., 2018).

L'état conformationnel ouvert ou fermé des VDACs régule aussi le flux des substrats respiratoires, l'ATP⁴⁻, l'ADP³⁻, l'HPO₄²⁻, et la phosphocréatine²⁻ (Colombini, 2012 ; Sander

et al., 2021 ; Tan and Colombini, 2007). De ce fait, la prédominance d'un des deux états en particulier déterminera non seulement l'efficacité bioénergétique des mitochondries, mais aussi leur capacité à fournir des intermédiaires métaboliques pour la synthèse des aa (comme la glutamine, la glycine, la sérine, la leucine, l'isoleucine, la valine et le tryptophane), des acides gras, des nucléotides, du cholestérol, ou encore du glucose (Spinelli and Haigis, 2018). Les VDACS permettent aussi le passage du NADH, cofacteur enzymatique très important dans le métabolisme énergétique (Zizi et al., 1994).

Cette implication dans le flux des métabolites montre donc le rôle des VDACS dans de nombreuses voies, comme la glycolyse (Pastorino and Hoek, 2008) ou encore la production de ROS (Han et al., 2003). Les protéines VDACS fonctionnent donc comme un « interrupteur biologique » qui, à l'état ouvert maximisent le flux de métabolites pour une fonction mitochondriale optimale, tandis qu'à l'état fermé, elles minimisent le métabolisme mitochondrial (Heslop et al., 2021). Une autre fonction majeure des protéines VDACS est la régulation de l'apoptose, par des interactions non-canoniques avec des membres de la famille BCL-2 notamment.

3. Fonction dans l'apoptose

L'équipe de Shimizu démontre pour la première fois en 1999 le rôle des canaux VDACS dans l'apoptose par une interaction avec la famille BCL-2. En effet, ils ont montré que la porine VDAC est associée à BCL-XL, qui va fermer le canal et que cela prévient le relargage de cytochrome c dans le cytosol. BAK et BAX quant à eux permettent d'accélérer l'ouverture du VDAC permettant le relargage du cytochrome c (Shimizu et al., 1999).

4. Les souris déficientes en VDACS

En plus de la caractéristique de protéine la plus abondante à la mitochondrie, le rôle et l'importance de chacune des protéines VDACS a aussi pu être déterminée par l'étude des souris déficientes en VDAC1, VDAC2 ou VDAC3.

VDAC3

L'importance de VDAC3 dans la spermatogenèse a été démontrée en utilisant la souris comme modèle. En effet, les souris invalidées pour VDAC3 sont en parfaite santé, mais les souris mâles sont toutes infertiles (Sampson et al., 2001). Une publication plus récente montre aussi un rôle important de VDAC3, puisque les souris KO pour VDAC3 montrent une augmentation des ROS, une altération du transport rénal de Na⁺ et provoque de l'hypertension (Zou et al., 2018).

VDAC1

Si VDAC1 a un rôle très important, notamment dans l'apoptose qui sera développé juste après, l'inactivation de cette protéine chez la souris n'a pas causé de déficits majeurs. En effet, Anflous et ses collaborateurs ont montré que les souris VDAC1 KO présentent seulement quelques défauts dans les muscles squelettiques et des modifications des paramètres cinétiques de certaines enzymes mitochondriales (Anflous et al., 2001). Weeber et ses collaborateurs eux ont montré quelques changements dans l'ultrastructure des mitochondries, avec notamment un agrandissement de celles-ci, et une légère létalité *in utero* (Weeber et al., 2002).

VDAC2

Enfin, il n'a pas été possible de générer des souris VDAC2 KO. En effet, l'équipe de Cheng et ses collaborateurs ont montré que lorsque l'on invalide VDAC2 chez la souris, celles-ci meurent à l'état embryonnaire (Cheng et al., 2003). Cela a permis de montrer l'importance de VDAC2, notamment dans le processus d'apoptose.

c. VDACs et apoptose

Le destin cellulaire est contrôlé par la balance qu'il peut exister entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2. De nouvelles protéines émergent comme régulant le processus d'apoptose (Arai et al., 2020 ; Chipuk et al., 2004 ; Huang et al., 2023). C'est le cas des protéines VDACs.

La première hypothèse sur le rôle des VDACs dans la mort était que les VDACs faisaient partie du complexe du pore de transition de perméabilité (PTP) mitochondrial qui permettait la libération du cytochrome c dans le cytosol (Shimizu et al., 1999). Ceci était notamment appuyé par le fait que les VDACs sont les protéines les plus abondantes à la MOM (De Pinto et al., 2010 ; Shoshan-Barmatz et al., 2010). Mais cette hypothèse fut réfutée puisque même si ses protéines jouent un rôle dans l'apoptose, des études génétiques ont démontré qu'elles sont dispensables à ce processus de mort. En effet, il a été montré que le relargage de cytochrome c, le clivage des caspases et la mort cellulaire étaient similaires dans les cellules WT et dans les cellules délétées en VDACs (Baines et al., 2007 ; Czabotar et al., 2014).

1. VDAC1, apoptose et famille BCL-2

VDAC1 semble plutôt jouer un rôle pro-apoptotique (Shoshan-Barmatz et al., 2020). En effet, des études ont montré que VDAC1 peut former des d'hétéro-oligomères avec BAX, ou former seulement des oligomères de VDAC1 afin de former des pores à la MOM et favoriser la libération des facteurs apoptogènes, comme le cytochrome c, ou encore la protéine SMAC/DIABLO (Banerjee and Ghosh, 2004 ; Keinan et al., 2010).

VDAC1 peut également réguler l'apoptose en interagissant directement avec les protéines anti-apoptotiques (Magri et al., 2018 ; Shoshan-Barmatz et al., 2017). En effet, l'oligomérisation de VDAC1 est inhibée par les protéines BCL-2 et BCL-XL. La mutagenèse dirigée a été utilisée pour identifier les domaines de VDAC1 qui interagissent avec BCL-2 et BCL-XL et les résultats indiquent que c'est la région N-terminale de VDAC1 qui est importante pour leur interaction (Arbel et al., 2012 ; Arbel and Shoshan-Barmatz, 2010). De plus, des études ont montré que la surexpression de VDAC1 permet l'induction de l'apoptose alors que la surexpression des protéines anti-apoptotiques, telle que BCL-2, permet de l'en empêcher (Zaid et al., 2005). Enfin, il a aussi été démontré que MCL-1 interagit directement avec VDAC pour augmenter l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} et la génération de ROS et ainsi favoriser la migration cellulaire (Huang et al., 2014).

Ce rôle de VDAC1 dans l'apoptose pourrait en partie être expliqué par le fait qu'il interagissent avec BCL-2, BCL-XL et MCL-1 et que cela permette un contrôle des flux de Ca^{2+} à travers le RE et les membranes mitochondriales (Distelhorst and Bootman, 2011 ; Eckenrode et al., 2010). Le domaine BH4 de BCL-XL cible sélectivement VDAC1 et inhibe l'apoptose en diminuant l'absorption de Ca^{2+} médiée par VDAC1 dans les mitochondries (Monaco et al., 2015).

2. VDAC2, apoptose et famille BCL-2

i. VDAC2 et BAK

C'est en 2003 que la publication dans Science de Cheng et ses collaborateurs permet de démontrer le rôle majeur que VDAC2 joue dans l'apoptose, et surtout son rôle « anti-apoptotique ». En effet, ils démontrent par une technique de cross-linking que la protéine BAK est associée à une autre protéine. C'est par chromatographie liquide et spectrométrie de masse qu'ils révèlent que cette protéine associée est VDAC2. Il existe donc un complexe VDAC2 et BAK dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), mais il n'existe pas de complexe avec VDAC1 ou VDAC3. Le complexe VDAC2-BAK disparaît lorsque les mitochondries sont traitées avec du t-BID ou que les cellules sont traitées avec des stimuli de

mort comme le TNF α ou l'étoposide. L'expression des membres BH3-only BAD, BIM ou t-BID induit la mort des cellules et diminue la quantité de complexe VDAC2-BAK dans les cellules. L'expression de VDAC2 inhibe significativement l'apoptose dans les cellules MEFs dépourvues en BAX (BAX $^{-/-}$) qui expriment BAK, mais n'a pas d'effet dans les cellules dépourvues en BAK (BAK $^{-/-}$), qui expriment BAX. Dans les MEFs dépourvues en VDAC2 (VDAC2 $^{-/-}$), seule une partie de BAK subit un changement de conformation spontané ; l'activation complète nécessite un stimulus tel que le t-BID ou la staurosporine. En revanche, les réponses des cellules WT et des cellules déficientes en VDAC2 sont similaires lorsque la voie extrinsèque de la mort est activée par le TNF α . VDAC2 permet donc d'inhiber l'activation de BAK en le séquestrant sous sa forme inactive pour empêcher le déclenchement de l'apoptose dans les MEFs (Cheng et al., 2003).

Une autre équipe, en utilisant aussi un modèle murin, montre que la déplétion de VDAC2 dans le thymus entraîne une forte mort cellulaire. Cette mort est inhibée lorsque VDAC2 est ré-exprimé, mais est une nouvelle fois abolie lorsque BAK, et non BAX, est supprimé (Ren et al., 2009). De plus, la dissociation de l'interaction entre VDAC2 et BAK par BCL-XS induit l'apoptose dans les cellules de mélanome (Plötz et al., 2012).

VDAC2 semble être nécessaire pour le recrutement de BAK à la membrane mitochondriale, puisque les MEFs dépourvus en VDAC2 ont une diminution de l'expression de la protéine BAK, et cette protéine est uniquement retrouvée dans le cytosol (Lazarou et al., 2010 ; Roy et al., 2009). De plus, VDAC2 semble nécessaire à l'apoptose induite par le BH3-only t-BID. En effet, les MEFs dépourvues en VDAC2 sont pratiquement insensibles à la MOMP et à l'apoptose induites par le t-BID, alors que les MEFs dépourvues en VDAC1 et VDAC3 répondent normalement. Les MEFs VDAC2 $^{-/-}$ retrouvent leur sensibilité au t-BID après réexpression de VDAC2. La sensibilité au t-BID des MEFs BAK $^{-/-}$ est également réduite, mais pas dans la même mesure que les MEFs VDAC2 $^{-/-}$. Ainsi, VDAC2 joue un rôle crucial dans l'apoptose en permettant le recrutement mitochondrial de BAK, contrôlant ainsi la MOMP et la mort cellulaire induite par t-BID (Roy et al., 2009).

Le complexe VDAC2-BAK peut être extrait de mitochondries non-apoptotiques par solubilisation à la digitonine. Dans des cellules HeLa, l'analyse de ce complexe par électrophorèse sur gel bleu-natif (ou BN-PAGE) a révélé une taille apparente d'environ 400 kDa, indiquant un complexe multi-protéique, avec d'autres protéines que VDAC2 et BAK impliquées (Lazarou et al., 2010 ; Ma et al., 2014). En effet, une étude de spectrométrie de masse a révélé la présence des protéines VDAC1 et VDAC3 dans ce complexe (Chin et al., 2018). Ce macro-complexe peut être dissocié par des BH3-only, comme t-BID par exemple,

et l'hélice $\alpha 6$ de BAK semble être importante dans la formation de ce complexe puisqu'il n'existe plus quand les résidus de l'hélice sont mutés et BAK ne peut plus s'oligomériser pour induire la mort (Ma et al., 2013).

En plus des signaux apoptotiques induits par l'étoposide, la staurosporine ou encore t-BID, il a été montré que les BH3-mimétiques jouent un rôle dans la mort cellulaire induite par BAK et que VDAC2 inhibe ce rôle. En effet, une étude montre que lors d'un signal apoptotique induit par l'A1331852 ou le S63845 dans des MEFs VDAC2^{-/-} BAX^{-/-}, où seul BAK est présent, il y a une libération de cytochrome c puis une activation des caspases (Huang et al., 2023). Une autre étude montre aussi que lors d'un traitement avec l'ABT-737 et le S63845 dans des cellules HeLa, la majorité du complexe entre VDAC2 et BAK est dissocié permettant la formation d'homo-dimères de BAK pour induire la mort cellulaire (Bernardini et al., 2019).

En plus de son rôle à la mitochondrie et dans l'apoptose mitochondriale, l'axe VDAC2-BAK semble être impliqué dans la régulation de la perméabilité des peroxysomes. En effet, une étude a montré, dans un modèle de cellules ovariennes de hamster chinois déficient en peroxysomes, ZP114, que VDAC2 n'y est pas exprimé. VDAC2 permettrait ainsi de sauver cette déficience peroxysomale. De plus, la perte de VDAC2 entraîne une relocalisation de BAK des mitochondries vers les peroxysomes, entraînant cette déficience peroxysomale (Fujiki et al., 2017 ; Hosoi et al., 2017).

Le rôle de la protéine VDAC2 sur BAK a principalement été montré dans des modèles murins de MEFs, et il mériterait d'être plus étendu dans des modèles chez l'Homme, et notamment dans le cancer. Une meilleure connaissance de l'interaction qui existe entre les deux protéines pourraient notamment permettre de comprendre les mécanismes sous-jacents à cette régulation de la mort cellulaire et ainsi comprendre l'implication de VDAC2 dans l'apoptose (Yuan et al., 2021).

ii. Résidus impliqués dans l'interaction VDAC2 – BAK

Cheng et ses collaborateurs ont montré que le mutant BAK L76E dans des MEFs rompt l'interaction entre VDAC2 et BAK et que la triple mutation W123A/G124E/R125A ne la rompt pas mais la réduit. Les résidus W123 G124 et R125 sont retrouvés dans le domaine BH1 au niveau de l'hélice $\alpha 5$ de BAK et le résidu L76 au niveau du domaine BH3. Enfin, il semblerait que d'autres résidus dans le domaine BH1 de BAK, se trouvant au niveau de l'hélice $\alpha 4$, les résidus K111 et K118, soient à proximité de VDAC2 (Cheng et al., 2003).

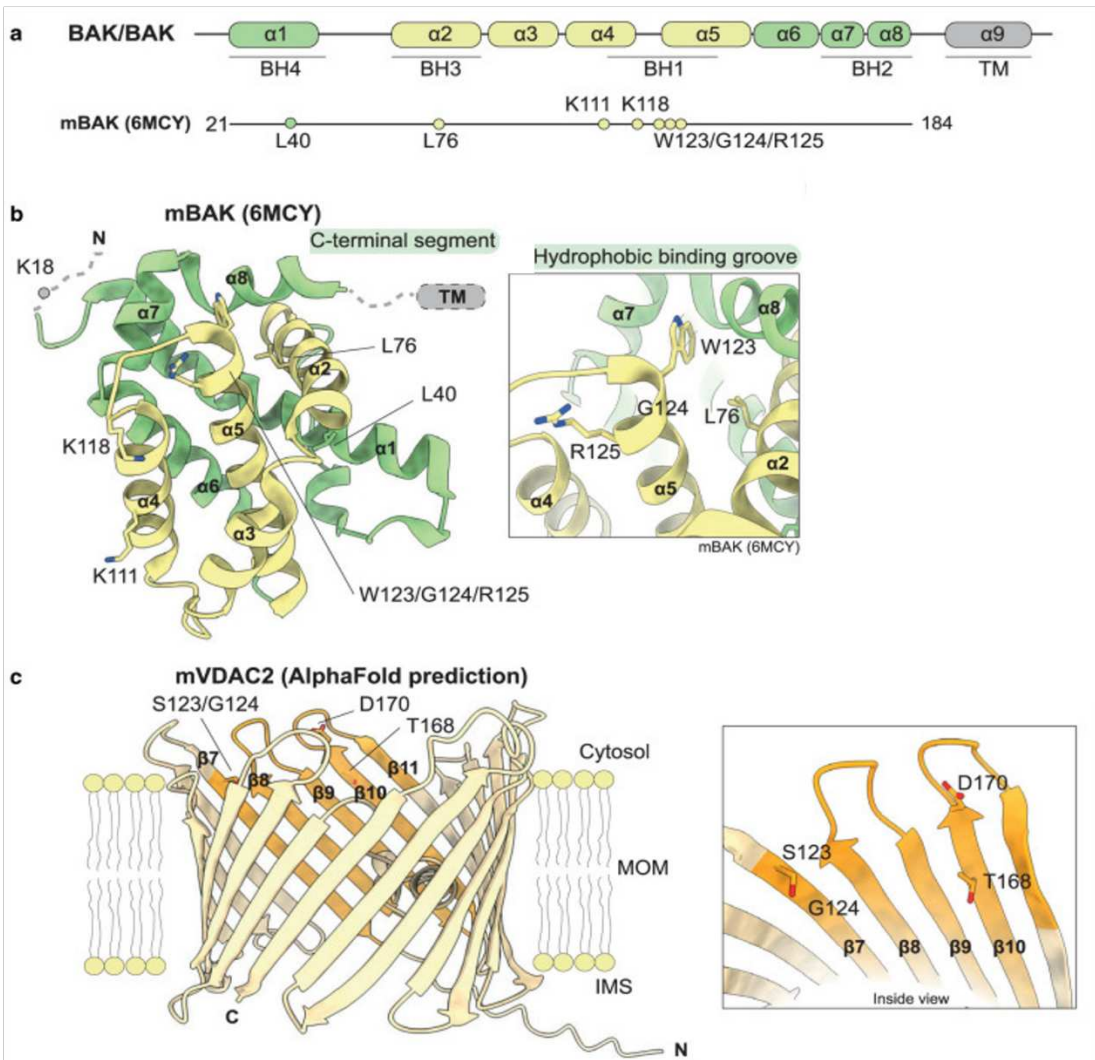
La mutation du résidu L76E de BAK chez la souris, qui correspond à la mutation du résidu L78E pour le BAK humain, a été étudiée par une équipe avec de la modélisation structurale du VDAC2 et du BAK humains. Ils ont confirmé que cette mutation réduit l'affinité entre VDAC2 et BAK (Dudko et al., 2020).

Puisque VDAC2 semble nécessaire pour l'importation mitochondriale de BAK et l'apoptose induite par t-BID, Naghdi et ses collaborateurs ont utilisés des constructions chimériques de VDAC1 et VDAC2 pour les réinsérer dans des MEFs VDAC2^{-/-}. Ainsi, ils ont montré que les cystéines de l'extension N-terminale de VDAC2 ne sont pas nécessaires ni dans l'importation de BAK, ni dans la mort induite par t-BID. Néanmoins, ils ont identifié une région importante, allant des résidus 123 à 179, et notamment deux résidus critiques, le T168 et le D170. Les résidus S123 et G124 semblent aussi importants. Ainsi, la région entre les feuillets β 7 à β 10 semble importante dans l'interaction VDAC2-BAK puisque ces différents résidus sont dans cette région. Ces motifs sont aussi conservés dans le VDAC2 du poisson zèbre (zVDAC2). De ce fait, grâce à la structure cristallisée du zVDAC2, les chercheurs ont montré que les résidus critiques spécifiques à VDAC2 contribuent à créer une "poche" ouverte distinctive vers le cytoplasme qui pourrait faciliter le recrutement de BAK (Figure 19A) (Naghdi et al., 2015).

Très récemment, les travaux de thèse de Zheng Yuan ont permis la publication d'un article identifiant les résidus clés dans l'interaction entre VDAC2 et BAK dans un modèle de MEFs, afin de pouvoir moduler l'apoptose en ciblant directement l'interaction entre ses deux protéines (Yuan et al., 2024). Ainsi, ils démontrent que la mutation de A172 du VDAC2 murin, qui correspond à A171 sur le VDAC2 humain, dans la boucle β 10-11 de VDAC2 affecte la localisation de BAK et la stabilité du complexe VDAC2-BAK (Figure 19B).

De plus, une autre étude montre que le complexe peut être fortement perturbé par un marquage obstructif du sillon hydrophobe de BAK. En effet, le sillon BAK se lie directement à VDAC2 et les protéines BH3, notamment BIM, sont probablement en compétition avec VDAC2 pour le sillon. Cette étude a montré qu'un peptide BH3-BIM peut se lier au sillon de BAK avec une grande affinité et déplacer BAK du complexe avec VDAC2 (Brouwer et al., 2017).

A)



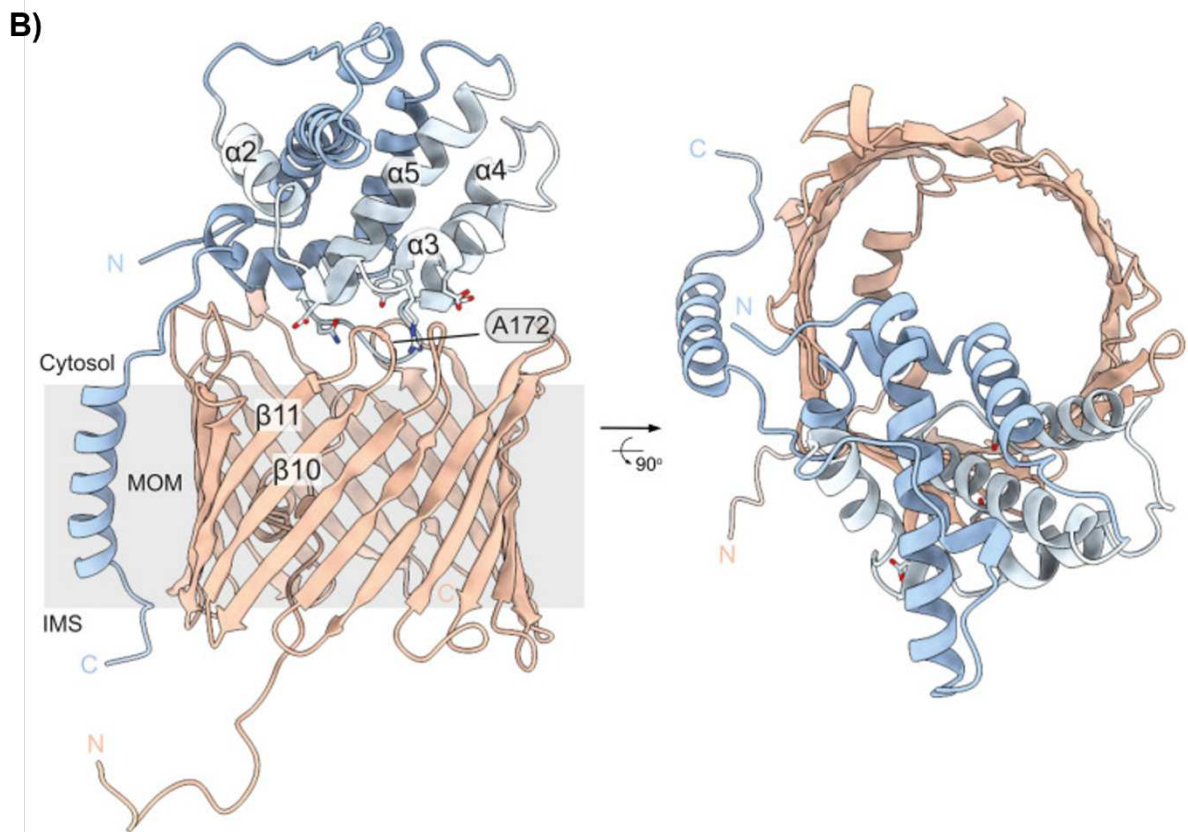


Figure 19 - Résidus impliqués dans les interactions entre VDAC2 et BAK chez la souris

(A) (a) Diagramme des protéines effectrices pro-apoptotiques BAX et BAK avec les résidus d'interaction VDAC2 proposés sur la protéine BAK de souris (mBAK). (b) La structure cristallisée de mBAK est représentée avec les hélices α 2 à 5 formants le sillon hydrophobe de surface représenté en jaune ; les résidus impliqués dans l'interaction VDAC2-BAK sont représentés par des bâtonnets. Les résidus d'interaction proposés sur BAK peuvent être classés en trois points : le sillon de liaison hydrophobe canonique de BAK formé par les hélices α 2 à 5 (avec les résidus G124, W123, R125 puis K111 et K118) ; une petite région derrière le sillon de liaison canonique centrée autour de L40 et L76 mBAK ; le domaine TM de BAK et l'extrémité C-terminale de l' α 8. (c) Le modèle prédit par AlphaFold2 du mVDAC2 (UniProt : Q60930) est représenté en jaune avec β 7-10 mis en évidence en orange. La région de VDAC2 impliquée dans l'interaction VDAC2-BAK a été cartographiée dans sa région β 7-10, où T168 et D170 sont considérés comme cruciaux, tandis que S123 et G124 sont également pertinents. Ils se situent tous dans la région de VDAC2 orientée vers le cytosol et orientée vers l'intérieur du pore. Adapté d'après [Yuan Z et al Biochem Soc Trans \(2021\)](#). **(B)** Modélisation de l'interaction entre VDAC2 et BAK chez la souris. A gauche, vue en parallèle et à droite vue en perpendiculaire à la membrane plasmique. Les principaux résidus pour VDAC2 sont situés au niveau des feuillettes β 10 et β 11, et le résidu A172 est essentiel pour l'interaction. Adapté d'après [Yuan Z et al PLoS Biol \(2024\)](#).

Une nouvelle interface d'interaction entre VDAC2 et BAK a donc été récemment cartographiée permettant de mieux comprendre la nature de ce complexe au niveau de la MOM. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents permettant la mort cellulaire restent à établir. La stabilisation de l'interaction VDAC2-BAK pourrait être une stratégie thérapeutique potentielle pour inhiber l'apoptose dans des contextes tels que les maladies auto-immunes ou neurodégénératives.

iii. VDAC2 et BAX

Contrairement au rôle anti-apoptotique que l'on pourrait donner à la protéine VDAC2 pour BAK, elle semble avoir un tout autre rôle concernant l'autre effecteur, BAX.

En utilisant des cellules cancéreuses HCT116, une étude montre que l'extinction de BAK dans les cellules dépourvues de BAX les rend totalement résistantes à l'apoptose, tandis que l'extinction de BAK dans les cellules exprimant BAX n'affecte que légèrement leur sensibilité. De plus, dans les cellules BAX^{-/-}, les complexes oligomériques avec VDAC2 sont réduits et BAK n'interagit pas avec VDAC2. Ces résultats montrent que VDAC2 joue un rôle anti-apoptotique envers BAK, mais qu'il semble jouer un rôle différent avec BAX, plutôt pro-apoptotique (Chandra et al., 2005).

Ces résultats sont confirmés par l'étude de Yamagata et ses collaborateurs. En effet, ils démontrent qu'en absence de BAK et de VDAC2, les MEFs sont résistantes à la mort et la réintroduction de VDAC2 permet l'induction de la mort BAX dépendante, en absence de BAK (Yamagata et al., 2009).

Ma et ses collaborateurs ont montré que si VDAC2 et BAK font partis d'un complexe d'environ 400 kDa, où l'on retrouve aussi VDAC1 et VDAC3, la protéine BAX en fait également partie. De plus, dans un modèle de MEFs, ils confirment le rôle de VDAC2 dans l'import à la fois de BAK et de BAX à la mitochondrie, et que dans des cellules dépourvues en VDAC2 et quand BAK est inhibé, BAX ne peut plus transloquer à la MOM et s'oligomériser pour induire la mort. VDAC2 et BAK sont donc nécessaires à l'apoptose médiée par BAX (Ma et al., 2014).

De plus, si VDAC2 est nécessaire pour l'ancrage de BAK à la mitochondrie, il est tout aussi important pour l'ancrage de BAX. En effet, une étude a montré que VDAC2 est une plateforme de rétrotranslocation de BAX. Ils montrent que dans des MEFs que VDAC2 assure l'association membranaire spécifique de BAX à la mitochondrie et, en l'absence de VDAC2, BAX se localise dans d'autres compartiments cellulaires, comme le cytosol. La rétrotranslocation de BAX nécessite la présence de métabolites, de nucléotides mais surtout d'ions, principalement le Ca²⁺. Ceci explique donc pourquoi VDAC2 est nécessaire, puisque c'est ce canal qui régule le flux d'ions et de métabolites au travers de la MOM (Lauterwasser et al., 2016).

Enfin, pour démontrer le rôle pro-apoptotique de VDAC2 envers BAX, Chin et ses collaborateurs montrent que VDAC2 est nécessaire pour la mort induite par BAX et permet même de limiter le développement tumoral (Chin et al., 2018). En effet, ils ont montré dans une étude de CRISPR/Cas9 screen que VDAC2 est nécessaire pour la fonction de BAX mais pas pour la fonction de BAK dans des MEFs dépourvues en MCL-1. Ils confirment le complexe existant entre VDAC2 et BAX. Dans des cellules de cancer colorectal, HCT116, et contrairement à d'autres études portant sur d'autres modèles (Huang et al., 2023), ils montrent que la délétion de VDAC2 entraîne une résistance à la mort aux BH3-mimétiques ABT-737 et A1331852. Cette résistance est observée dans les cellules BAX^{-/-} alors que les cellules BAK^{-/-} continuent de répondre aux BH3-mimétiques, suggérant un rôle de VDAC2 nécessaire dans l'induction de la mort par BAX. Enfin, ils montrent que la seule délétion de BAK n'induit pas un fort développement tumoral mais la co-délétion de VDAC2 et BAK accélère ce développement tumoral, confirmant le fait que VDAC2 est un acteur clé dans l'activation de BAX lors d'un stress oncogénique (Chin et al., 2018).

Enfin, une étude a identifié le rôle de VDAC2 en tant qu'effecteur direct et spécifique de la mort cellulaire médiée par les céramides. Cette fonction repose essentiellement sur un résidu Glu chargé qui assure un contact direct avec le groupe de tête de la céramide à l'intérieur de la bicouche. Les expériences de photo-affinité indiquent que la liaison des céramides à VDAC2 est sensible au pH et contrôlée par l'état de protonation du Glu enfoui dans la membrane. De plus, les auteurs suggèrent que la liaison du céramide à VDAC2 peut engager les cellules dans la mort en bloquant la rétrotranslocation de BAX. Néanmoins, le mécanisme sous-jacent n'est pas connu et reste à établir (Dadsena et al., 2019).

D'un point de vue structural, l'interaction entre VDAC2 et BAX est très peu connue. L'étude de Yuan et ses collaborateurs en 2024 démontrent que si le résidu de VDAC2 A172 murin est important pour son interaction avec BAK, il l'est tout autant pour son interaction avec BAX (Yuan et al., 2024). En effet, lorsque VDAC2A172 est muté en tryptophane, cela diminue la stabilité de l'interaction avec BAK, et davantage de BAX est associé à VDAC2. Inversement, la mutation de VDAC2A172 en leucine ou isoleucine a des effets opposés sur l'interaction de VDAC2 avec ces deux protéines : elle déstabilise les interactions avec BAX, mais stabilise les interactions avec BAK.

Dudko et ses collaborateurs ont pu éclaircir avec de la modélisation comment les interactions de VDAC2 avec la famille BCL-2 peut réguler l'apoptose (Dudko et al., 2020). Ainsi, leurs résultats montrent que les protéines t-BID, BAK et BAX ont des affinités de liaison différentes avec VDAC2, avec t-BID ayant la plus forte affinité suivie par BAK, puis BAX. Les complexes

protéiques transitoires sont continuellement formés et dissociés, et une protéine concurrente peut temporairement remplacer une autre à un site de liaison. Ainsi, t-BID peut déplacer BAK et BAX des complexes avec VDAC2, ce qui facilite l'insertion de ces protéines dans la membrane mitochondriale. Cependant, le comportement de BAK et BAX après leur déplacement par VDAC2 reste à explorer, et des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement le rôle de VDAC2 dans la régulation de l'apoptose et les mécanismes mis en place.

VDAC2 présente donc un rôle qui est controversé dans la littérature depuis une vingtaine d'années. Si VDAC2 inhibe l'apoptose dépendante de BAK en le stabilisant et le séquestrant sous sa forme inactive (Cheng et al., 2003), il est nécessaire pour l'apoptose médiée par BAX et permet de limiter le développement tumoral (Chin et al., 2018). Il est donc essentiel de comprendre quel rôle il joue dans un contexte cancéreux.

d. VDACs et cancer

1. Expression des VDACs dans le cancer

Au-delà de leur rôle dans le métabolisme mitochondrial et dans l'apoptose, les protéines VDACs sont également un biomarqueur pronostic pour certains types de cancers humains (Jóźwiak et al., 2020).

L'expression de VDAC1 est augmentée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses par rapport aux lignées cellulaires normales (Shoshan-Barmatz and Ben-Hail, 2012). Les modifications de l'expression du gène *VDAC1* dépendent du type de cancer. Dans le NSCLC, la surexpression de *VDAC1* est en corrélation avec la progression de la tumeur, tandis que dans les tumeurs de l'œsophage, la sous-expression de *VDAC1* peut être interprétée comme le mécanisme moléculaire associé à la progression du cancer. Une corrélation entre l'expression de VDAC1 et la malignité de la tumeur a été trouvée dans les tumeurs de l'adénocarcinome du poumon (Grills et al., 2011 ; Jóźwiak et al., 2020 ; Yang et al., 2019).

L'expression des gènes *VDAC2* et *VDAC3* dans le cancer est encore insuffisamment étudiée. Reina et ses collaborateurs ont suggéré que VDAC3 est un marqueur potentiel de l'état oxydatif mitochondrial dans le cancer (Reina et al., 2016). Ce rôle dans le cancer est également soutenu par une autre étude montrant que VDAC3, qui est fortement exprimé dans les testicules et les spermatozoïdes, interagit avec de nombreuses protéines pour former un réseau modulant le cancer (Messina et al., 2014).

Le niveau d'ARNm de *VDAC3* est plus faible dans les tissus cancéreux du foie que dans les tissus normaux adjacents (Zhang et al., 2018). En revanche, le niveau d'expression élevé de *VDAC1*, *VDAC2* ou *VDAC3* ne prédit pas de manière significative une OS plus courte dans les tumeurs de l'endomètre (Józwiak et al., 2020). De plus, ils observent une diminution du niveau de la protéine *VDAC3* dans les tumeurs des patients diabétiques par rapport au groupe non diabétique. Les résultats suggèrent que les altérations chroniques de la disponibilité du glucose peuvent avoir un impact sur le niveau d'expression de *VDAC3*. Cependant, il est intéressant de noter que l'expression de *VDAC3* ne semble pas avoir de valeur pronostique pour le cancer humain, ce qui suggère encore une fois un rôle différent de ce canal (Heslop et al., 2021).

Des bases de données montrent des niveaux élevés de transcription de *VDAC2* dans de nombreuses tumeurs, y compris le mélanome et le cancer du sein. Cette forte expression de *VDAC2* est également associée à un mauvais pronostic. Enfin, étant donné que les souris *VDAC2* KO ne sont pas viables (Cheng et al., 2003), cela montre que *VDAC2* peut être une cible potentielle thérapeutique afin d'induire la mort de cellule cancéreuses. Le niveau de *VDAC2* est surexprimé dans les cellules de mélanome, les cellules de tumeur thyroïdienne épithéliale et le mésothéliome, avec une diminution conséquente de l'expression de *BAK* (Maldonado et al., 2013 ; Yagoda et al., 2007). De plus, une analyse de survie a montré une forte association entre une forte expression de *VDAC2* et un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre, par rapport à l'utilité pronostique de *VDAC1* et de *VDAC3* (Józwiak et al., 2020).

D'autres études sont nécessaires pour expliquer les mécanismes d'altération de l'expression des *VDACs* dans l'apparition et la progression des cancers. Néanmoins, les protéines *VDACs* semblent être des cibles de choix pour cibler l'apoptose de manière indirecte dans le traitement anti-cancéreux, tout particulièrement *VDAC2*, avec son rôle à la fois anti-apoptotique envers *BAK* et pro-apoptotique envers *BAX*.

2. Ciblage pharmacologique de la protéine *VDAC2*

i. WEHI-9625

L'interaction entre *VDAC2* et *BAK* est essentielle et constitue une cible thérapeutique potentielle afin de permettre l'induction de l'apoptose. Cibler cette interaction permettrait ainsi de développer de nouveaux activateurs de l'apoptose. Ainsi, des chercheurs ont réalisé un criblage de petites molécules capables de cibler cette interaction, notamment le WEHI-9625. Cependant, au lieu de perturber l'interaction pour favoriser l'apoptose, cette molécule semble plutôt stabiliser l'interaction entre *VDAC2* et *BAK* et ainsi prévenir l'apoptose chez la souris.

Les chercheurs ont mis en évidence deux régions importantes dans la protéine BAK pour l'activité du WEHI-9625, une région située dans l'hélice $\alpha 1$ et une autre région dans l'hélice $\alpha 9$, impliquant les résidus L40, F181, R182, R183, D184 and T188 chez la souris (le résidu L40 correspondant au résidu R42 chez l'Homme) (van Delft et al., 2019). Bien qu'il existe près de 90% d'homologie entre les VDACs chez l'Homme et la souris, cette étude a mis en évidence que si le WEHI-9526 permet de stabiliser l'interaction entre VDAC2 et BAK chez la souris, dans des modèles de MEFs, cette molécule ne permet pas de bloquer l'apoptose médiée par le BAK humain. Ceci permet de se demander s'il existe des différences dans l'interaction entre ces deux protéines chez l'Homme et la souris, et que cela pourrait avoir des conséquences sur l'apoptose. De ce fait, la plupart des études menées sur VDAC2 et BAK au cours de ces dernières années ont été réalisées sur des MEFs, et se pose donc la question du rôle de cette interaction chez l'Homme, et de la pertinence de ces résultats dans des cellules cancéreuses.

ii. Erastine

En 2003, Dolma et ses collaborateurs ont utilisé des expériences de criblage à grande échelle afin de trouver des molécules capables d'induire la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, ils ont découvert un nouveau composé pouvant induire la mort sélectivement des cellules cancéreuses modifiées surexprimant l'oncoprotéine Small T et l'oncogène « RAS ». Ils ont de ce fait nommé ce composé « érastine » (Dolma et al., 2003).

Cependant, contrairement à d'autres molécules qui permettent d'induire l'apoptose, notamment grâce au relargage du cytochrome c et l'activation des caspases provoquant la fragmentation de l'ADN, l'érastine semble induire la mort par ferroptose (Dixon et al., 2012).

Une première étude a permis de montrer que l'érastine peut cibler les protéines VDACs, puisque l'utilisation de cette molécule modifie la perméabilité de la MOM des mitochondries (Yagoda et al., 2007). L'érastine peut induire la ferroptose en se liant à VDAC2 et VDAC3, ce qui conduit à l'ubiquitination et à la dégradation subséquente des canaux par le protéasome dans des cellules de mélanomes. Cela se produit grâce la protéine Nedd4 dont l'expression est induite par le traitement à l'érastine, qui conduit à l'ubiquitination et à la dégradation des deux canaux (Yang et al., 2020).

En plus de son rôle dans l'induction de la ferroptose, l'érastine semble jouer un rôle dans la modulation du métabolisme. En effet, l'érastine permet l'ouverture des VDACs, ce qui entraîne trois effets biologiques importants : une augmentation du métabolisme par une augmentation du $\Delta\psi M$, une diminution de la glycolyse et une augmentation de la production de ROS (DeHart et al., 2018 ; Fang and Maldonado, 2018 ; Lemasters, 2017 ; Reina and De Pinto, 2017).

iii. Efsevin

Après la découverte de l'érastine, qui n'est pas spécifique puisqu'elle touche VDAC2 mais aussi VDAC3, puis le WEHI-9625, qui stabilise spécifiquement l'interaction entre VDAC2 et BAK, mais ne semble le faire que dans le modèle murin, le développement de d'autres composés, ciblant spécifiquement le VDAC2 humain, semblent nécessaires. Ainsi, c'est en 2015 qu'un autre composé spécifique a été découvert. Ce composé est considéré comme un modulateur de VDAC2, et il n'existe aujourd'hui que 6 publications qui mentionnent cette molécule.

La découverte de cette molécule, l'efsevin, a été faite grâce à une étude sur un modèle particulier de poisson zèbre. Dans ce modèle, que l'on appelle « *tre* », le locus *tremblor* code pour une isoforme d'un échangeur de Na^+ et de Ca^{2+} à la mitochondrie (NCX1h). Les poissons *tre* mutants ont la particularité d'avoir des dysfonctions au niveau du signal calcique, ce qui provoque des contractions cardiaques chaotiques ressemblant à une fibrillation cardiaque. Afin de corriger les arythmies cardiaques, un criblage de plusieurs composés a été réalisé pour trouver une molécule capable de rétablir le rythme cardiaque dans ce modèle particulier.

Ainsi, le dihydropyrrole carboxylique ester, nommé aussi efsevin, a été identifié (Shimizu et al., 2015 ; Smaligo et al., 2018). Ainsi, Shimizu et ses collaborateurs ont montré que le traitement à l'efsevin rétablit des courants calciques réguliers permettant de restaurer les contractions coordonnées dans les cœurs des poissons zèbres *tre* mutés. En utilisant des approches biochimiques et génétiques, ils ont montré que l'efsevin interagit spécifiquement avec VDAC2 et potentialise son activité de transport du Ca^{2+} mitochondrial dans les cardiomyocytes.

Par la suite, l'efsevin a été utilisé par plusieurs chercheurs pour étudier les arythmies cardiaques. Schweitzer et ses collaborateurs ont travaillé sur un modèle murin de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique mais aussi dans des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites provenant d'un patient atteint de tachycardie ventriculaire. Ainsi, ils ont montré que l'utilisation de l'efsevin permet de corriger les arythmies cardiaques en se fixant à VDAC2 sur la MOM. Cet effet antiarythmique est aboli lorsque le MCU, qui est situé à la MIM, est bloqué. L'utilisation d'un activateur de MCU, le kaempférol, permet de reproduire les effets antiarythmiques de l'efsevin (Schweitzer et al., 2017). Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'augmentation de la captation mitochondriale de Ca^{2+} pour supprimer les événements arythmogènes. L'efsevin semble donc être une molécule intéressante pour prévenir des arythmies cardiaques déclenchées par le Ca^{2+} (Sander et al., 2021b).

Shankar et ses collaborateurs ont aussi démontré le rôle de VDAC2 dans l'insuffisance cardiaque. Ils montrent que la perte de VDAC2 dans le myocarde dans un modèle murin entraîne une altération sévère du couplage excitation-contraction en modifiant la signalisation calcique intracellulaire et mitochondriale qui évolue vers une cardiomyopathie sévère et la mort. La réintroduction de VDAC2 chez des souris VDAC2^{-/-} âgées de 6 semaines a permis de corriger partiellement le phénotype de la cardiomyopathie. Mais l'utilisation de l'efsevin permet de corriger la cardiomyopathie en laissant le Ca²⁺ entrer dans la mitochondrie *via* la protéine VDAC2 (Shankar et al., 2021).

Pour mieux comprendre comment fonctionne l'efsevin et comment cette molécule peut interagir avec VDAC2, Wilting et ses collaborateurs ont fait des études sur la base structurelle de l'interaction entre VDAC2 et l'efsevin (Wilting et al., 2020). Ainsi, en utilisant le modèle de la protéine VDAC2 cristallisée du poisson zèbre (zVDAC2), ils ont purifié cette protéine pour l'insérer dans des bicouches lipidiques planes. Ils ont observé que l'efsevin réduit les courants de VDAC2, ce qui permet de garder VDAC2 dans un état de canal « fermé ». De plus, les chercheurs ont identifié le site de liaison de l'efsevin. En effet, l'efsevin s'insère dans un sillon entre la paroi du canal interne (au niveau d'un feuillet β) et l'hélice α , ce qui permet de garder le canal en position fermée en créant des liaisons hydrogènes. Le remplacement de trois résidus (N207, K236 et N238) de ce site de liaison par des alanines (zVDAC2AAA) a entraîné une perte totale de la sensibilité à l'efsevin (Figure 20). Ainsi, ils démontrent que la liaison de l'efsevin avec VDAC2 permet de garder le canal en conformation « fermée », permettant une captation de Ca²⁺ dans la mitochondrie, expliquant l'effet antiarythmique de cette molécule.

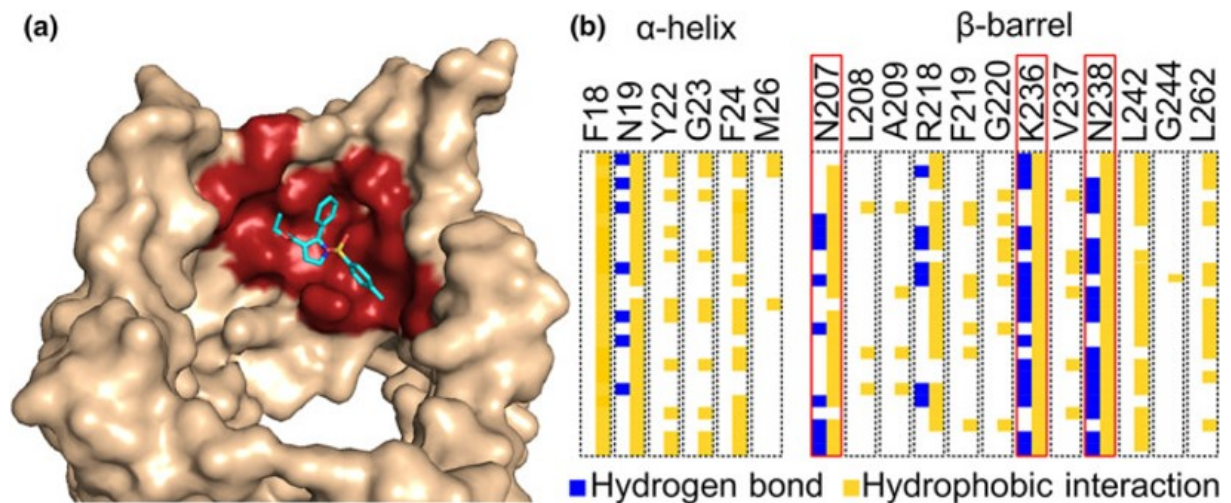


Figure 20 - Prédiction du site d'interaction entre VDAC2 et l'Efsevin

Modélisation du site de liaison prédit de l'efsevin sur le zVDAC2. (a) Une vue latérale du canal montre une poche de liaison (rouge) pour l'efsevin (bleu clair) située dans l'espace intermédiaire entre la paroi interne du canal et l'hélice α à l'extrémité N-terminale. (b) L'analyse de 25 dockings moléculaires différents (lignes) révèle des interactions entre l'efsevin et 18 résidus d'acides aminés de zVDAC2 (colonnes) par le biais de liaisons hydrogènes (bleu) et d'interactions hydrophobes (jaune). Les résidus ayant le plus d'interactions (N207 dans le feuillet β 14, K236, et N238 dans le feuillet β 16 du tonneau) sont encadrés en rouge. D'après Wilting et al Br J Pharmacol (2020).

Le ciblage de la protéine VDAC2 semble donc très prometteuse. Étant donné son rôle majeur dans la régulation de l'apoptose, autant par l'inhibition de BAK qui empêche la mort cellulaire que la médiation de l'apoptose par BAX, il semble que cibler cette protéine pourrait avoir un impact sur la régulation de la mort cellulaire, notamment dans les cellules cancéreuses. Cependant, l'Efsevin n'a jamais été étudiée comme un modulateur de l'apoptose.

IV) Objectifs

Étant donné que la dérégulation de l'apoptose est une des caractéristiques des cellules cancéreuses, la reprogrammation des voies apoptotiques dans le MM est une stratégie intéressante pour restaurer la capacité de ces cellules à entrer en apoptose et, *in fine*, augmenter l'efficacité des traitements. Mon travail de thèse a été consacré à l'étude et à la compréhension du rôle de la protéine VDAC2 dans la régulation des protéines BAK et BAX dans le MM. VDAC2 apparaît en effet comme une cible thérapeutique potentielle dans l'apoptose, bien qu'elle ne fasse pas partie de la famille BCL-2. Les chercheurs ont jusqu'à présent démontré le rôle controversé de VDAC2, qui semble agir de manière « anti-apoptotique » pour BAK, tout en ayant un effet « pro-apoptotique » sur BAX. Cela soulève la question de savoir comment VDAC2 pourrait, dans un contexte cancéreux, influencer le processus d'apoptose en régulant directement ces protéines effectrices.

A ce jour, il n'existe aucune expérience démontrant le mécanisme par lequel VDAC2 régule les effecteurs BAK et BAX pour modifier le seuil apoptotique. C'est pour cela que ma thèse se découpe en plusieurs objectifs. Tout d'abord, il est de déterminer l'expression de la protéine VDAC2 dans le MM. En effet, si la plupart des études sur VDAC2 portent sur le poisson zèbre ou encore chez la souris, avec les MEFs, peu d'études montrent le rôle de VDAC2 dans le cancer.

Un autre objectif de ma thèse sera de déterminer l'impact fonctionnel de l'extinction transitoire, par siRNA, ou totale, par CRISPR/Cas9, de VDAC2 dans des cellules de MM. Cela nous permettra ainsi de définir quel rôle VDAC2 joue sur l'expression, la localisation, ou encore l'activation/l'oligomérisation des effecteurs de l'apoptose BAK et BAX.

Cela amène à un autre objectif qui est de déterminer le rôle de VDAC2 dans l'apoptose intrinsèque, ou extrinsèque, et par conséquent son rôle dans le priming mitochondrial. Pour terminer, ma thèse a pour objectif de définir si VDAC2 peut présenter une vulnérabilité thérapeutique à cibler. Pour se faire, nous étudierons l'effet d'une molécule, l'Efsevin, permettant de moduler l'activité du canal VDAC2, sur la réponse aux agents thérapeutiques, tels que les BH3 mimétiques. Cette étude a été soumise dans le journal *Leukemia* (**Champion O et al, soumis 2024**).

RESULTATS

I) Étude du rôle du canal mitochondrial VDAC2 dans la régulation des protéines effectrices de l'apoptose BAK et BAX dans le Myélome Multiple

Les travaux précédents de l'équipe ont démontré à plusieurs reprises le rôle fondamental des interactions entre les effecteurs de l'apoptose et les protéines anti-apoptotiques. Leur équilibre permet ainsi de réguler l'apoptose dans les cellules de MM. Un de ses travaux a montré qu'il existe un complexe entre les protéines MCL-1 et BAK dans les cellules de MM, surtout dans les cellules sensibles à la thapsigargine, une molécule permettant d'induire le stress du RE. La thapsigargine rompt le complexe existant entre ses deux facteurs, ce qui permet d'induire la mort cellulaire (Gomez-Bougie et al., 2016). De plus, l'utilisation d'un BH3-mimétique ciblant MCL-1, le A1210477, permet de rompre le complexe entre MCL-1 et BAK pour induire la mort cellulaire. L'équipe a montré que dans certains cas, BAK va être recapté par la protéine BCL-XL, ce qui va induire une résistance à l'apoptose (Gomez-Bougie et al., 2018).

Par la suite, l'équipe a montré que la combinaison entre des BH3-mimétiques ciblant MCL-1 (le S63845) et BCL-2 (le vénétoclax) va favoriser la formation d'hétéro-complexes entre les protéines effectrices BAK et BAX (Seiller et al., 2020). Plus récemment, l'équipe a montré dans des cellules de MM TP53 WT que le complexe entre MCL-1 et BAX est essentiel dans la réponse au S63845 (Durand et al., 2023). Un de mes premiers travail de thèse a été l'étude des interactions des protéines effectrices BAK et BAX avec les protéines anti-apoptotiques (Figure 21).

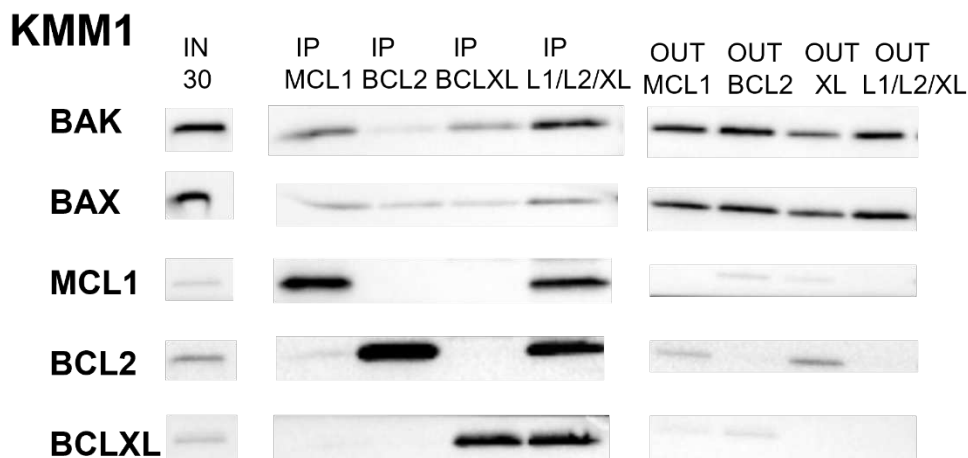


Figure 21 - Les effecteurs BAK et BAX interagissent avec les protéines anti-apoptotiques

Western Blot des protéines BAK, BAX, MCL-1, BCL-2 et BCL-XL dans la lignée KMM1 après immunoprécipitation (IP) de MCL-1, BCL-2, BCL-XL ou les trois protéines en même temps. Le lysat total est représenté par la fraction notée « IN » où 30 µg de protéines ont été déposées, puis l'on retrouve les IPs faites sur 700µg de protéines, et enfin la fraction restante des protéines après IP dans la fraction notée « OUT » avec 30 µg de protéines déposées.

Ainsi, en immunoprécipitant les protéines MCL-1, BCL-2, BCL-XL ou les trois protéines simultanément, j'ai montré que les effecteurs BAK et BAX étaient associés avec celles-ci, de manière différente. De manière intéressante, même si les effecteurs sont associés avec les trois protéines anti-apoptotiques, on peut voir qu'il reste une fraction de BAK et BAX non associée. Cela montre donc qu'il existe des interactions non canoniques avec d'autres protéines, probablement avec d'autres protéines anti-apoptotiques, mais aussi avec des protéines qui ne font pas partie de la famille BCL-2. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à la protéine VDAC2. Étant donné le rôle controversé du canal mitochondrial VDAC2 dans la régulation des effecteurs BAK et BAX et son rôle pro- ou anti-apoptotique dans la littérature (Cheng et al., 2003 ; Chin et al., 2018), il semble essentiel de comprendre son rôle dans un contexte cancéreux, et plus particulièrement dans le MM. Mon travail de thèse a permis la soumission d'un article dans le journal *Leukemia* nommé « *VDAC2 primes Myeloma cells for BAK-dependent apoptosis by stabilizing BAK and not BAX and represents a novel therapeutic target* » (Champion et al, soumis 2024).

L'étude génique des trois VDACs (VDAC1, VDAC2 et VDAC3) nous a permis de confirmer leur expression dans des échantillons primaires de MM et des HMCLs. Dans la cohorte Multiple Myeloma Research Foundation (MMRF)-CoMMpass (764 échantillons), nous avons observé que la survie des patients est la même peu importe l'expression de VDAC1 et VDAC3. En revanche, les patients avec une faible expression en VDAC2 ont une survie globale plus faible que ceux ayant une forte expression.

Nous avons généré deux lignées déficientes en VDAC2 par la technologie CRISPR/Cas9 dans les lignées KMS12PE et KMM1. Elles présentent deux translocations différentes, t(11 ;14) et t(6 ;14) respectivement et présentent toutes les deux le gène *TP53* muté. Nous avons généré des cellules VDAC2-KO de MM en insérant un codon stop à proximité du codon initiateur (ATG). Cette stratégie, connue sous le nom de KI CRISPR/Cas9, est basée sur une coupure spécifique suivie d'une recombinaison homologe avec la matrice d'ADN portant le codon stop. Cette approche permet de générer des clones identiques, puisque le codon stop sera toujours à la même position. Ensuite, par clonage, nous avons isolé au moins 3 clones contrôles (CTR) et 3 clones VDAC2-KO pour chacune des lignées, qui ont été vérifiés par séquençage et Western Blot. De plus, nous avons vérifié la structure mitochondriale des clones par microscopie confocale pour s'assurer que le VDAC2-KO n'entraîne pas de modifications morphologiques majeures et le réseau mitochondrial semble intact (données préliminaires, Figure 22).

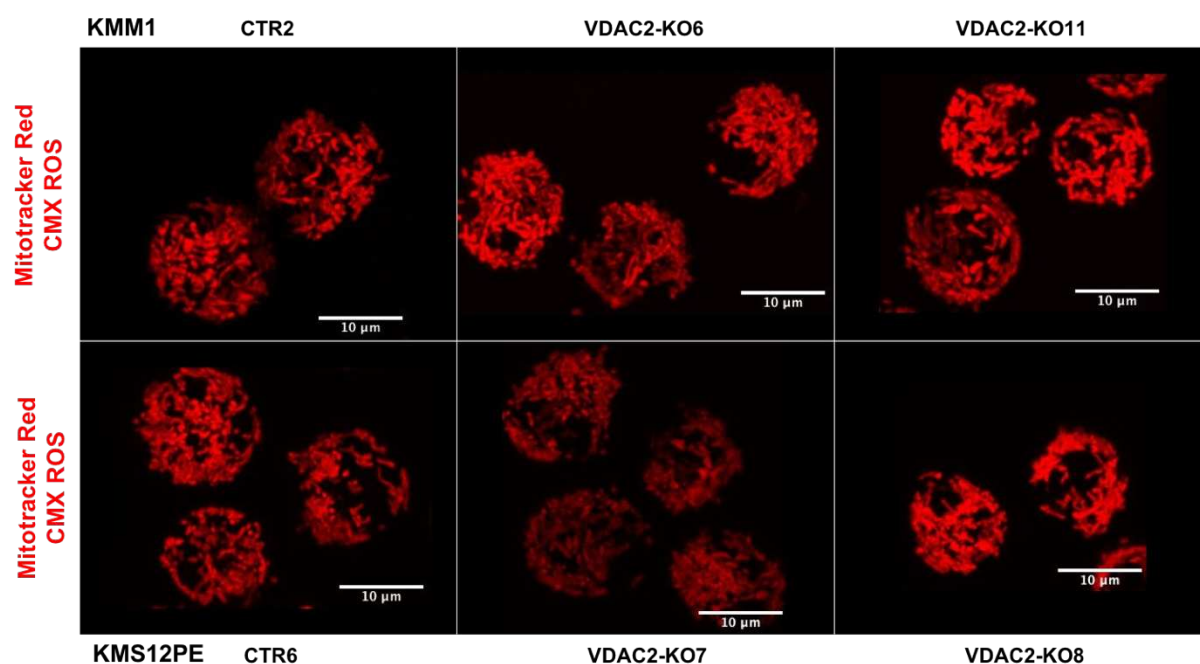


Figure 22 - Structure des mitochondries des cellules CTR et VDAC2-KO dans les lignées KMM1 et KMS12PE

Les clones CTR ou VDAC2-KO dans les lignées KMM1 et KMS12PE ont été incubées avec 40nM de mitotracker Red CMX ROS pendant 10 minutes afin d'identifier les mitochondries, puis fixées et déposées sur lame. Les cellules ont été observées par microscopie confocale (x60) et l'échelle (10μm) est indiquée sur chaque image. La microscopie confocale a été réalisée avec Steven de la plateforme MicroPICell à Nantes.

Une première analyse de gènes différentiellement exprimés (DGE) entre les clones CTR et les clones VDAC2-KO après séquençage en 3' SRP ne nous a pas permis d'observer de différence commune entre les deux lignées, excepté VDAC2. En revanche, une analyse par spectrométrie de masse nous a permis d'observer que parmi toutes les protéines différentiellement exprimées, seules 2 sont communes aux deux lignées KMS12PE et KMM1 : les protéines VDAC2 et BAK.

Cette perte drastique de la protéine BAK a été confirmée par Western Blot. Si l'on peut observer une baisse de la protéine BAK, il n'y a pas de différence d'expression de son gène *BAK1*. Par la suite, nous avons montré que l'expression protéique de VDAC2 dans 21 HMCLs corrèle avec l'expression protéique de BAK, et non celle de BAX. On retrouve aussi une corrélation entre les niveaux ARNm de *VDAC2* et *BAK1* dans 17 HMCLs, mais aussi dans la cohorte MMRF-CoMMpass, mais pas entre *VDAC2* et *BAX*. De plus, nous avons confirmé l'interaction qu'il existe entre VDAC2 et BAK en utilisant la technique de cross-linking et en utilisant le cross-linker DSS (Cheng et al., 2003). Le cross-linking est une réaction chimique

qui vise à créer des liaisons covalentes entre des atomes ou des molécules. Le DSS, également appelé subérate de disuccinimidyl, est un agent de réticulation perméable à la membrane et non clivable qui contient un ester de N-hydroxysuccinimide (NHS) réactif aux amines à chaque extrémité d'un bras espaceur de 8 carbones. Il permet d'observer l'interaction de deux protéines entre elles à une distance de 11,4 Å, puisque cela correspond à la taille de son bras espaceur. En plus de confirmer cette interaction physique existant entre VDAC2 et BAK, nous avons aussi montré qu'il existe une interaction entre VDAC2 et BAX dans les cellules de MM (Figure 23).

Concernant la localisation cellulaire des effecteurs BAK et BAX, on retrouve une localisation majoritaire de BAX à la mitochondrie (mito) et une faible fraction (<10%) au cytosol (cyto) dans les cellules CTR (CTR7 pour KMS12PE et CTR4 pour KMM1). VDAC1 est un contrôle positif de la localisation mitochondriale et la TUBULIN un contrôle positif du cytosol. Dans les clones VDAC2-KO (VDAC2-KO8 pour KMS12PE et VDAC2-KO6 pour KMM1), la localisation de BAX est à l'équilibre entre la mitochondrie et le cytosol. Concernant la localisation cellulaire de BAK, elle est identique pour les clones CTR et VDAC2-KO et est exclusivement mitochondriale (Figure 24).

Nous avons, pour la première fois, mis en évidence comment VDAC2 régule la protéine BAK. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome seul, le Bortezomib, n'a pas permis de récupérer l'expression protéique basale de BAK. L'utilisation d'un inhibiteur des voies lysosomales, la Bafilomycine A1, qui bloque la fusion entre les lysosomes et l'autophagosome, n'a pas non plus permis de récupérer l'expression protéique de BAK. De manière intéressante, c'est en combinant les deux molécules pendant 24h que nous avons retrouvé la même expression de BAK dans les clones VDAC2-KO que dans les clones CTR.

Pour appuyer ce rôle de VDAC2 dans la stabilité de BAK, j'ai aussi utilisé de la cycloheximide (CHX). La CHX est un inhibiteur de la synthèse protéique. Nous avons traité les cellules CTR et VDAC2-KO avec la CHX pendant 24h. Dans les cellules CTR, nous n'avons pas réussi à déterminer la demi-vie de la protéine BAK. Nous n'avons pas pu aller au-delà de 24h de traitement car cette molécule induit trop de mort cellulaire dans ce modèle. Il semblerait que la protéine BAK soit stable avec une demi-vie supérieure à 24h. En revanche, dans les cellules VDAC2-KO, malgré leur expression de BAK faible, la CHX permet une dégradation rapide de cette protéine, permettant d'identifier sa demi-vie à moins de 10 heures dans les lignées KMM1 et KMS12PE (Figure 25).

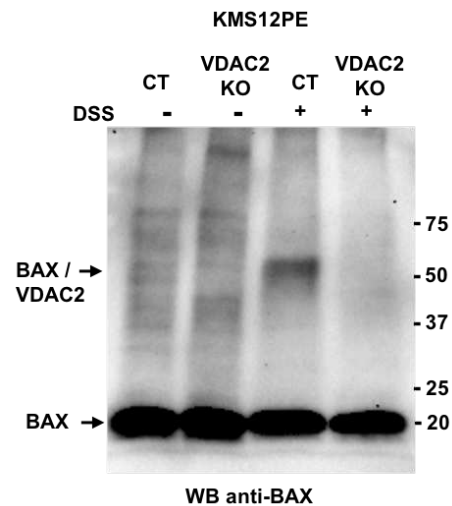


Figure 23 - Interaction endogène entre les protéines VDAC2 et BAX par cross-linking

Utilisation du cross-linker DSS pour voir l'interaction entre VDAC2 et BAX dans la lignée KMS12PE. Le Western Blot représente l'interaction observée avec l'anticorps BAX. La bande VDAC2-BAX est retrouvée à environ 55 kDa.

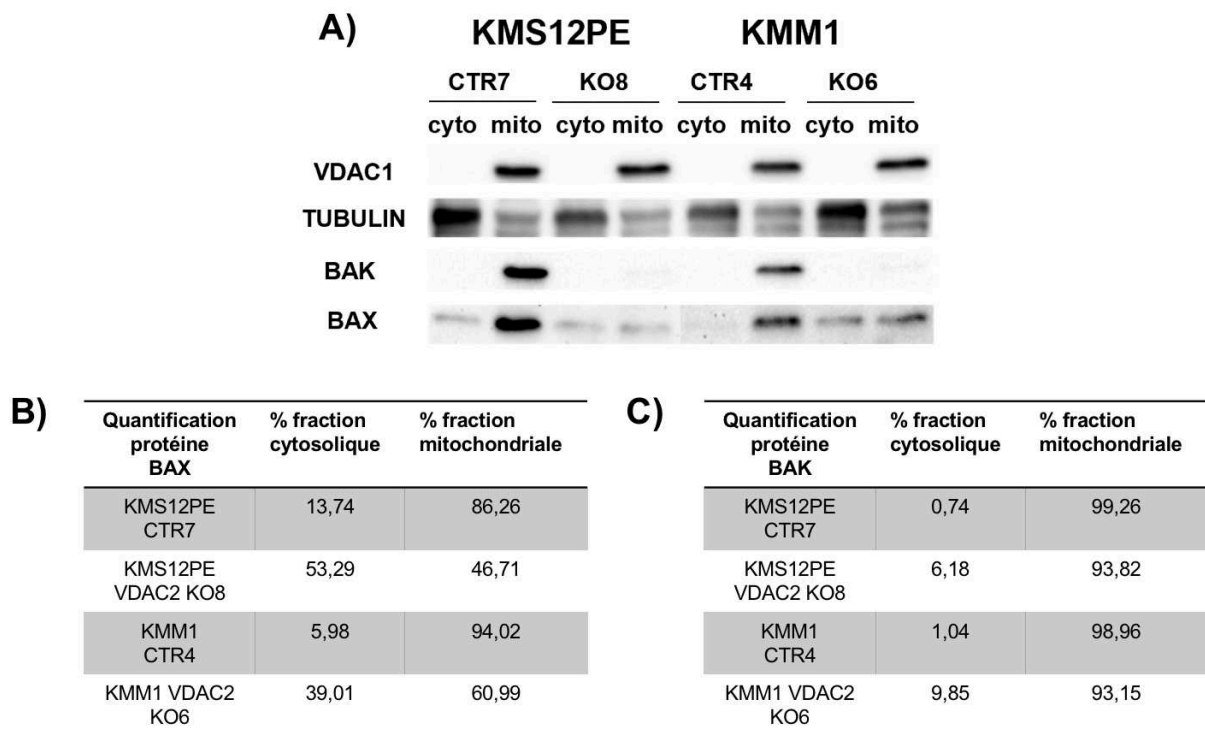


Figure 24 - Localisation cellulaire de BAK et BAX dans les cellules CTR et VDAC2-KO

(A) Western Blot représentant les localisations cytosoliques ou mitochondriales des protéines BAK et BAX dans les cellules CTR ou VDAC2 KO dans les lignées KMS12PE et KMM1. La protéine VDAC1 est utilisée comme contrôle spécifique de la localisation mitochondriale et la TUBULIN comme contrôle pour la localisation cytosolique. **(B)** Quantification de la protéine BAX. Le % de fraction cytosolique et de fraction mitochondriale est calculée en fonction de la quantification additionnée des deux bandes. **(C)** Quantification de la protéine BAK. Le % de fraction cytosolique et de fraction mitochondriale est calculée en fonction de la quantification additionnée des deux bandes.

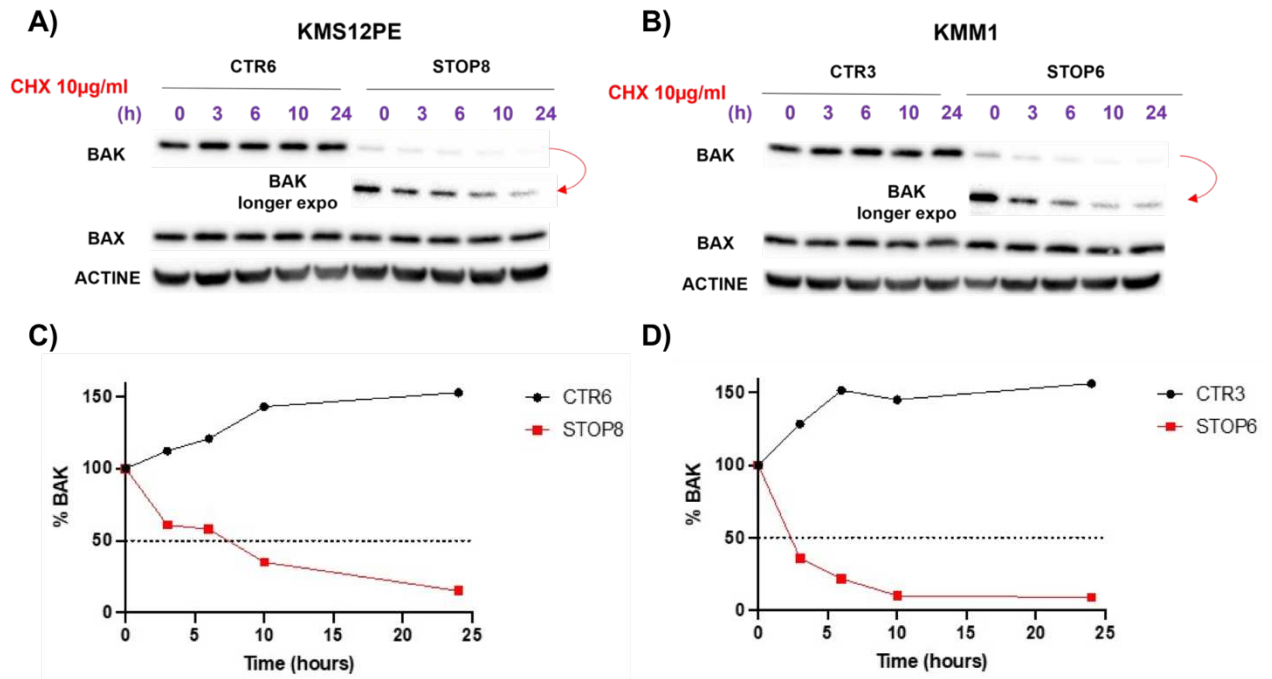


Figure 25 - VDAC2 joue un rôle dans la stabilité de la protéine BAK

(A) Western Blot de l'expression protéique de BAK et BAX après traitement à la cycloheximide (CHX) pendant 0, 3, 6, 10 ou 24h dans les clones CTR (CTR6) ou VDAC2-KO (STOP8) dans la lignée KMS12PE. **(B)** Western Blot de l'expression protéique de BAK et BAX après traitement à la cycloheximide (CHX) pendant 0, 3, 6, 10 ou 24h dans les clones CTR (CTR3) ou VDAC2-KO (STOP6) dans la lignée KMM1. **(C)** % de la protéine BAK obtenue après quantification du Western Blot afin de déterminer la demi-vie de BAK au cours du temps dans les clones CTR6 ou STOP8 dans la lignée KMS12PE. **(D)** % de la protéine BAK obtenue après quantification du Western Blot afin de déterminer la demi-vie de BAK au cours du temps dans les clones CTR3 ou STOP6 dans la lignée KMM1.

En plus de ce rôle dans la stabilité de la protéine VDAC2, nous nous sommes intéressés au rôle de la perte de VDAC2 dans l'apoptose. Grâce au BH3-profiling, nous avons mis en évidence que les cellules VDAC2-KO et BAK-KO perdent totalement leur priming mitochondrial. Cette perte de priming mitochondrial est à la fois une perte du priming global, puisqu'avec l'utilisation des peptides dérivés de BIM, ou encore de BMF, il n'y a plus de relargage de cytochrome c. Mais c'est aussi une perte de la dépendance à la fois de MCL-1, mais aussi de BCL-2. Cela montre donc, dans notre modèle cellulaire, que la mort induite est dépendante à la fois de VDAC2 et de BAK, mais pas de BAX. En effet, dans les cellules BAX-KO, le priming mitochondrial global n'est pas modulé. En revanche, bien qu'il n'y ait pas de différence significative concernant la dépendance à MCL-1, il y a une tendance à la diminution dans les cellules BAX-KO (Figure 26).

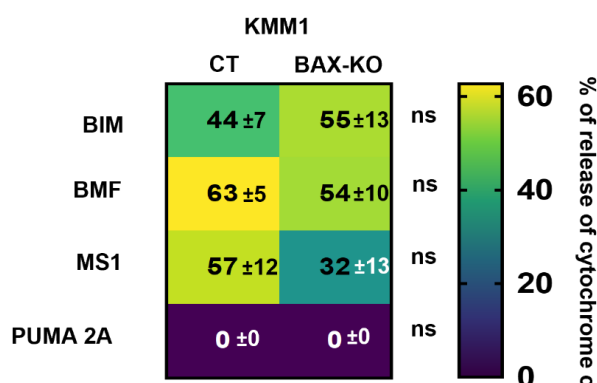


Figure 26 - Les cellules BAX-KO ne présentent pas de modification de leur priming mitochondrial

BH3 profiling réalisé dans un clone CTR et un clone BAX-KO dans la lignée KMM1. Le priming mitochondrial global est évalué par le peptide dérivé BIM ou par BMF. La dépendance à MCL-1 est évaluée par le peptide dérivé MS1 et le peptide PUMA 2A est utilisé comme contrôle négatif. La heatmap représente la moyenne de 3 expériences. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test 2-way ANOVA.

De manière surprenante, l'inhibition transitoire de VDAC2 par siRNA semble avoir un autre effet. L'utilisation d'un siRNA dirigé contre VDAC2, pendant 24h ou 48h ne modifie pas l'expression protéique de BAK ou de BAX. En revanche, on peut voir que cette inhibition permet une sensibilisation aux signaux apoptotiques intrinsèques. Ces résultats proviennent du travail de Master 2 BBRT (Nantes Université) de Chloé Antier, (son mémoire « Rôle de VDAC2 dans la régulation de la mort cellulaire BAK/BAX dépendant dans le myélome multiple »). Lorsque l'on utilise du S63845 ou du vénétoclax, les cellules sont sensibilisées à la mort avec le siVDAC2. En revanche, VDAC2 ne semble pas jouer de rôle dans l'apoptose extrinsèque puisque son inhibition en combinaison avec du TRAIL, ne permet pas de sensibiliser à la mort cellulaire. Cette sensibilisation à la mort est confirmée par l'utilisation du BH3-profiling, qui nous a permis de montrer que l'on a une augmentation du priming mitochondrial global, et de la dépendance à MCL-1 et BCL-2 quand on inhibe transitoirement VDAC2. Parmi la sensibilisation aux signaux apoptotiques, nous avons aussi trouvé une sensibilisation au Bortezomib, mais aussi au Melphalan et à la Thapsigargine (Figure 27).

De plus, en utilisant des anticorps reconnaissant les formes actives de BAK et de BAX, nous avons montré que l'extinction transitoire courte (24 ou 48h) de VDAC2 permet une activation de BAK, mais pas de BAX. Ce rôle de VDAC2 dans la sensibilisation à la mort *via* BAK semble donc transitoire, étant donné le rôle de VDAC2 dans la stabilité de BAK. D'autant plus que nous avons renforcé ce message en faisant des siRNA sur une plus longue durée. Ainsi, nous avons observé une baisse de l'expression protéique de BAK lors de l'extinction de VDAC2 par siRNA pendant 5 jours. Des données préliminaires nous montrent aussi que cette baisse protéique de BAK est accompagnée par une diminution du priming mitochondrial (Figure 28).

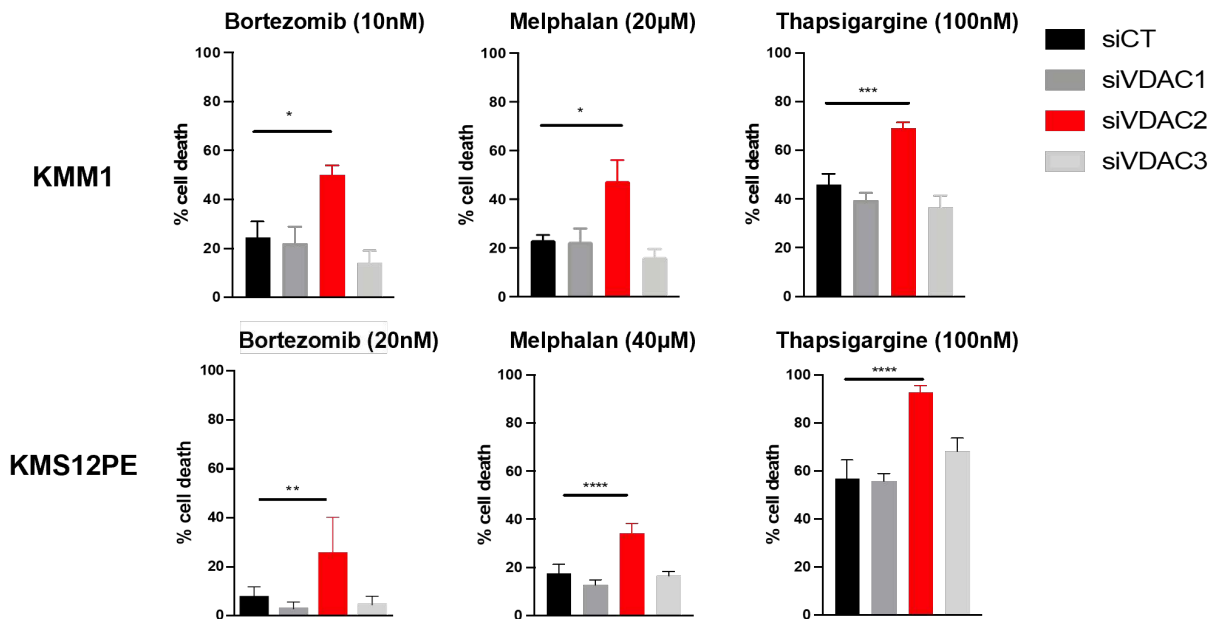


Figure 27 - Sensibilisation à différents signaux apoptotiques par l'extinction transitoire de VDAC2

(A) et (B) Les cellules ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre VDAC1, VDAC2 ou VDAC3. Elles ont ensuite été traitées pendant 24h avec de la thapsigargin ou pendant 48h avec du bortezomib ou du melphalan selon les doses indiquées dans les lignées KMM1 et KMS12PE respectivement. La mort cellulaire a été évaluée par marquage à l'Annexine V. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de 4 expériences indépendantes et un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer le siVDAC2 avec le siCT. Ces résultats sont issus du mémoire de Master 2 de Chloé Antier (Année universitaire 2020-2021, nom du mémoire : « Rôle de VDAC2 dans la régulation de la mort cellulaire BAK/BAX dépendante dans le myélome multiple »).

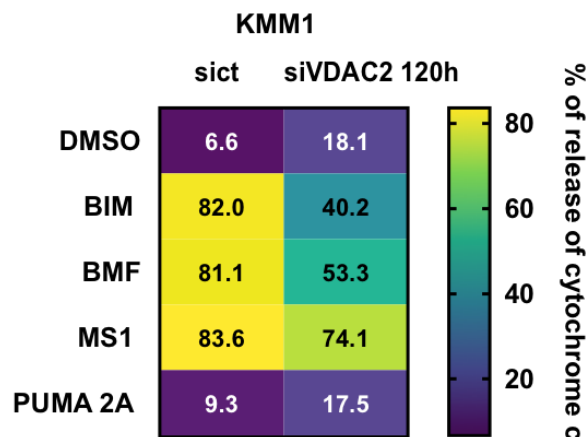


Figure 28 - Diminution du priming mitochondrial par un siRNA à long terme dirigé contre VDAC2

BH3 profiling réalisé dans la lignée KMM1 transfectée par un siRNA contrôle (ct) ou dirigé contre VDAC2 pendant 120h. Le priming mitochondrial global est évalué par le peptide dérivé BIM ou par BMF. La dépendance à MCL-1 est évaluée par le peptide dérivé MS1 et le peptide PUMA 2A est utilisé comme contrôle négatif (N=1).

Nous avons donc utilisé une molécule, l'Efsevin, permettant de cibler pharmacologiquement VDAC2 pour moduler son activité (Wilting et al., 2020). Tout d'abord, mon travail de thèse a permis de confirmer que l'utilisation de l'Efsevin, même jusqu'à 5 jours, ne module ni l'expression de VDAC2, ni celle de tous les autres membres de la famille BCL-2 dans le MM. Ensuite, j'ai montré que l'Efsevin seule n'induit pas la mort cellulaire, à différents temps mais aussi à différentes concentrations. L'utilisation de ce modulateur de VDAC2 nous a permis de mettre en évidence que cette molécule augmente le priming mitochondrial global mais augmente aussi la dépendance à MCL-1 et BCL-2. Ainsi, son utilisation en combinaison avec le S63845 a permis une sensibilisation à la mort de 4 sur 6 HMCLs testées. Cela nous a permis de montrer qu'il existe une corrélation entre le niveau protéique de VDAC2 et la sensibilisation à l'Efsevin. En effet, plus les cellules ont une expression forte de VDAC2 et mieux elles seront sensibilisées à la mort (Figure 29). Sur 4 autres HMCLs testées, nous avons aussi montré que l'Efsevin en combinaison avec le vénétoclax permet une sensibilisation à la mort cellulaire. Nous avons confirmé dans les lignées KMM1 et KMS12PE que la combinaison de l'Efsevin avec le S63485 ou le vénétoclax était efficace puisque l'on observe un effet qui est synergique.

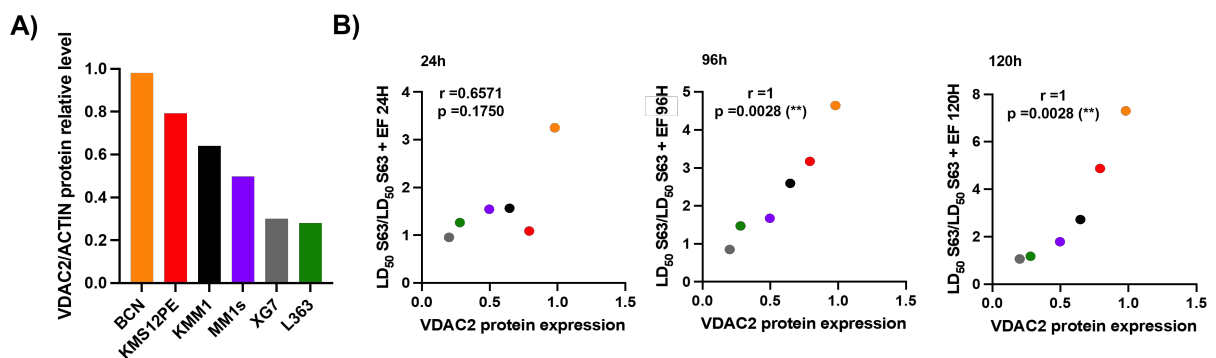


Figure 29 - La sensibilisation à la mort cellulaire avec l'Efsevin est proportionnelle à l'expression protéique de VDAC2

(A) Quantification du niveau protéique de VDAC2 dans 6 HMCLs, représentant la moyenne d'au moins deux expériences. **(B)** Corrélation entre le niveau protéique de VDAC2 et le facteur de sensibilisation à l'Efsevin au S63845 obtenu par la LD₅₀ au S63845 seul / la LD₅₀ au S63845 + l'Efsevin. Les corrélations sont obtenues après 24h, 96h ou 120h de traitement à l'Efsevin. Ces corrélations ont été évaluées par le test de Spearman, les valeurs *p* et *r* sont indiquées.

De manière intéressante, nous avons montré que cette sensibilisation à la mort due aux BH3-mimétiques est présente dans les lignées, dans les clones CTR mais aussi dans les cellules dépourvues en BAX (BAX-KO). En revanche, nous n'avons pas observé cet effet sensibilisateur de l'efsevin dans les cellules dépourvues en BAK (BAK-KO). De plus, nos données préliminaires suggèrent que le BH3-mimétique ciblant BCL-XL, le A1155463, sensibilise aussi à la mort en combinaison avec l'Efsevin (Figure 30).

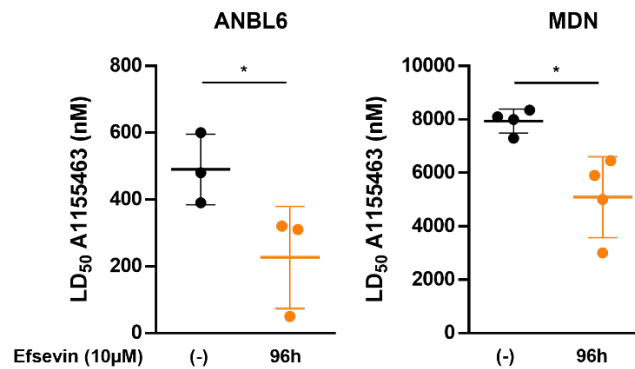


Figure 30 - L'Efsevin en combinaison avec le A1155463 sensibilise les HMCLs

Les HMCLs ANBL6 et MDN ont été traitées avec de l'Efsevin (10µM) pendant 72h et ensuite avec du A1155463 pendant 24h. La mort cellulaire a été évaluée par marquage à l'Annexine V et lecture en cytométrie de flux. Les valeurs de LD50 correspondent à la moyenne ± SD de 3 ou 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du paired t test.

Enfin, nous avons testé l'effet de ce modulateur sur des échantillons primaires de patients atteints de MM afin de pouvoir envisager son utilisation clinique. Nous avons donc utilisé une cohorte comprenant 27 patients. Ainsi, nous avons montré que l'Efsevin (15µM) permet une sensibilisation à la mort en combinaison avec le S63845 (25nM). L'association du S63845 et de l'Efsevin s'est avérée efficace dans 96% des échantillons, étant additive dans 16 échantillons (59%) et synergique dans 10 échantillons (37%). Pour la première fois, nous avons donc montré l'intérêt de cibler VDAC2 par un modulateur de son activité, en combinaison avec un BH3-mimétique, pour sensibiliser à la mort cellulaire. Ces résultats ont été valorisés par le dépôt d'un brevet, qui est actuellement en cours de d'expertise (EP24305736.1).

J'ai eu l'opportunité de présenter ce travail lors de deux communications posters. Tout d'abord, j'ai présenté ce projet sur VDAC2 dans le MM lors du symposium organisé par le laboratoire (CRCI²NA) à Nantes, en mars 2024. Ensuite, j'ai présenté ce même poster lors d'un congrès organisé par l'International Cell Death Society à Ghent, en Belgique en mai 2024. De plus, un poster de mon projet de thèse sera présenté à l'American Society of Hematology (ASH) à San Diego le 08 décembre 2024.

VDAC2 primes Myeloma cells for BAK-dependent apoptosis by stabilizing BAK and not BAX and represents a novel therapeutic target

Champion Ophélie¹, Maïga Sophie^{1,4}, Antier Chloé⁴, Dousset Christelle^{1,4}, Moreau-Aubry Agnès¹, Bellanger Céline¹, Guillonnet François^{1,2}, Descamps Géraldine¹, Moreno Jose Antonio³, Kwon Ohyun³, Lilli Nicoletta Libera⁴, Moreau Phillippe^{1,4}, Chiron David¹, Pellat-Deceunynck Catherine^{1,4}, Touzeau Cyrille^{1,4}, Gomez-Bougie Patricia^{1,4}

1.Nantes Université, INSERM, CNRS, CHU Nantes, CRCI2NA, Université d'Angers, F-44000 Nantes, France

2. Prot'ICO proteomics facility, Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), F-49055 Angers, France

3.Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, CA, USA

4. Hematology Department, CHU Nantes, Nantes, France

Corresponding authors : Patricia Gomez-Bougie, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers, INSERM, CNRS, Institut de Recherche en Santé Nantes Université (IRS-UN), 8 quai Moncousu, BP70721, F-44007. 33+22808318 Nantes-France. E-mail patricia.gomez@inserm.fr ; and Catherine Pellat-Deceunynck, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie intégrée Nantes Angers, INSERM, CNRS, IRS-UN, 8 quai Moncousu, BP70721, F-44007 Nantes-France. 33+22808298 E-mail catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr

All authors declare no conflict of interest

Running title: VDAC2 is a rheostat controlling BAK function

ABSTRACT

BAX and BAK are key executors of apoptosis, and non-BCL2 family proteins, such as voltage-dependent anion channel-2 (VDAC2), are emerging as regulators of their function. Here, we focused on the interplay between VDAC2 and BAK/BAX effectors in multiple myeloma. In 764 myeloma samples from the MMRF-CoMMpass cohort, low VDAC2 expression was associated with poor overall survival ($p=0.036$), and VDAC2 expression directly correlated with BAK1 expression ($r=0.263$; $p<0.0001$). In 17 Human Myeloma Cell Lines (HMCLs), VDAC2 expression was heterogeneous and correlated with BAK, but not BAX, at both mRNA and protein levels ($p=0.0052$ and $p=0.021$, respectively). We demonstrated that complete deletion of VDAC2 in p53-mutated myeloma cell lines was deleterious, leading to BAK degradation via the proteasome and lysosome pathways and impairing mitochondrial priming. Conversely, transient silencing of VDAC2 preserved BAK expression, increased mitochondrial priming, induced BAK activation, and subsequently enhanced cell death induced by BH3-mimetics. We provided the first evidence that the VDAC2-modulator Efsevin, enhanced mitochondrial priming and synergized with MCL1 or BCL2 BH3-mimetics in both HMCLs and patient samples. Together, these data show that VDAC2 is crucial for the protein stability and function of BAK, but not BAX, and highlight the potential for pharmacologically targeting VDAC2 in myeloma.

INTRODUCTION

The evasion of apoptosis is an essential feature of cancer cells (1). The BCL2 family has emerged as a promising therapeutic target in cancer due to its ability to tightly regulate apoptosis. This family includes anti-apoptotic proteins (MCL1, BCL2 and BCLXL) and two sets of pro-apoptotic proteins, the BH3-only (e.g. BIM, BMF, NOXA) and the pore-forming effectors BAK and BAX. These proteins determine the cell's fate by regulating themselves through protein-protein complexes (2,3), with some interactions favoring death and others promoting cell survival. Triggering the apoptotic pathway involves the activation and oligomerization of the pro-apoptotic effectors BAX and BAK, which ultimately causes the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (4). Complex mechanisms are involved in the regulation of BAX/BAK, beyond their sequestration by the anti-apoptotic BCL2 counterparts, non-BCL2 family proteins are emerging as partners of these effectors, and are considered as novel regulators of apoptosis (5). Different studies have reported that proteins from the Voltage-dependent anion channels (VDAC) family interact with BCL2 family members (6). The Voltage-dependent anion channels VDAC1, VDAC2 and VDAC3 are the most abundant proteins at the mitochondria outer membrane (MOM), where they allow the passage of ions and metabolites (7,8). Although the three forms can substitute for one another in the metabolite and ion flux (9), they also have nonredundant roles. VDAC2 is a source of particular attention because of its role in the regulation of apoptosis (10). Nevertheless, it is not clear how this occurs mechanistically, with contrasting evidence for the role of VDAC2 in regulating BAX and BAK effectors. Notably, VDAC2 was reported as being necessary for efficient BAX-dependent apoptosis (11), while conversely inhibiting BAK apoptotic function (10). These findings indicate that BAX and BAK are distinctly regulated, despite being considered as functionally redundant.

Multiple Myeloma (MM) is a B-cell hemopathy accounting for 10% of hematological malignancies and it is the second most common hematologic cancer. Despite current excellent treatment options, relapses invariably occur (12). Among resistance mechanisms, we and others have shown that MM cells overexpress anti-apoptotic BCL2 members, which sequester and keep in check the pro-apoptotic BH3-only and the effectors BAK/BAX, contributing to resistance to treatments (13-16). BAX, but not BAK is a well-known p53 target gene, and it has been recently shown that p53-mediated BAX regulation is required for optimal response to BH3-mimetics targeting BCL2 or MCL1 (17-19). In p53-deficient myeloma cells that display a low BAX expression, residual apoptosis is expected to rely on BAK expression and regulation. Therefore, to investigate the impact of VDAC2 on the regulation of the apoptotic response, we have used genome-editing and transient silencing to target VDAC2 in *TP53^{mut}* myeloma cell lines. By combining genomics, proteomics and functional approaches, we demonstrated that VDAC2 regulates BAK protein stability and controls mitochondrial priming.

We provided the proof-of-concept that pharmacologically targeting VDAC2 with the VDAC2 modulator Efsevin enhances the apoptotic response.

RESULTS

1. *VDAC2* extinction impairs BAK protein expression

The RNA-seq expression of the three Voltage-dependent anion channel family members, *VDAC1*, *VDAC2* and *VDAC3*, was analyzed in myeloma cells from 764 patients, at diagnosis, from the Multiple Myeloma Research Foundation (MMRF)-CoMMpass cohort. *VDAC1*, *VDAC2* and *VDAC3* were heterogeneously expressed, with *VDAC1* being predominant and more abundant than *VDAC2* and *VDAC3* (Figure 1A). The group of patients which expressed higher *VDAC2* levels (n=509) had significantly higher overall survival (OS) (p=0.036) compared to the one expressing lower *VDAC2* levels (n=255). Conversely, OS was not significantly affected by the level of expression of either *VDAC1* (p=0.50) or *VDAC3* (p=0.88) in this cohort (Supplementary Figure 1A). In HMCLs (n=17), *VDAC2* expression was inferior to both *VDAC1* and *VDAC3* (Figure 1A). To elucidate the impact of *VDAC2*, we generated control (CTR) and *VDAC2-KO* clones in two MM cell lines, KMS12PE and KMM1.

Firstly, we established the transcriptomic profile of the clones. We found that 3 and 9 genes were differentially expressed between the CTR and the *VDAC2-KO* clones in KMS12PE and KMM1, respectively (FDR <0.05); but none, excepting *VDAC2* itself, was common to both cell lines (Figure 1B, Supplementary Table S1-2). The expression of *VDAC1* and *VDAC3* was unchanged in *VDAC2-KO* clones (Supplementary Fig 1B).

To further validate these results and explore potential regulation at the protein level, we used a label-free DIA LC-MS/MS proteomics approach to identify proteins differentially expressed in *VDAC2-KO* clones. We identified 25 and 24 proteins differentially expressed in KMS12PE and KMM1, respectively (logFC < -1 or logFC > 1 and p < 0.05; Figure 1C, Supplementary Table S3-4). Notably, only 2 proteins, *VDAC2* and *BAK*, were consistently down-regulated in both HMCLs (Figure 1C). Protein expression of *VDAC1* and *VDAC3* remained unchanged in *VDAC2-KO* cells (Supplementary Figure 1C). Concurring with the proteomic results, along with *VDAC2*, only *BAK* was significantly decreased in *VDAC2-KO* cells (Figure 1D, upper and lower panel). The protein levels of *BAX* and the other members of the *BCL2* family were not substantially modified upon *VDAC2*-deletion in both *VDAC2-KO* cell lines, except for *NOXA*, which was only decreased in the KMS12PE cell line (Figure 1D, Supplementary Figure 1D). The mRNA levels of *BAK1* and *BAX* remained unchanged in both *VDAC2-KO* cell lines (Supplementary Figure 1E), indicating that *VDAC2* regulates *BAK* exclusively at the protein level.

2. VDAC2 and BAK expression directly correlates and they form endogenous complexes at the mitochondria

To better understand the relationship between VDAC2 and BAK, we analyzed their protein expression in HMCLs (n=21, Figure 2A). VDAC2 and BAK expression correlated in most, but not all, HMCLs (13 out of 21, $r=0.500$; $p=0.02$) while no correlation was observed with BAX ($r=-0.01863$; $p=0.9344$, Figure 2B). Moreover, when analyzing publicly available proteomic data from 12 MM patient samples at diagnosis and at relapse (20), we also found a direct correlation between VDAC2 and BAK protein levels ($r=0.7622$; $p=0.0055$), whereas no correlation was found between VDAC2 and BAX protein expression ($r=0.06294$; $p=0.8515$, Supplementary Figure 2A). Additionally, we also found a direct correlation between *VDAC2* and *BAK1* mRNA levels in HMCLs ($r=0.6569$; $p=0.0052$) and in patient samples from the MMRF-CoMMpass cohort ($r=0.2630$; $p<0.0001$). However, no correlation between *VDAC2* and *BAX* mRNA levels was observed in either set of data (Supplementary Figure 2B).

While VDAC2 and BAK protein expression levels correlated at the protein level in most HMCLs and in primary MM cells, the decrease in BAK protein expression in *VDAC2-KO* cells suggests that VDAC2 both directly interacts with and regulates BAK. We therefore evaluated whether BAK and VDAC2 were associated at the mitochondria, using a protein cross-linking assay: a ~60 kD BAK-VDAC2 complex was detected either by an anti-BAK or anti-VDAC2 antibody in control clones, but not in *VDAC2-KO* clones (Figure 2C). Collectively, these findings indicate that VDAC2 forms complexes with BAK at the mitochondria and they suggest that their endogenous interaction could be crucial for BAK stability.

3. VDAC2 controls BAK protein degradation and regulates mitochondrial priming

To go deeper into the mechanisms involved in the reduction of BAK in the absence of VDAC2, we further investigated if the main protein degradation pathways were implicated in this process. While proteasome inhibition by Bortezomib (Bz) or the blockage of lysosomal degradation by Bafilomycin A1 (Baf A1) alone did not induce BAK recovery in *VDAC2-KO* cells, the simultaneous inhibition of both pathways rescued BAK levels, with a 5.7-fold increase at 16 hours and 7.7-fold increase at 24 hours (Figure 3A). These findings confirmed that the decrease in BAK levels induced by VDAC2 deletion was due to its degradation.

To further characterize the functional consequences of the interplay between VDAC2 and BAK at the mitochondria, we performed a BH3-profiling assay. Figure 3B shows that KMS12PE and KMM1 control cells were similarly primed, showing 63% and 44% of cytochrome c release in response to BIM-derived peptide (0.05 μ M), respectively. Specifically, KMS12PE was mainly BCL2-dependent, showing 92% of cytochrome c release upon Venetoclax (2 μ M), while KMM1 was mainly MCL1-dependent, with 57% of cytochrome c release in response to MS1 peptide (5 μ M). In *VDAC2-KO* cells, all the

responses to peptides or Venetoclax were abrogated, with cytochrome c release falling below 2% (Figure 3B).

To confirm the key role of BAK in the loss of priming observed in *VDAC2-KO* cells, we generated *BAK-KO* KMM1 cells, which indeed fully recapitulated the *VDAC2-KO* phenotype with respect to mitochondrial priming and specific dependencies (Figure 3C).

These data demonstrate that VDAC2-dependent BAK protein expression is critical for mitochondrial priming in KMS12PE and KMM1 cell lines.

4. Transient silencing of VDAC2 do not impair BAK expression and increase mitochondrial priming

To better understand the dynamic link of BAK decrease in *VDAC2-KO* cells, we analyzed the consequences of the transient knock-down of *VDAC2* using siRNA transfection. After 24h or 48h of *VDAC2* siRNA transfection of KMS12PE or KMM1 cells, respectively, the decrease in *VDAC2* did not modify the level of BAK protein expression (Figure 4A). However, longer transfection times (120 hours) decreased BAK protein levels in both cell lines (Supplementary Figure 3A).

In contrast to stable permanent *VDAC2* deletion, transient *VDAC2* silencing increased the global mitochondrial priming, as shown by the enhanced cytochrome c release triggered by BIM-derived peptide, by 35% ($p < 0.0001$) and 19% ($p = 0.0026$) in KMS12PE and KMM1, respectively (Figure 4B). Dependencies on MCL1 and BCL2, as measured using a low dose of Venetoclax (0.5 μ M), were also significantly heightened when *VDAC2* was partially inhibited, resulting in a 1.4 to 5.4-fold increase of cytochrome c release (Figure 4B). Accordingly, cell death induced by the MCL1 mimetic S63845 or Venetoclax was significantly increased: S63845 LD₅₀ decreased from 92 nM to 21 nM (4.4-fold decrease) and from 85 nM to 28 nM (3.0-fold decrease) in KMS12PE and KMM1, respectively. Furthermore, Venetoclax LD₅₀ decreased from 35.25 nM to 2.6 nM in KMS12PE (13.6-fold decrease, Figure 4C and Supplementary Figure 3B). Of note, *VDAC2* silencing had no effect on the extrinsic apoptotic pathway, as cell death induced by recombinant TRAIL was not modified upon *VDAC2* transient silencing. (Figure 4C, Supplementary Figure 3B).

Next, we sought to assess whether the transient silencing of *VDAC2* had an impact on BAK conformation. Indeed, BAK activation relies on its conformational change, assessed by the exposure of its $\alpha 1$ helix, detectable using flow cytometry (21). Indeed, transient silencing of *VDAC2* induced an approximately 2-fold increase in activated BAK. However, it did not lead to an increase in activated BAX, as no significant rise in the exposure of the BAX N-terminal region was detected in this condition (Figure 4D).

Taken altogether, these data indicate that the transient silencing of VDAC2 does not impair BAK levels but allows BAK activation, thereby heightening mitochondrial priming and rendering cells more sensitive to apoptosis induced by BH3-mimetics.

5. The VDAC2 modulator Efsevin increases mitochondrial priming and sensitizes MM cells to BH3-mimetics

Our aforementioned results prompted us to look for a pharmacological modulation of VDAC2 activity that could have a similar impact to the transient silencing of VDAC2 in the apoptotic response. Efsevin has been identified through library screening for chemicals that are capable of reversing the arrhythmia phenotype observed in the tremblor zebrafish model (22). Recently, this activity was shown to be dependent on VDAC2, and Efsevin was found bound to VDAC2 (23). Firstly, we investigated whether this VDAC2 modulator modified the expression levels of BAK and BAX, and the other BCL2 family proteins. Figure 5A shows that the protein levels of BAK, BAX and VDAC2 remained stable from 24 up to 120 hours of Efsevin (EF) treatment. Similarly, the expression of the anti-apoptotic BCL2 members and the BH3-only counterparts was not consistently modified (Supplementary Figure 4A). As shown in Figure 5B, Efsevin significantly enhanced (up to 9-fold) cytochrome c release induced by BIM (0.05 μ M), MS1 (10 μ M for KMS12PE and 5 μ M for KMM1) peptides and a low dose of Venetoclax (0.5 μ M) in both KMS12PE and KMM1 cells. This Efsevin-induced increase in mitochondrial priming in KMM1 and KMS12PE cells was not associated with an increase in the activation of either BAK or BAX (Figure 5C, Supplementary Figure 4B).

To confirm the impact of Efsevin on mitochondrial priming, we combined Efsevin with S63845 or Venetoclax in 9 HMCLs. Efsevin itself did not induce apoptosis in HMCLs (Supplementary Figure 4C-4D). Although the efficacy of this combination was observed as early as 24 hours of treatment (Supplementary Figure 4E), we opted to determine LD₅₀ values after 96 hours, with S63845 or Venetoclax added for the last 24 hours. As shown in figure 5D, Efsevin significantly sensitized 4 out of 6 HMCLs (BCN, KMS12PE, KMM1 and MM1S) to S63845, resulting in a 1.7- to 4.6-fold decrease in S63845 LD₅₀ (Table 1A). The Bliss synergy scores calculated in KMM1 and KMS12PE (mean values were 39.7 ± 2.9 and 34.3 ± 2.3 , respectively) confirmed a strong synergy between Efsevin and S63845 (Supplementary Figure 4F).

Similarly, we also found a significant synergy between Efsevin and Venetoclax in 4 t(11;14) HMCLs (KMS12PE, MDN, KARPAS620 and XG5), resulting in a 1.8- to 6.8-fold decrease in Venetoclax LD₅₀, with a Bliss score of 39.7 ± 2.9 in KMS12PE (Figure 5E, Supplementary Figure 4F). Notably, this synergy appeared to be independent of *TP53* status: sensitization to MCL1 or BCL2 BH3-mimetics was similar in *TP53*^{+/+} and *TP53*^{-/mut} HMCLs (Table 1A and 1B), as well as in the isogenic NCI-H929 *TP53*⁻

^{-/-} and NCI-H929 *TP53*^{+/+} cells, resulting in a 1.6-fold and a 1.8-fold decrease in S63845 LD₅₀, respectively (Supplementary Figure 4G).

To further investigate whether the observed synergy of the Efsevin/S63845 combination depended on BAK, we generated *BAX*- and *BAK-KO* KMM1 cells. The extinction of BAX or BAK (Supplementary Figure 4H) significantly increased the LD₅₀ of S63845 (from 84 nM to 167 nM and 400 nM, respectively), with *BAK-KO* cells showing high resistance to S63845 (Figure 5F). While Efsevin similarly decreased S63845 LD₅₀ in control cells (from 84 to 33 nM) and *BAX-KO* cells (from 167 to 65 nM), it did not overcome the S63845 resistance of *BAK-KO* cells (Figure 5F). These data confirmed that BAK expression is required for Efsevin sensitization to S63845.

Since we and others have demonstrated that MM is mainly dependent on MCL1 for survival (Gomez-Bougie et al., 2018; Gong et al., 2016), we assessed the effect of Efsevin (15 μM) in combination with S63845 (25 nM) in cells from 27 consecutive patients, 14 at diagnosis and 13 at relapse (Table 2). Median cell death induced by Efsevin, S63845 and their combination was 6.9%, 31.7%, and 54.7%, respectively (Figure 5G, left panel). Because it was not possible to perform synergy assays in patient samples, we analyzed the differences between the expected and the observed values (Figure 5G, right panel). The combination of S63845 and Efsevin was indeed effective in 96% of the samples, being additive (-10% < observed minus expected death < 10%) in 16 samples (59%) and synergistic (observed minus expected death > 10%) in 10 samples (37%).

DISCUSSION

Apoptosis regulation in cancer cells depends on the global expression of BCL2 family members and their interactions at mitochondria. In MM, apoptosis deregulation partly relies on the increased expression of MCL1, which is associated with 1q gain, a secondary chromosomal abnormality present in 40% of patients at diagnosis and up to 70% at relapse (25). On the other hand, the expression of the effector protein BAX, but not BAK, depends on *TP53* status, *BAX* being a direct target gene of p53. Despite the functional redundancy of BAX and BAK in MOMP, their regulation differs, as only *BAX* expression increases in response to p53-induced stresses. Recent studies have shown that the p53-regulated BAX levels are critical for an optimal response to BH3-mimetics targeting MCL1 or BCL2 in MM and other hematological malignancies (18,19,26). In p53-proficient cells, apoptosis predominantly depends on BAX, whereas in p53-deficient cells it is expected to rather depend on BAK, expression that is similar or increased in p53-deficient cells compared with p53-proficient cells (19). Because VDAC2 plays a crucial role in apoptosis regulation by interacting with BAK and/or BAX, we investigated the impact of permanent or transient VDAC2 silencing on the apoptotic capacity of p53^{mut} cells. We demonstrated that VDAC2 plays a major role in the apoptotic response by regulating BAK expression and function.

We found that high VDAC2 expression was associated with favorable OS in MM patients, consistent with similar findings in glioma patients (27), suggesting that VDAC2 may play a role in preserving apoptotic capacity. The high *VDAC2* expression in MM is not related to an amplification of the long arm of chromosome 10, where *VDAC2* is located (10q22). Moreover, we observed that the expression of *BAK1*, located on 6p21, but not of *BAX*, significantly correlated with *VDAC2* expression. Although this correlation was moderate, this finding reinforces the functional relationship between VDAC2 and BAK in apoptosis regulation.

Using a large cohort of HMCLs and a CRISPR/Cas9 invalidation of *VDAC2* in 2 HMCLs, we have demonstrated that 1) BAK and VDAC2 protein and mRNA levels correlated, 2) VDAC2 controls the stability of BAK, and 3) VDAC2 controls the mitochondrial priming in a BAK-dependent manner. Previous works using different VDAC2 extinction models provided contrasting results concerning the function of this channel, with some studies demonstrating no role, antagonism or even the promotion of the apoptotic response (10,28-30). To better understand these differences, we transiently silenced VDAC2 in MM cells, and it did not modify the expression of BAK but it led to increased mitochondrial priming and, consequently, enhanced the apoptotic response. These contrasting results suggest that the mitochondrial levels of VDAC2 may determine BAK stability, function, and the apoptotic threshold. Indeed, our results suggest that the complete deletion of VDAC2 may be deleterious due to the induced BAK degradation, which impairs mitochondrial priming. In contrast, a partial or transient decrease in

VDAC2 does not affect BAK levels and might leave BAK free to be activated, thereby enabling its pro-apoptotic function and probably affecting the dynamics of BCL2 family interactions, a hypothesis that is currently under investigation. This finely tuned mechanism of the VDAC2 regulation of BAK might explain why, in different contexts, VDAC2 suppress or promote BAK pro-apoptotic activity (10,11,31,32). Cheng *et al* demonstrated that VDAC2-deficient MEFs, while showing moderately decreased levels of BAK, displayed enhanced activation of BAK and were more sensitive to apoptotic signals (10). Accordingly, it was demonstrated that BAK inhibition by VDAC2 is dependent on their physical interaction through the BAK transmembrane domain (33). Conversely, Roy *et al* reported that VDAC2-deficient MEFs exhibited a loss of sensitivity to tBID-induced apoptosis and a partial reduction of BAK levels (30). Roy *et al* also reported that proteasome inhibition did not restore BAK expression in VDAC2-deficient MEFs, and they concluded that reduction in BAK levels was due to the ineffective targeting of BAK to the mitochondria. A key finding in our study is the demonstration that simultaneous inhibition of both proteasome and lysosomes degradation restored BAK expression in *VDAC2-KO* cells, suggesting that VDAC2 is crucial for BAK function, most likely by facilitating BAK stabilization.

The endogenous interaction between BAK and VDAC2 observed in mitochondrial fractions of MM cells has been previously described in other cellular models (10,34,35). This interaction has been considered a potential drug target in order to discover molecules that could promote apoptosis (36). However, to date, there is no compound capable of achieving this goal. To our knowledge, only two small molecules specifically target VDAC2. The first, WEHI-9625, blocks mouse BAK-driven apoptosis by stabilizing the interaction VDAC2/BAK, with no ability to impede apoptosis induced by human BAK. These results indicate that subtle differences must exist in how mouse-BAK and human-BAK interact with VDAC2, differences that might influence the function of the VDAC2/BAK complex in each cellular model (36). The second, Efsevin, recently identified as a VDAC2 modulator, binds to VDAC2 (23) and reverses the arrhythmia phenotype observed in the tremblor zebrafish model, activity dependent on VDAC2 (22). However, Efsevin has never been assessed as an apoptotic modulator. We provided the first evidence that Efsevin enhances mitochondrial priming and synergizes with S63845 in a BAK-dependent manner, regardless of *TP53* status. While Efsevin alone did not induce apoptosis, it requires additional apoptotic signals to trigger this process. Our findings suggest that Efsevin regulates apoptosis upstream MOMP, similar to the effect observed with transient VDAC2 silencing. However, Efsevin does not appear to affect the activation of either BAK or BAX. Further investigation is needed to elucidate the mechanism by which Efsevin enhances apoptosis. We have also presented evidences that Efsevin effectively enhances cell death induced by S63845 in myeloma cells from patients. Whether Efsevin can also enhance the apoptotic response in other hematological malignancies is currently under investigation.

In conclusion, we have demonstrated that in MM cells, VDAC2 and BAK expression are correlated at both RNA and protein levels. VDAC2 controls BAK stability and function and the VDAC2 modulator

Efsevin increases BAK-dependent apoptosis. Efsevin is a novel strategy to heighten apoptotic priming and enhance the apoptotic response to BH3-mimetics particularly in the resistant MM cells.

MATERIAL AND METHODS

Human myeloma cell lines and primary myeloma cells

Human Myeloma Cell Lines (HMCLs, n=21) were characterized as previously described (37) and tested for mycoplasma contamination by PCR. MDN, BCN, XG5, XG6, XG7, XG10, NAN11 and NAN12 were derived in our laboratory and are cultured with RPMI1640 with 5% FCS and 3ng/ml recombinant IL-6. The KMM1, KMS12PE and KMS11 cell lines were kindly provided by Dr. Otsuki (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan); KARPAS-620 (K620) by Dr. Karpas (Cambridge Clinical School, Cambridge UK); ANBL6 by Dr. Jelinek (Rochester, USA); MM1S by Dr. S. Rosen (Northwestern University, Chicago, USA); AMO1, LP1, L363, NCI-H929 (NCI), U266, OPM2 HMCLs were from DSMZ (Braunschweig, Germany) and JIM3 was provided by Dr. I. MacLennan (Birmingham Medical School, Birmingham, United Kingdom).

Bone marrow/blood samples from MM patients were obtained after informed consent at University Hospital of Nantes, Department of Hematology (MYRACLE study; NTC03807128) (38).

Reagents and antibodies

Venetoclax (ABT-199) and Bortezomib were from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA); S63845 from Chemietek (Indianapolis, USA) and BafilomycinA1 from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Efsevin was synthesized by Dr. Ohyun Kwon and Jose Antonio Moreno, (Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles) and previously characterized (22). Anti-VDAC2 (PA5-28106) was purchased from Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA). Anti-BAK (12105S), anti-BAX (2772S), anti-anti-BCLXL (2764S), anti-PUMA (12450S), anti-NOXA (14766), anti-TUBULIN (3873S) and anti-pEIF2alpha (9721S) from Cell Signaling (Ozyme, Saint-Cyr l'Ecole, France). BCLXL (sc-271121), MCL1 (sc-12756) from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). ACTIN (MAB1501) and BIM (Ab17003) from Millipore (Molsheim, France). Anti-BCL2 from BD Transduction Laboratories (Le Pont de Claix, France).

Cell death assays

Cell death was assessed by AnnexinV-FITC staining (Beckman Coulter, Villepinte, France) in HMCLs or loss of CD138 staining in patient samples using flow cytometry as previously described (15,19).

CRISPR-CAS9 genome editing

VDAC2, BAK1 or BAX knockout (KO) myeloma cells were generated by mutating a codon into a stop codon using KI CRISPR-CAS9. This approach is based on the specific cut followed by homologous recombination with the DNA matrix bearing the stop codon. It allows the generation of identical clones, as the stop codon will always be at the same position and it ensures the deletion of potential existing isoforms. 500,000 cells were transiently electroporated using the Amaxa Transfection System (Lonza) in the presence of 44 pmol Cas9 electroporation enhancer (IDT), with a RNP complex i.e., 36 pmol SpCas9 Nuclease pre-incubated with 44 pmol AATO550-conjugated tracerRNA and 44 pmol of the specific methylated crRNA, and a DNA donor containing the stop codon (TAG). crRNA sequences were:

VDAC2 (5'-mAmTmTTGTTGAAGGTTTTGGGT-3'); *BAK1* (5'-mAmGmACCTGAAAAATGGCTTCG-3') and *BAX* (5'-mAmGmTAGAAAAGGGCGACAACC-3'). The following codons were mutated to a stop codon (TAG), *VDAC2* TTG (L26), *BAK1* TCG (S3) and *BAX* CGG (R109).

Cells were then cultured in 96-well plates and cloned with a limiting dilution of 0.3 cells per well. Clones were characterized for VDAC2, BAK and BAX sequences by Sanger Sequencing (Supplementary Figure 5). Three clones *VDAC2-KO*, 3 clones *BAK-KO*, 3 clones *BAX-KO* and 3 CTR clones were selected for KMM1 cell line. For the KMS12PE cell line, 4 clones *VDAC2-KO* and 3 CTR clones were selected. Control clones were obtained using the same electroporation procedure, but without the addition of a target crRNA.

Mass spectrometry and proteomic analysis

Proteomic profile was performed using label-free DIA LC-MS/MS approach (Supplementary Material). The identification of each clone in the proteomic analysis is summarized in Table S5.

RNA-seq analysis

Genomic profiling of HMCLs clones was assessed by 3'-digital gene expression sequencing DGE-seq (3'seq-RNA), as previously described (16). The identification of each clone in the 3'seq-RNA analysis is summarized in Table S5.

siRNA transfection

KMM1 cell line was transfected with 100 pmol siRNA using Lipofectamine RNAiMAX™ Reagent (Life Technologies, St Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. KMS12PE cell line was transfected by nucleofection using the Amaxa Transfection System (Lonza), the SF Solution and the CA 137 program. siRNAs ON-TARGETplus Control (D-001810-10-20) and VDAC2 (L-019766-00-0005) were from Dharmacon (Ilkirch, France). For longer transfection times, the respective siRNA was added after the first transfection period.

Cross-linking

Mitochondria-enriched fractions were obtained as previously described (Gomez-Bougie et al., 2007). A 200 µg aliquot of this fraction was incubated 30 minutes at room temperature with 0.5 mM (final concentration) of Disuccinimidyl suberate crosslinker (DSS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), which was diluted in DMSO just before addition. After incubation, DTT was added to a final concentration of 50 mM and incubated for 10 minutes at room temperature. Then, PBS was added up to 1.5 ml and centrifuged at 15 000 rpm for 15 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 60 µl of mitochondria lysis buffer and sonicated. The crosslinking reaction was split in two, denatured and analyzed by western blotting.

Intracellular BH3 profiling

BH3 profiling assay was performed as previously described, using BH3 derived peptides and Venetoclax (40). BIM and BMF peptides measured global priming, MS1 peptide measured MCL1 dependence, the inert peptide PUMA2A was included as a negative peptide control, Venetoclax measured BCL2 dependence and DMSO was a control condition. Briefly, cells were permeabilized in DTEB buffer containing 0.002% of digitonin and exposed to peptides and Venetoclax for 1 hour at 27°C, followed by fixation with 8% formaldehyde at room temperature for 15 minutes. After addition of neutralizing buffer (Tris/Glycine buffer) for 5 minutes, cells were stained with anti-cytochrome c antibody Alexa 647 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) in 0.1% Saponin/1% BSA/PBS overnight at 4°C. Cytochrome c release was analyzed by flow cytometry using a FACs CantoII (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and the quantification of cytochrome c loss induced by each peptide was calculated by gating the cytochrome c positive population.

BAX and BAK activation

The detection of BAK or BAX activation was performed as previously described (41). Briefly, 1×10^6 cells were fixed and permeabilized using the FOXP3 transcription factor staining buffer set (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 00-5523-00) following the manufacturer's recommendations. Cells were then incubated with the following antibodies: BAX (clone 6A7) from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), BAK (clone AB-1) from Calbiochem (Moslheim, France), mouse IgG1 or IgG2a isotypic controls (Miltenyl, France) for 30 minutes. After washing, cells were incubated with the Alexa fluor 647 antibody for 30 minutes, washed once in PBS and resuspended in PBS-1% formaldehyde and analyzed flow cytometry.

Immunoblotting

Cells pellets were lysed 40 minutes on ice in 0.5% NP40 containing lysis buffer for immunoblotting. Lysates were then centrifugated 30 minutes at 10 000 rpm at 4°C and supernatants were collected. Total protein lysates (50µg per lane) were separated by SDS-PAGE using precast gels (Bio-Rad, California, USA or Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and then electrotransferred into a PVDF membrane using the Trans-blot Turbo transfer system at 2.5 A for 7 min (Bio-Rad, California, USA). Membranes were then blocked in 5% skim milk-TBS-0.01%Tween solution and further incubated overnight with the respective primary antibody Chemiluminescence was detected using Clarity-ECL detection reagent (Bio-Rad, California, USA) in a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, California, USA). Protein expression levels were quantified using ImageLab and Image J software.

REFERENCES

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31–46.
2. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1294–305.
3. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3):393–403.
4. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020 Apr;12(4):a036319.
5. Maurya SR, Mahalakshmi R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities. *Biological Reviews.* 2017;92(4):1843–58.
6. Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1174–81.
7. Colombini M. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol.* 1989 Oct;111(2):103–11.
8. Törnroth-Horsefield S, Neutze R. Opening and closing the metabolite gate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):19565–6.
9. Craigen WJ, Graham BH. Genetic strategies for dissecting mammalian and Drosophila voltage-dependent anion channel functions. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Jun;40(3):207–12.
10. Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis. *Science.* 2003 Jul 25;301(5632):513–7.
11. Chin HS, Li MX, Tan IKL, Ninnis RL, Reljic B, Scicluna K, et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun.* 2018 Nov 26;9(1):4976.

12. Bhatt P, Kloock C, Comenzo R. Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: A Review of Available Therapies and Clinical Scenarios Encountered in Myeloma Relapse. *Curr Oncol*. 2023 Feb 15;30(2):2322–47.
13. Morales AA, Kurtoglu M, Matulis SM, Liu J, Siefker D, Gutman DM, et al. Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):1329–39.
14. Dai H, Ding H, Meng XW, Peterson KL, Schneider PA, Karp JE, et al. Constitutive BAK activation as a determinant of drug sensitivity in malignant lymphohematopoietic cells. *Genes Dev*. 2015 Oct 15;29(20):2140–52.
15. Gomez-Bougie P, Maiga S, Tessoulin B, Bourcier J, Bonnet A, Rodriguez MS, et al. BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment. *Blood*. 2018 Dec 20;132(25):2656–69.
16. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoëlen C, Descamps G, et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis*. 2020 May 5;11(5):316.
17. Thijssen R, Diepstraten ST, Moujalled D, Chew E, Flensburg C, Shi MX, et al. Intact TP-53 function is essential for sustaining durable responses to BH3-mimetic drugs in leukemias. *Blood*. 2021 May 20;137(20):2721–35.
18. Liu T, Lam V, Thieme E, Sun D, Wang X, Xu F, et al. Pharmacologic Targeting of Mcl-1 Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in B-Cell Lymphoma Cells in a TP53- and BAX-Dependent Manner. *Clin Cancer Res*. 2021 Sep 1;27(17):4910–22.
19. Durand R, Descamps G, Dousset C, Bellanger C, Maïga S, Alberge JB, et al. A p53 score derived from TP53 CRISPR/Cas9 HMCLs predicts survival and reveals major role of BAX in BH3 mimetics response. *Blood*. 2023 Dec 14;blood.2023021581.
20. Janker L, Mayer RL, Bileck A, Kreutz D, Mader JC, Utpatel K, et al. Metabolic, Anti-apoptotic and Immune Evasion Strategies of Primary Human Myeloma Cells Indicate Adaptations to Hypoxia. *Mol Cell Proteomics*. 2019 May;18(5):936–53.
21. Alsop AE, Fennell SC, Bartolo RC, Tan IKL, Dewson G, Kluck RM. Dissociation of Bak α 1 helix from the core and latch domains is required for apoptosis. *Nat Commun*. 2015 Apr 16;6:6841.

22. Shimizu H, Schredelseker J, Huang J, Lu K, Naghdi S, Lu F, et al. Mitochondrial Ca²⁺ uptake by the voltage-dependent anion channel 2 regulates cardiac rhythmicity. *eLife*. 2015 Jan 15;4:e04801.
23. Wilting F, Kopp R, Gurnev PA, Schedel A, Dupper NJ, Kwon O, et al. The antiarrhythmic compound efsevin directly modulates voltage-dependent anion channel 2 by binding to its inner wall and enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Br J Pharmacol*. 2020 Jul;177(13):2947–58.
24. Gong JN, Khong T, Segal D, Yao Y, Riffkin CD, Garnier JM, et al. Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood*. 2016 Oct 6;128(14):1834–44.
25. Pasvolsky O, Ghanem S, Milton DR, Rauf M, Tanner MR, Bashir Q, et al. Outcomes of patients with multiple myeloma and 1q gain/amplification receiving autologous hematopoietic stem cell transplant: the MD Anderson cancer center experience. *Blood Cancer J*. 2024 Jan 10;14(1):4.
26. Carter BZ, Mak PY, Tao W, Ayoub E, Ostermann LB, Huang X, et al. Combined inhibition of BCL-2 and MCL-1 overcomes BAX deficiency-mediated resistance of TP53-mutant acute myeloid leukemia to individual BH3 mimetics. *Blood Cancer J*. 2023 Apr 24;13(1):57.
27. Zhou K, Yao YL, He ZC, Chen C, Zhang XN, Yang KD, et al. VDAC2 interacts with PFKFB3 to regulate glucose metabolism and phenotypic reprogramming of glioma stem cells. *Cell Death Dis*. 2018 Sep 24;9(10):988.
28. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007 May;9(5):550–5.
29. Setoguchi K, Otera H, Mihara K. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J*. 2006 Dec 13;25(24):5635–47.
30. Roy SS, Ehrlich AM, Craigen WJ, Hajnóczky G. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep*. 2009 Dec;10(12):1341–7.
31. Naghdi S, Várnai P, Hajnóczky G. Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 13;112(41):E5590–9.

32. Ren D, Kim H, Tu HC, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, et al. The VDAC2-BAK Rheostat Controls Thymocyte Survival. *Sci Signal*. 2009 Aug 25;2(85):10.1126/scisignal.2000274.
33. Lazarou M, Stojanovski D, Frazier AE, Kotevski A, Dewson G, Craigen WJ, et al. Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J Biol Chem*. 2010 Nov 19;285(47):36876–83.
34. Ma SB, Nguyen TN, Tan I, Ninnis R, Iyer S, Stroud DA, et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ*. 2014 Dec;21(12):1925–35.
35. Yuan Z, van Delft MF, Li MX, Sumardy F, Smith BJ, Huang DCS, et al. Key residues in the VDAC2-BAK complex can be targeted to modulate apoptosis. *PLoS Biol*. 2024 May;22(5):e3002617.
36. van Delft MF, Chappaz S, Khakham Y, Bui CT, Debrincat MA, Lowes KN, et al. A small molecule interacts with VDAC2 to block mouse BAK-driven apoptosis. *Nat Chem Biol*. 2019 Nov;15(11):1057–66.
37. Maïga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A*. 2015 Apr;87(4):285–8.
38. Benaniba L, Tessoulin B, Trudel S, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Minvielle S, et al. The MYRACLE protocol study: a multicentric observational prospective cohort study of patients with multiple myeloma. *BMC Cancer*. 2019 Aug 29;19:855.
39. Gomez-Bougie P, Wuillème-Toumi S, Ménoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, et al. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5418–24.
40. Dousset C, Maïga S, Gomez-Bougie P, Le Coq J, Touzeau C, Moreau P, et al. BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2017 Nov;179(4):684–8.
41. Champion O, Soler A, Maïga S, Bellanger C, Pellat-Deceunynck C, Talbot A, et al. BCLXL PROTAC degrader DT2216 targets secondary plasma cell leukemia addicted to BCLXL for survival. *Front Oncol*. 2023 Jul 17;13:1196005.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. BAK protein expression is drastically reduced in *VDAC2-KO* MM cells

A) *VDACs* expression in MM cells. *VDAC1*, *VDAC2* and *VDAC3* expression was assessed by RNA-seq in the (MMRF)-CoMMpass cohort (n=764) and by 3'seq-RNA (3'SRP) in human myeloma cell lines (HMCLs) (n=17). **B)** Venn diagram representing the number of differentially expressed genes between control (CTR) and *VDAC2-KO* clones derived from KM12PE and KMM1. *VDAC2-KO* and CTR clones were profiled using 3'SRP and the differentially expressed genes (indicated number) between *VDAC2-KO* clones vs CTR clones for each cell line were selected according the Log-fold change (>1 or <-1) and *p*val (<0.05), (Supplementary Table S1-2). **C)** Venn diagram representing the number of differentially expressed proteins between CTR and *VDAC2-KO* clones derived from KM12PE and KMM1. *VDAC2-KO* clones (4 for KMS12PE and 3 for KMM1) and CTR clones (n=3) were profiled by DIA LC-MS/MS quantitative proteomics, and the differentially expressed proteins (indicated number) between *VDAC2-KO* clones vs CTR clones for each cell line were selected according the Log-fold change (>1 or <-1), average expression (>10) and *p*val (<0.05, Supplementary Table 3-4). **D)** BAK, but not BAX, expression was dramatically decreased in *VDAC2-KO* cells. Western blotting analysis of *VDAC2*, BAK and BAX protein expression in CTR and *VDAC2-KO* clones derived from KMS12PE (CTR=3, *VDAC2-KO*=4) and KMM1 (CTR=3, *VDAC2-KO*=3) cells. A representative western blot is shown (top panel). Protein expression levels were quantified and normalized to ACTIN; results corresponded to the mean \pm SD and are representative of at least 3 experiments (bottom panel). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

Figure 2. *VDAC2* and BAK expression correlates and both proteins form endogenous complexes at the mitochondria

A) and **B)** *VDAC2* and BAK protein expression were correlated. *VDAC2*, BAK and BAX protein levels were analyzed by western blotting in 21 HMCLs. Protein levels were quantified and normalized to ACTIN. LP1 cell lysate was included as an internal control. The results are representative of at least 2 independent experiments. **B)** Correlations between *VDAC2* and BAK or BAX relative protein levels were assessed using the Spearman test, *p* and *r* values are indicated. **C)** *VDAC2* and BAK formed endogenous complexes. Mitochondria-enriched fractions were obtained by subcellular fractionation and DSS cross-linker was added as indicated. After denaturation, fractions were analyzed by western blotting and the BAK/*VDAC2* interaction was detected using anti-BAK or anti-*VDAC2* antibodies.

Figure 3. VDAC2 controls mitochondrial priming by protecting BAK from degradation

A) Simultaneous inhibition of proteasome and lysosome pathways rescued BAK in *VDAC2-KO* cells. KMM1 CTR2 and *VDAC2-KO6* cells were treated with 5nM Bortezomib (Bz), 50nM BafilomycinA1 (Baf A1) or the combination of both for the indicated times. The expression of the indicated proteins was assessed by western blotting. NOXA and pEIF2 alpha protein expression were included as controls of Bz and Baf A1 treatment, respectively. BAK protein levels upon the combination treatment were quantified and normalized to ACTIN. Results are representative of 3 independent experiments (mean \pm SD). Statistical analysis was performed by paired t test. **B)** and **C)** Mitochondrial priming was inhibited upon VDAC2 or BAK deletion. BH3 profiling was performed on KMS12PE (CTR7 and *VDAC2-KO8*) and KMM1 (CTR4, *VDAC2-KO6* and *BAK-KO11*) cells. Cytochrome *c* release was measured by flow cytometry after challenging cells with BH3-derived peptides. BIM (0.05 μ M), BMF (10 μ M), MS1 peptide (10 μ M for KMS12PE, 5 μ M for KMM1) and Venetoclax (2 μ M). PUMA 2A (10 μ M) was an inert peptide. Values corresponded to the percentage of cytochrome *c* loss (mean \pm SD) of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using the 2-way ANOVA test.

Figure 4. Transient inhibition of VDAC2 does not induce BAK decrease, enhances mitochondrial priming and sensitivity to BH3 mimetics associated with BAK activation

A) BAK levels were not modified under VDAC2 knocked-down. KMS12PE and KMM1 cell lines were transfected with siRNA targeting VDAC2 during 24 or 48 hours, respectively. siRNA transfection efficacy was determined by western blotting. VDAC2, BAK and BAX relative protein levels were quantified and normalized to TUBULIN or ACTIN, results corresponded to the mean \pm SD and are representative of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **B)** Mitochondrial priming was increased under transient VDAC2 silencing. BH3 profiling was performed on KMS12PE and KMM1 cell lines that were transfected with siRNA CT or targeting VDAC2 as in A). Cytochrome *c* release was measured by flow cytometry after challenging cells with BIM (0.05 μ M), MS1 peptides (10 μ M for KMS12PE and 5 μ M for KMM1) and Venetoclax (0.5 μ M). PUMA 2A (10 μ M) was an inert peptide. Values corresponded to the percentage of cytochrome *c* loss (mean \pm SD) of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using the 2-way ANOVA test. **C)** VDAC2 knock-down increased apoptosis induced by BH3-mimetics targeting MCL1 or BCL2. Transfected cells were treated with BH3-mimetics targeting MCL1 (S63845), BCL2 (Venetoclax) or with recombinant TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) during 24 hours. Cell death was determined by Annexin V staining using flow cytometry. LD₅₀ values corresponded to the mean \pm SD of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **D)** BAK activation was heightened under VDAC2 knock-down. Cells were permeabilized and stained with an anti-BAK (Ab-1) or an anti-BAX (6A7) mAb antibody directed against their conformational active

forms and analyzed by flow cytometry. A representative result is shown in the left panel. MFI values corresponded to 3 independent experiments (mean and \pm SD are indicated, right panel). Statistical analysis was performed using unpaired t test.

Figure 5. The VDAC2 modulator Efsevin increases mitochondrial priming and sensitivity to BH3 mimetics

A) VDAC2, BAK and BAX protein expression in KMM1 and KMS12PE cell lines treated with 10 μ M of Efsevin (EF) for the indicated times. A representative western blot from 3 independent experiments is shown. **B)** Mitochondrial priming was increased under EF treatment. BH3 profiling was performed on KMS12PE and KMM1 cells pre-treated with EF (10 μ M) during 72h. Cytochrome *c* release was measured by flow cytometry after challenging cells with BH3-derived peptides and Venetoclax. BIM peptide (0.05 μ M), MS1 peptide (10 μ M for KMS12PE, 5 μ M for KMM1) and Venetoclax (0.5 μ M). PUMA 2A (10 μ M) was an inert peptide. Values corresponded to the percentage of cytochrome *c* loss (mean \pm SD) of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using the 2-way ANOVA test. **C)** BAK and BAX activation remained unchanged under Efsevin treatment. KMS12PE and KMM1 cells were treated by EF (10 μ M) for 72 hours and stained using anti-BAK or anti-BAX conformation-specific antibodies, histograms are representative of three independent experiments. **D)** and **E)** Efsevin increased sensibility to BH3 mimetics targeting MCL1 or BCL2. HMCLs were treated with EF (10 μ M) for 72h and then treated with the combination of **D)** EF and S63845 or **E)** EF and Venetoclax for the next 24 hours. Cell death was assessed by Annexin V staining using flow cytometry. LD₅₀ values corresponded to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **F)** Efsevin-sensitizing effect was dependent on BAK. KMM1 CTR4, *BAX-KO1* and *BAK-KO11* cells were treated as in C). Cell death was assessed by Annexin V staining. LD₅₀ values corresponded to the mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **G)** Efsevin sensitized primary MM cells to MCL1 BH3 mimetic. The left graph represents cell death response of myeloma cells from patients' samples (n=27) to EF (15 μ M), S63845 (25 nM) or their combination after 24 hours of treatment. The right graph represents the difference between observed cell death (25 nM S63845 combined with 15 μ M EF) minus expected cell death (sum of cell death induced by 25 nM S63845 and by 15 μ M EF) (right). Cell death was assessed after 24 hours by flow cytometry. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon rank sum test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Cytocell-Flow Cytometry and FACS core facility (Structure Fédérative de Recherche (SFR) Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France), member of the Scientific Interest Group Biogenouest and the labex IGO-program supported by the French National Research Agency (n° ANR-11-LABX-0016-01) for its technical support.

The authors thank the Prot'ICO proteomics facility, Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), Alice Boissard and Cécile Henry for the mass spectrometry analysis and technical support.

The authors thank the Genomics Core Facility GenoA, member of Biogenouest and France Genomique and the Bioinformatics Core Facility BiRD, member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support.

The CoMMpass data were generated as part of the Multiple Myeloma Research Foundation Personalized Medicine Initiative.

Author's Contribution

O.C. participated in the design of the study, performed experiments, analyzed the data and participated in the writing of the article ; A.M.-A. and C.D. designed CRISPR/Cas9 strategy ; C.D. and O.C. derived CRISPR/Cas9 clones and profiled CRISPR/Cas9 *VDAC2*, *BAK1* and *BAX* cells ; S.M. managed the patient cohort and performed experiments ; C.B. performed bioinformatic analysis in MMRF-CoMMpass and in MYRACLE cohorts, and analyzed 3'SRP sequencing and proteomic data ; F.G. performed mass spectrometry experiments and analyzed data ; C.A. and G.D. performed experiments. J.A.M. and O.K. synthesized Efsevin; N.L.L. managed the patient cohort; P.M. managed the patient cohort, C.T. participated in the design of the study and managed the patient cohort; D.C. and C.P.-D. participated in the design of the study, in the writing and revision of the article; P.G.-B. designed the study, performed experiments, analyzed the results and wrote the article.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the University Hospital of Nantes (MYRACLE study; NTC03807128). The patients provided their written informed consent to participate in this study.

FUNDING

This work was supported by grants from Ligue Contre le Cancer, Comité de Loire-Atlantique (CD44) and Vendée (CD85) and Action Cancer 44. OC was supported by grants from HEMA-NexT (Chaire NexT to CT; ANR-16-IDEX-0007) and Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies (FFRMG).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available on request from the corresponding author Patricia Gomez-Bougie (patricia.gomez@inserm.fr).

Table 1A. HMCLs' characteristics and LD₅₀ values of S63845 +/- Efsevin

| HMCL | Translocation | Target Genes | TP53 | LD ₅₀ (nM) | |
|---------|---------------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------|
| | | | | S63845 | S63845 + EF |
| BCN | t(14;16) | <i>c-Maf</i> | wt | 370 | 79.7 |
| KMS12PE | t(11;14) | <i>CCND1</i> | m ^{R337L} | 200 | 63 |
| KMM1 | t(6;14) | <i>CCND3</i> | m ^{C135F} | 83 | 32 |
| MM1S | t(14;16) | <i>c-Maf</i> | wt | 156.2 | 93.3 |
| XG7 | t(4;14) | <i>MMSET</i> | wt | 51.5 | 60.3 |
| L363 | t(20;22) | <i>MafB</i> | m ⁷⁸² | 27.5 | 18.7 |

Table 1B. HMCLs' characteristics and LD₅₀ values of S63845 +/- Efsevin

| HMCL | Translocation | Target Genes | TP53 | LD ₅₀ (nM) | |
|-----------|---------------|--------------|--------------------|-----------------------|----------|
| | | | | Ven | Ven + EF |
| KMS12PE | t(11;14) | <i>CCND1</i> | m ^{R337L} | 6.8 | 1 |
| MDN | t(11;14) | <i>CCND1</i> | wt | 32.3 | 6.1 |
| XG5 | t(11;14) | <i>CCND1</i> | m ^{R282W} | 18.4 | 11 |
| KARPAS620 | t(11;14) | <i>CCND1</i> | m ^{C135Y} | 69.7 | 19 |

HMCLs were previously described (37). Cells were pre-treated or not during 72 hours with Efsevin (10 μM). Then, they were treated 24 hours with A) S63845 or S63865 + Efsevin (10 μM) or B) Venetoclax (Ven) or Ven + Efsevin (10 μM) and cell death was assessed by Annexin V staining. LD₅₀ values corresponded to the mean of at least 4 independent experiments.

Table 2. Cell death induced by S63845, Efsevin and their combination in MM primary cells

| Characteristics of patients' samples | | | | | | | | Myeloma cell death (%) | | |
|--------------------------------------|-------|--------|---------------|------|--------|---------|----------|------------------------|--------|------------------|
| Patient N° | Stage | Sample | Plasma cell % | 1q21 | del17p | t(4;14) | t(11;14) | Efsevin | S63845 | Efsevin + S63845 |
| MM-01-0305 | D | BM | 25 | 1q21 | | | t(11;14) | 0 | 77 | 84 |
| MM-01-0331 | D | BM | 25 | 1q21 | | | | 6 | 37 | 67 |
| MM-01-0348 | D | PB | 22 | | | | t(11;14) | 0 | 46 | 55 |
| MM-01-0370 | D | BM | 6 | 1q21 | | x | | 0 | 0 | 9 |
| MM-01-0374 | D | BM | 16 | 1q21 | | | | 2 | 8 | 29 |
| MM-01-0377 | D | BM | 11 | 1q21 | | x | | 7 | 42 | 47 |
| MM-01-0384 | D | BM | 26 | | | x | t(11;14) | 13 | 6 | 47 |
| MM-01-0388 | D | PB | 26 | 1q21 | | | t(11;14) | 30 | 93 | 98 |
| MM-01-0394 | D | BM | 26 | 1q21 | | | | 7 | 77 | 95 |
| MM-01-0421 | D | BM | 25 | | | | t(11;14) | 8 | 54 | 70 |
| MM-01-0431 | D | BM | 9 | x | x | x | x | 0 | 26 | 25 |
| MM-01-0437 | D | BM | 25 | | x | x | x | 24 | 33 | 73 |
| MM-01-0434 | D | BM | 32 | x | x | x | x | 0 | 32 | 70 |
| MM-01-0435 | D | BM | 6 | x | x | x | x | 14 | 24 | 51 |
| MM-01-0264(3) | P | BM | 18 | | | x | t(11;14) | 15 | 0 | 9 |
| MM-01-0274(2) | P | BM | 23 | 1q21 | del17 | x | | 3 | 78 | 86 |
| MM-01-0143(2) | P | PB | 32 | 1q21 | | | | 0 | 83 | 88 |
| MM-01-0059(2) | P | BM | 9 | 1q21 | | x | x | 0 | 81 | 100 |
| MM-01-0167(4) | P | PB | 41 | 1q21 | | x | | 15 | 4 | 35 |
| MM-01-0319 | R | PB | 13 | x | del17 | | x | 0 | 11 | 43 |
| MM-01-0361 | R | BM | 39 | | | | x | 17 | 17 | 42 |
| MM-02-0003(2) | R | BM | 14 | | | | | 29 | 56 | 87 |
| MM-01-0366 | R | BM | 16 | 1q21 | | x | x | 2 | 16 | 14 |
| MM-01-0391 | R | PB | 11 | 1q21 | | t(4;14) | | 11 | 86 | 95 |
| MM-01-0110(2) | R | BM | 7 | x | del17 | | | 10 | 12 | 0 |
| MM-01-0426 | R | BM | 6 | | | | | 0 | 56 | 47 |
| MM-01-0170(2) | R | BM | 6 | | del17 | | t(11;14) | 27 | 91 | 93 |

Mononuclear cells isolated from bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) from myeloma patients (MYRACLE cohort, NTC03807128) (38) were cultured 24 hours with S63845 (25 nM), Efsevin (15 μ M) or their combination, and myeloma cell death was assessed by flow cytometry. Del17p, 1q21 gain, t(4,14) and t(11;14) were determined by FISH (threshold >50% of cells)

D: Diagnosis. P: Progression; R: Relapse; x: not performed.

Figure 1

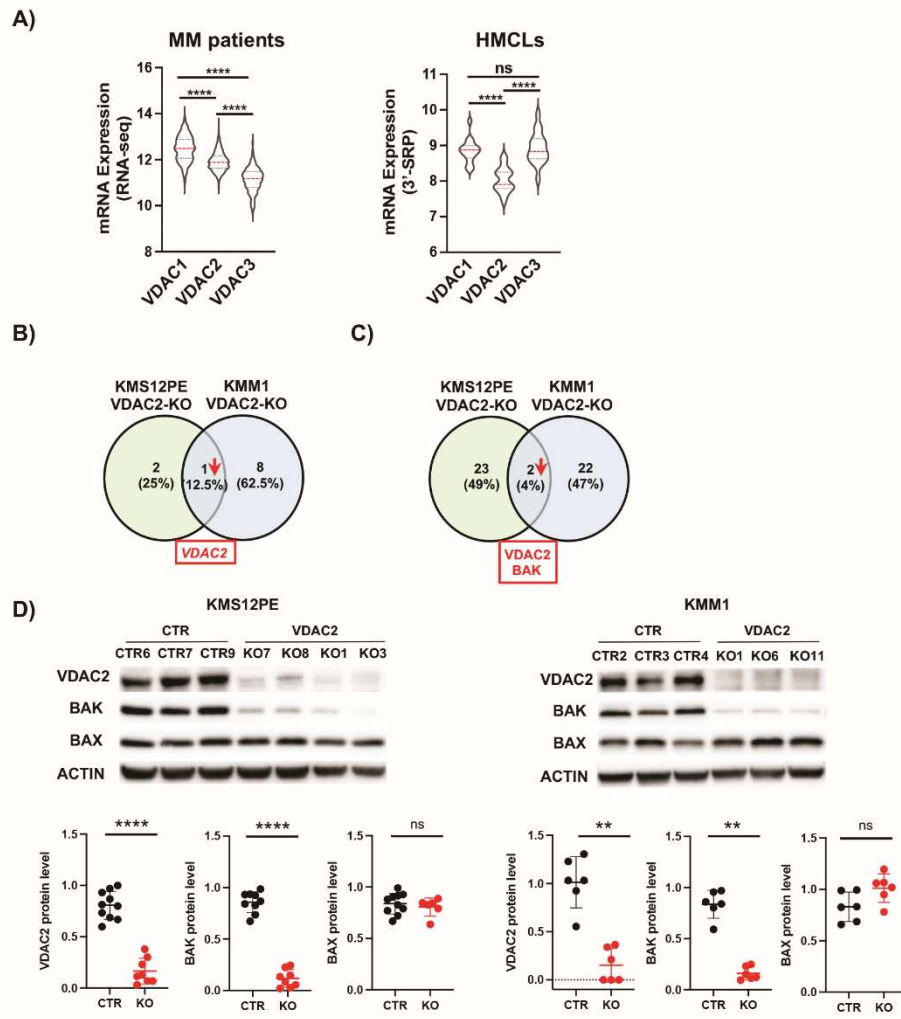


Figure 2

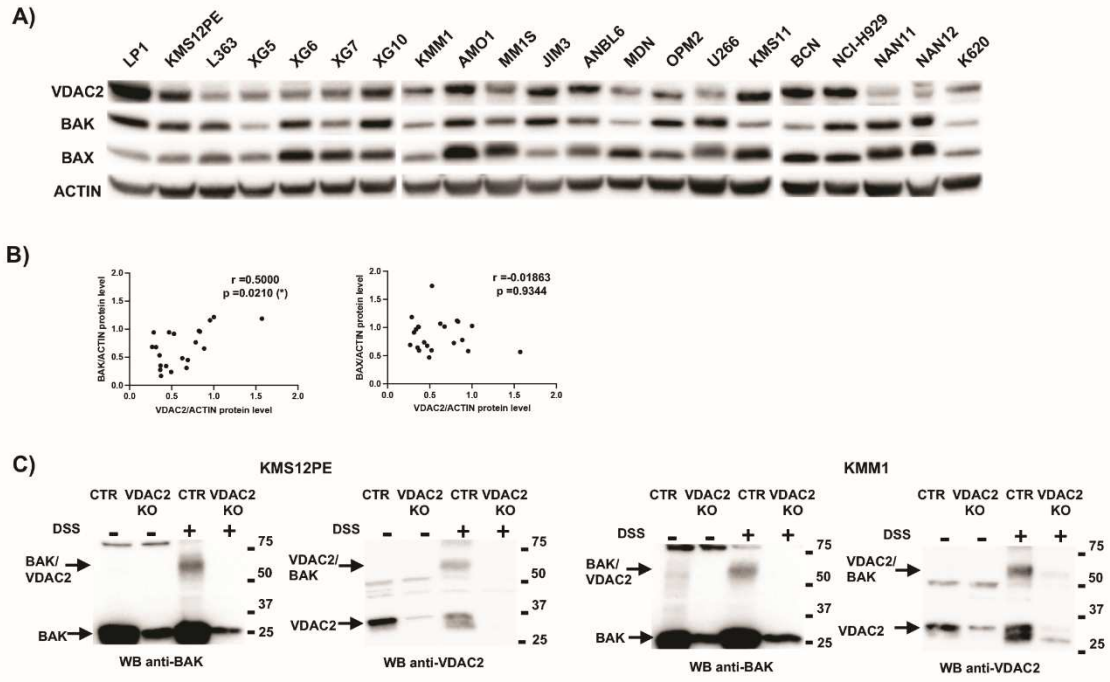
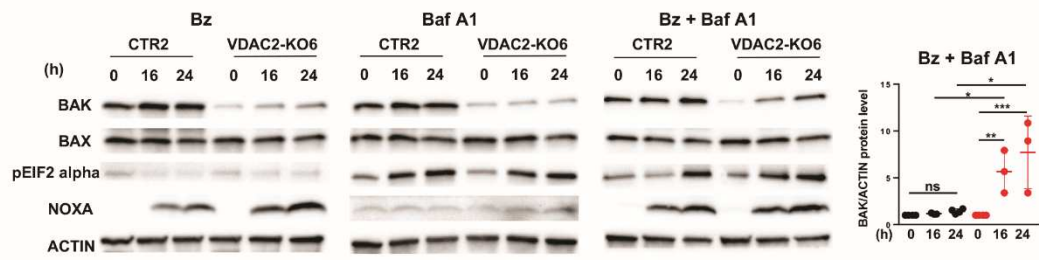
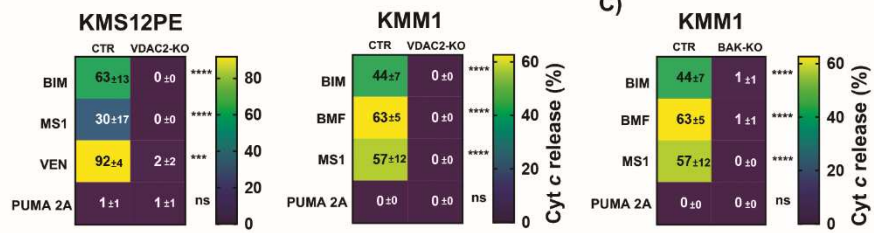


Figure 3

A)



B)



C)

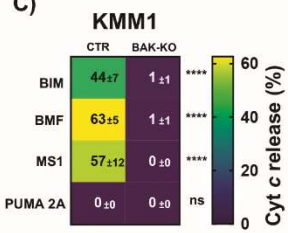


Figure 4

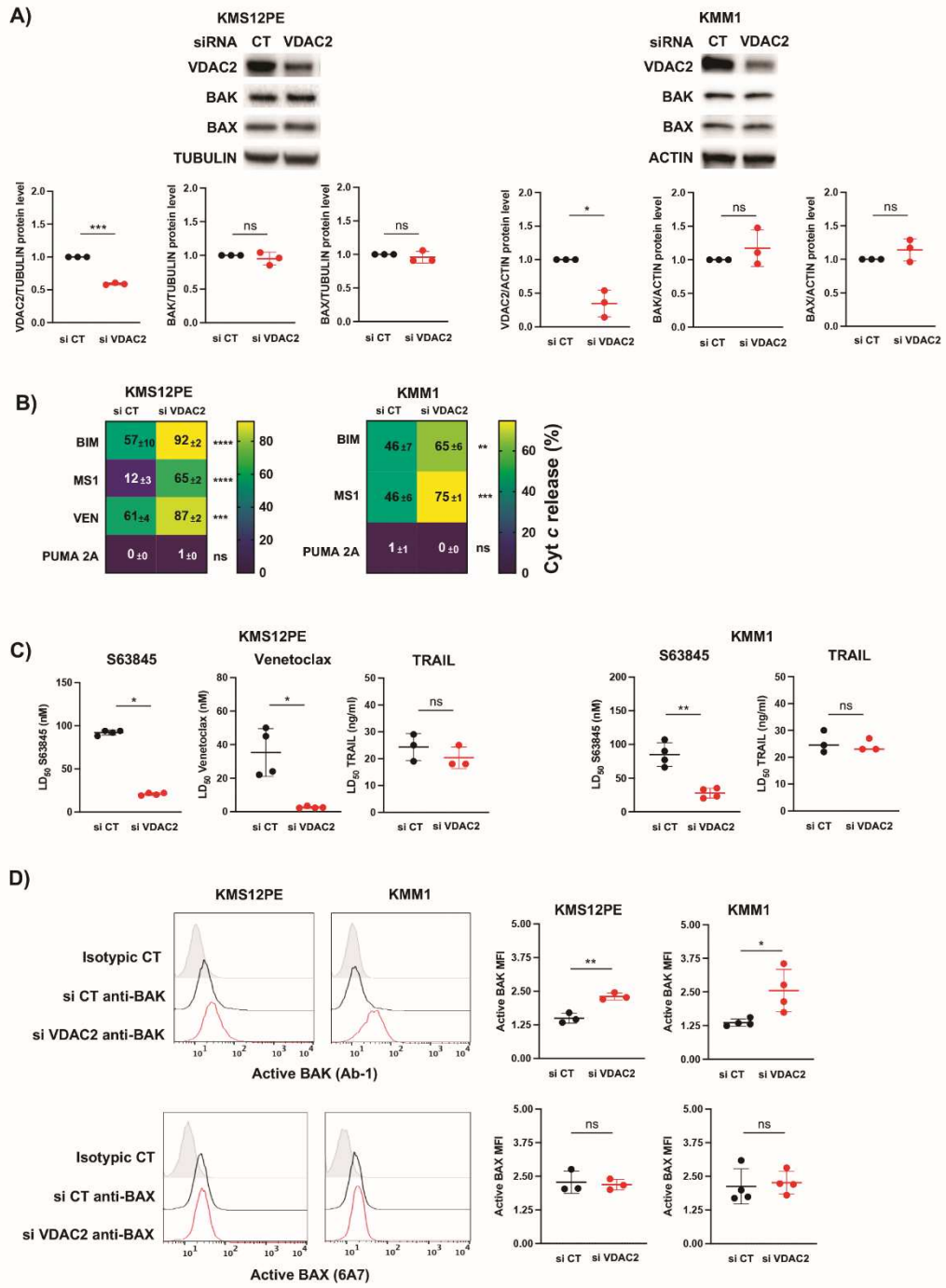
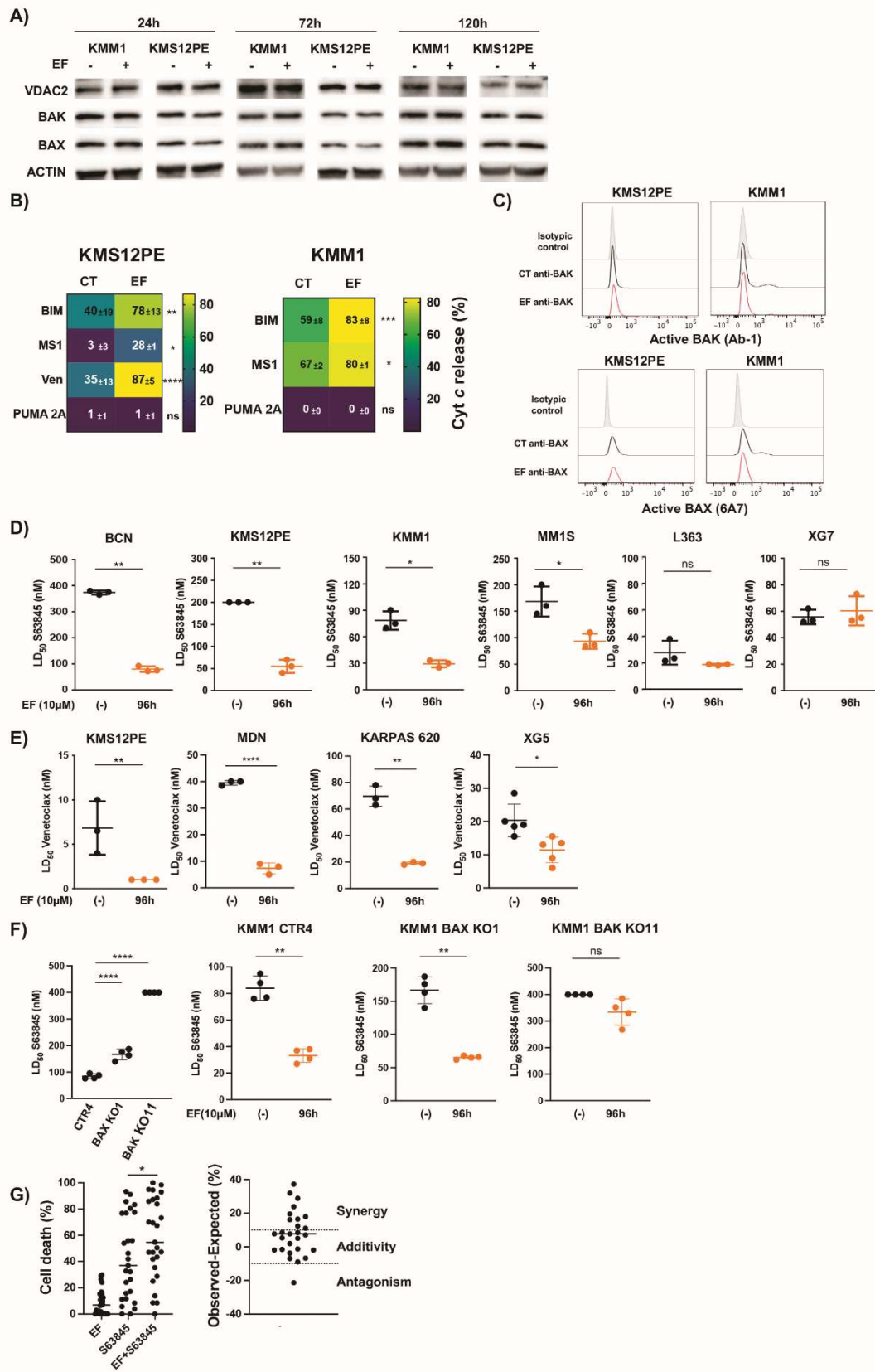


Figure 5



SUPPLEMENTARY INFORMATION

This document contains Supplementary Material and Methods, 5 supplementary Figures and 5 supplementary Tables.

Supplementary Material and Methods

Mass spectrometry and proteomic analysis

Protein sample preparation and Liquid chromatography mass spectrometry

Frozen cellular pellets were lysed and denatured using 200 μ L of 0.1% Rapigest-SF® (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), 5 mM DTT and 50 mM TRIS pH 8.5, at 95°C for 30 minutes. Sonication was performed 30 seconds at 20% power. Thiol residues were chemically reduced and then protected by alkylation for 10 minutes at 37°C in 10 mM MMTS (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Samples were cooled at room temperature before adding 5 μ g of trypsin (Sciex, Villebon sur Yvette, France) and incubated at 37°C overnight with 750 rpm mixing. Resulting peptides were cleared by centrifugation and the supernatant was desalted and eluted. The eluates were dried in a vacuum centrifuge concentrator, resuspended in 0.1% Formic Acid (FA). An equivalent of 200 ng of peptides was injected into the LC-MS/MS after quantification using a microBCA peptide assay.

Each sample was injected and separated on a C18 reverse phase column (Aurora series 1.6 μ m particles size, 75 μ m inner diameter and 25 cm length (IonOptics, Fitzroy, Australia) using a NanoElute LC system (Bruker, Wisssembourg, France). The eluate flow was electrosprayed into a timsTOF Pro 2 mass spectrometer (Bruker, Wisssembourg, France) over a 60 minutes hydrophobicity gradient ranging from 99% solvent A (0.1% FA in milliQ-grade H₂O) to 40% solvent B (80% ACN plus 0.1% FA in mQ-H₂O).

The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in Data-Independent Analysis (DIA) with PASEF-enabled method using the TIMS-Control software

3.1.4 (Bruker, Wisssembourg, France). The m/z acquisition range was 400–1201, with an ion mobility range of 0.6–1.43 1/K0 [V s/cm²], corresponding to an estimated cycle time of 1.80 seconds. DIA-PASEF windows, and collision energy were also left to default setting with a base of 0.85 1/K0 [V s/cm²] set at 20 eV and 1.30 1/K0 [V s/cm²] set at 59 eV. TOF mass calibration and TIMS ion mobility 1/K0 were performed linearly using three reference ions at 622, 922, and 1222 m/z (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA).

LC-MS/MS raw data analysis

The raw data were extracted, normalized and analyzed using Spectronaut® 18.0.23 (Biognosys AG, Schlieren, Switzerland) in DirectDIA+ mode, which modeled elution behavior, mobility and MS/MS events based on the Uniprot/Swissprot sequence 2022 database of all human protein sequences.

The protein identification false discovery rate (FDR) was restricted to a maximum of 1%, with the “match between runs” option enabled and inter-injection data normalization. The enzyme’s specificity was trypsin’s. The precursor and fragment mass tolerances were set to 15 ppm. Oxidation of methionine residues was set as variable modifications, while thiol groups from cysteine residues were considered fully alkylated by methylation. A minimum of two peptide ratios was required for relative quantification between groups. Relative protein quantification was performed using Label-Free Quantification (LFQ) intensities and Spectronaut® statistical tools were used to visualize data, assess quality and quantitatively.

Legends to Supplementary Figures

Supplementary Figure 1

A) Overall survival (OS) probabilities of 764 (MMRF)-CoMMpass patients according to the level of expression of *VDAC1*, *VDAC2* and *VDAC3* estimated by the Kaplan-Meier method. The low expression group corresponded to patients with the lowest third expression of the given gene (tertile) (n=255). **B)** *VDAC2-KO* clones derived from KMS12PE and KMM1 cells were profiled using 3' seq-RNA (3'SRP). Values corresponded to the Log₂ mRNA expression of the three *VDACs*. **C)** *VDAC2-KO* clones were profiled by DIA LC-MS/MS quantitative proteomics. *VDAC1* and *VDAC3* Values corresponded to the peptide intensities of the indicated proteins. Statistical analysis was done using the Mann-Whitney test. **D)** Western blotting analysis of the BCL2 family members in control clones (CTR) and *VDAC2-KO* clones. Results are representative of 2 independent experiments. **E)** *BAK* and *BAX* mRNA levels from *VDAC2-KO* clones profiled using 3'SRP.

Supplementary Figure 2

A) Protein expression of *VDAC2*, *BAK* and *BAX* in primary MM cells from patients at diagnosis and relapse (n=12). Values corresponded to the ln₂ of LFQ (Label free quantification) of the respective protein previously obtained by LC-MS/MS analysis (19). Correlation was assessed using Spearman test, *r* and *p* values are indicated. **B)** *VDAC2*, *BAK1* and *BAX* mRNA were analyzed in HMCLs (n=17) and in samples from the (MMRF)-CoMMpass cohort (n=764). Correlation was assessed using the Spearman test, *p* and *r* values are indicated.

Supplementary Figure 3

A) KMS12PE and KMM1 cell lines were transfected with siRNA targeting *VDAC2* for 72 and 120 hours, respectively. *VDAC2*, *BAK* and *BAX* were analyzed by western blotting, quantified and normalized to TUBULINE. **B)** KMS12PE and KMM1 cell lines were transfected with siRNA targeting *VDAC2* for 24 and 48 hours, respectively and then treated 24 hours with BH3- mimetics targeting MCL1 (S63845), BCL2 (Venetoclax) or with recombinant TRAIL. Cell death was assessed by Annexin V staining and flow cytometry. Results are representative of 3 independent experiments.

Supplementary Figure 4

A) MCL1, BCL2, BCLXL, BIM, PUMA and NOXA protein expression in KMM1 and KMS12PE cell lines treated with 10 μ M of Efsevin (EF) for the indicated times. Quantification is indicated below each band and was normalized to TUBULIN. **B)** KMS12PE and KMM1 cell lines were treated with EF during 72h and stained with anti-BAK Ab-1 or anti-BAX 6A7 mAb directed against the respective conformational forms. Results represent the MFI values (mean \pm SD) of three independent experiments for each cell line. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. **C)** and **D)** HMCLs were treated with different concentrations of EF or different time points, as indicated. Cell death was assessed by Annexin V staining. **E)** The combination of S63845 with EF (10 μ M) was assessed in HMCLs (n=6) after 24 hours of treatment. LD50 values corresponded to the mean \pm SD of at least 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **F)** Cells were pre-treated 72 hours with EF and then with the combination of EF and S63845 or Venetoclax for the next 24 hours, as indicated. BLISS scores were calculated using <https://synergyfinder.fimm.fi/> (18). Results represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. **G)** NCI-H929 NI#1 (*TP53^{+/+}*) and NCI- H929 *TP53KO#1* (*TP53^{-/-}*) clones, previously generated in our laboratory (18) were pre-treated with EF (10 μ M) for 96 hours and then with the combination of EF with S63845 for the next 24h. Cell death was assessed by Annexin V staining. LD50 values corresponded to the mean \pm SD of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired t test. **G)** BAK and BAX deletion in KMM1 *BAK-KO* and *BAX-KO* cells was evaluated by western blotting.

Supplementary Figure 5.

DNA sequences of clones **A)** *VDAC2-KO*, **B)** *BAK-KO* and **C)** *BAX-KO*. Sequences corresponded to the donor DNA strand (+). The generated stop codon is indicated in red (left panel). Examples of chromatograms from of the respective KO generated clones are presented, the stop codon is indicated in each case.

Supplementary Tables

Table S1. Differentially expressed genes between VDAC2 control (CTR) and *VDAC2-KO* clones derived from KMS12PE cell line were identified using edgeR. LogFC <-1 or >1. p value <0.05 and FDR <0.05

| Gene | logFC<-1 or >1 | logCPM >3 | Pvalue <0.05 | FDR<0.05 |
|---------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| <i>VDAC2</i> | -1.888008035 | 5.98819684 | 4.73E-05 | 0.03754434 |
| <i>TMEM132D.AS1</i> | 2.617892044 | 3.61804236 | 5.94E-05 | 0.04418711 |
| <i>HLA.DRB1</i> | 1.242470385 | 5.87245312 | 6.77E-05 | 0.0474279 |

Table S2. Differentially expressed genes between control (CTR) and *VDAC2-KO* clones derived from KMM1 cell line were identified using edgeR. LogFC <-1 or >1. p value <0.05 and FDR <0.05

| Gene | logFC<-1 or>1 | logCPM>3 | Pvalue<0.05 | FDR<0.05 |
|-----------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| <i>VDAC2</i> | -2.4048395 | 6.73937439 | 2.86E-22 | 3.63E-18 |
| <i>FOS</i> | -2.6731838 | 5.10239595 | 5.00E-09 | 1.06E-05 |
| <i>MAEL</i> | 1.16130134 | 6.29993869 | 1.28E-11 | 5.43E-08 |
| <i>DDIT3</i> | 1.0745461 | 5.83785201 | 2.09E-06 | 0.00203938 |
| <i>CLEC2B</i> | 1.06318168 | 6.07667496 | 3.00E-06 | 0.00272276 |
| <i>C12orf56</i> | 1.20099986 | 3.06849984 | 1.09E-05 | 0.00661191 |

Table S3. Differentially expressed proteins between control (CTR) and *VDAC2-KO* clones derived from KMS12PE cell line were identified using limma. LogFC <-1 or >1. Average expression >10 and p value <0.05

| Protein name | logFC<-1 or >1 | AveExpr>10 | Pvalue <0.05 |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------|
| VDAC2 | -6.429704879 | 13.85393704 | 0.00000705 |
| BAK | -2.128625053 | 12.99310241 | 0.00000301 |
| TBB2A;TBB4A;TBB4B;TBB5;TBB6 | -1.834116348 | 15.71440254 | 0.002357139 |
| URM1 | -1.191527496 | 12.04049345 | 0.002388465 |
| LRCC1 | -1.16320942 | 10.17038928 | 0.032471734 |
| SRXN1 | -1.065272616 | 13.23541531 | 0.045006255 |
| COF1;COF2;DEST | -1.032848287 | 10.94651398 | 0.000492708 |
| S52A2 | 1.025739949 | 10.64392936 | 0.03455999 |
| IF16 | 1.043418994 | 14.31632344 | 0.007574689 |
| HVCN1 | 1.062302334 | 13.10797774 | 0.025477534 |
| SRGP1;SRGP2 | 1.066129683 | 10.07113451 | 0.028190227 |
| RAB3A;RAB3D;RAB8B | 1.097939539 | 13.64975632 | 0.04156907 |
| IGSF1 | 1.102242929 | 10.65985691 | 0.016814529 |
| CGL | 1.121948049 | 14.0123069 | 0.004065844 |
| CENPM | 1.129075225 | 10.88476418 | 0.022006626 |
| ABC3B;ABC3F | 1.153907251 | 13.15659049 | 0.013821548 |
| SIA4B | 1.22034897 | 11.95379941 | 0.005720202 |
| TCAF2 | 1.24737672 | 11.04205201 | 0.02688867 |
| ARL1 | 1.456630437 | 14.98339225 | 0.00031079 |
| MVP | 1.490771008 | 13.45847027 | 0.000616073 |
| ISG20 | 1.691176619 | 11.13779997 | 0.01964373 |
| OXLA | 2.047023836 | 10.64401614 | 0.010690184 |
| FER | 2.132638776 | 10.88594429 | 0.010367657 |
| AMPD1 | 2.236833046 | 12.07908478 | 0.020994802 |
| LSP1 | 2.622575361 | 10.90229134 | 0.019145678 |

Table S4. Differentially expressed proteins between VDAC2 control (CTR) and *VDAC2-KO* clones derived from KMM1 cell line were identified using limma. LogFC <-1 or >1. Average expression >10 and p value <0.05

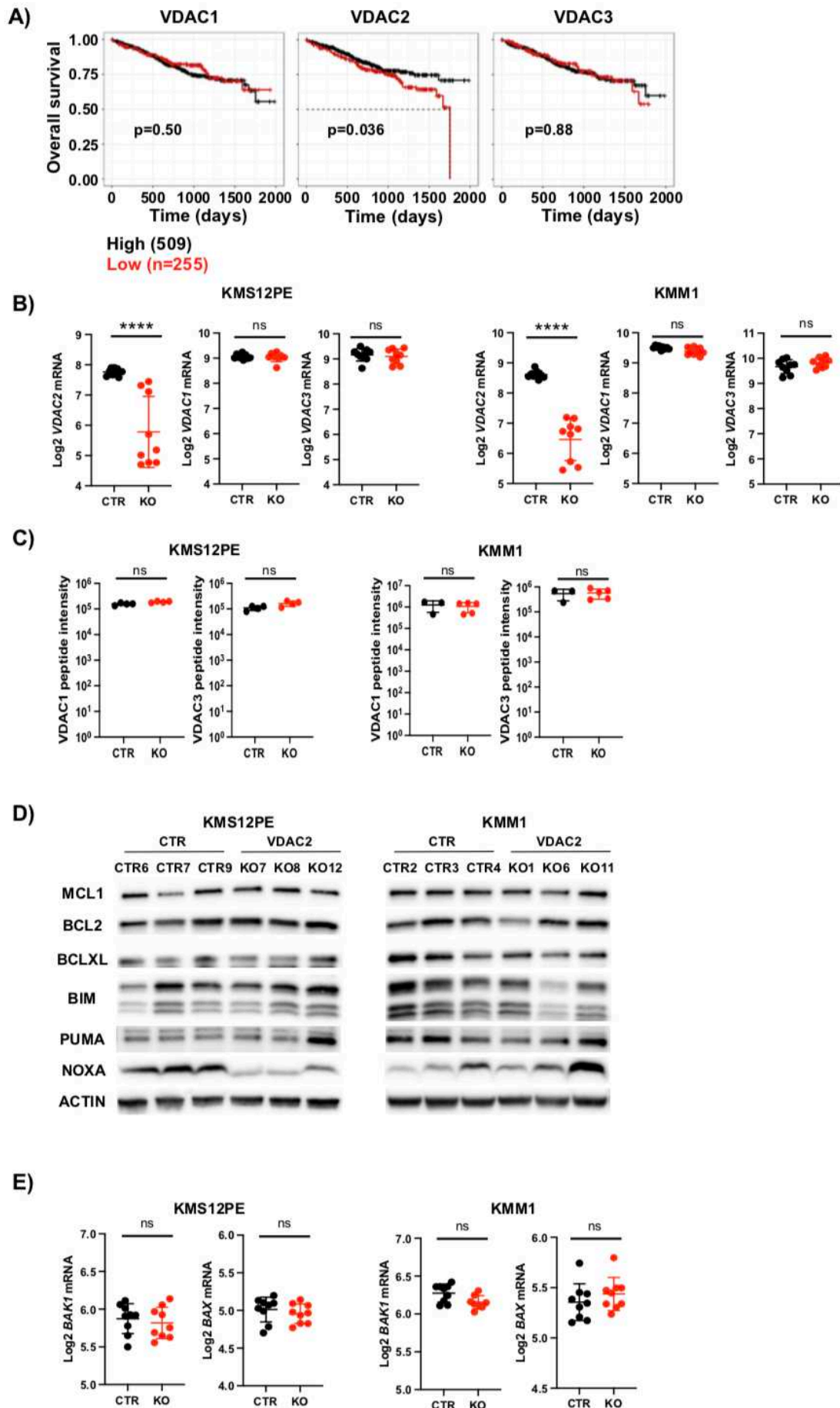
| Protein name | logFC<-1 or >1 | AveExpr>10 | PValue<0.05 |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| VDAC2 | -9.482568154 | 13.42837928 | 0.017412597 |
| BAK | -2.826828762 | 13.21877297 | 0.001367933 |
| K1C10 | -1.719649322 | 14.10796873 | 0.035742687 |
| K22E;K2C1 | -1.331430193 | 14.74452856 | 0.023331873 |
| NBPFA | -1.221154599 | 12.47048333 | 0.023871967 |
| CCR10 | -1.205553657 | 13.15503172 | 0.044748362 |
| LSR | -1.185382085 | 14.64394158 | 0.019199321 |
| DCLK1 | -1.138357456 | 14.5416121 | 0.009728825 |
| KAT5 | -1.057064359 | 10.83169022 | 0.012627401 |
| PLD6 | -1.04379986 | 13.70386362 | 0.032316552 |
| PLD3B | -1.006259784 | 12.16294716 | 0.025222857 |
| HYES | 1.012300457 | 13.78251762 | 0.000282226 |
| RIPR1 | 1.037330919 | 11.94986642 | 0.029196202 |
| PLCB | 1.048532001 | 14.01306804 | 0.04108085 |
| SEM4B | 1.054115787 | 12.17033259 | 0.01934308 |
| JUND;JUN | 1.063802014 | 12.85874453 | 0.017870212 |
| CHM4C | 1.128462925 | 11.65674485 | 0.032032472 |
| HDC | 1.20407589 | 10.76336658 | 0.011076311 |
| FRIH | 1.254353911 | 15.69044194 | 0.041012501 |
| SOX5 | 1.261998648 | 12.21498129 | 0.049903183 |
| SESN2 | 1.27308502 | 13.14638868 | 0.031580931 |
| ZFP90 | 1.330291166 | 10.65329291 | 0.021940713 |
| MAEL | 1.549681159 | 13.34967729 | 0.000825448 |
| PCDB5;PCDB9;PCDBB;PCDBD;PCDGD | 2.22720692 | 11.96582075 | 0.009702613 |

Table S5. Identification of CRISPR/Cas9 KO generated clones

| Clone Name in the article | Clone Name in DGEseq analysis | Clone Name in proteomic analysis |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| KMM1 CTR2 | KMM1_edit_ctr2 | KMM1_cr_edit_ctr2 |
| KMM1 CTR3 | KMM1_edit_ctr3 | KMM1_cr_edit_ctr3 |
| KMM1 CTR4 | KMM1_edit_ctr4 | KMM1_cr_edit_ctr4 |
| KMM1 VDAC2-KO1 | KMM1_VDAC2STOP_1 | KMM1_VDAC2_STOP_1 |
| KMM1 VDAC2-KO6 | KMM1_VDAC2STOP_6 | KMM1_VDAC2_STOP_6 |
| KMM1 VDAC2-KO11 | KMM1_VDAC2STOP_11 | KMM1_VDAC2_STOP_11 |
| KMS12PE CTR6 | KMS12PE_edit_ctr6 | KMS12PE_cr_edit_ctr6 |
| KMS12PE CTR7 | KMS12PE_edit_ctr7 | KMS12PE_cr_edit_ctr7 |
| KMS12PE CTR9 | KMS12PE_edit_ctr9 | KMS12PE_cr_edit_ctr9 |
| KMS12PE VDAC2-KO7 | KMS12PE_VDAC2STOP_7 | KMS12PE_cr_edit_STOP7 |
| KMS12PE VDAC2-KO8 | KMS12PE_VDAC2STOP_8 | KMS12PE_cr_edit_STOP8 |
| KMS12PE VDAC2-KO12 | KMS12PE_VDAC2STOP_12 | KMS12PE_cr_edit_STOP12 |
| KMS12PE VDAC2-KO1 | ND | KMS12PE_cr_edit_STOP1 |
| KMS12PE VDAC2-KO3 | ND | KMS12PE_cr_edit_STOP3 |
| | | |

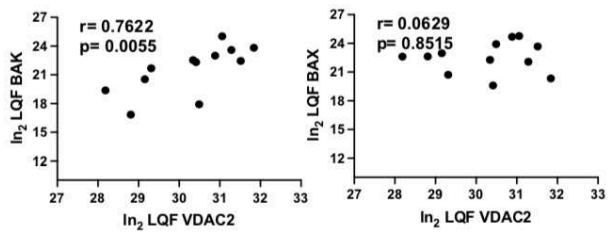
The respective generated clones were obtained from KM12PE and KMM1 cell lines.

Supplementary Figure 1

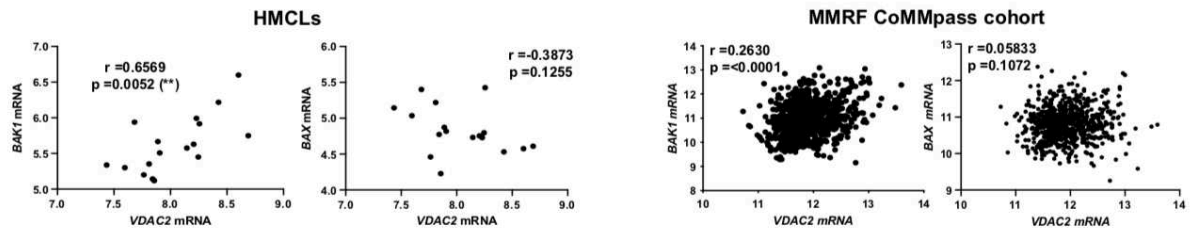


Supplementary Figure 2

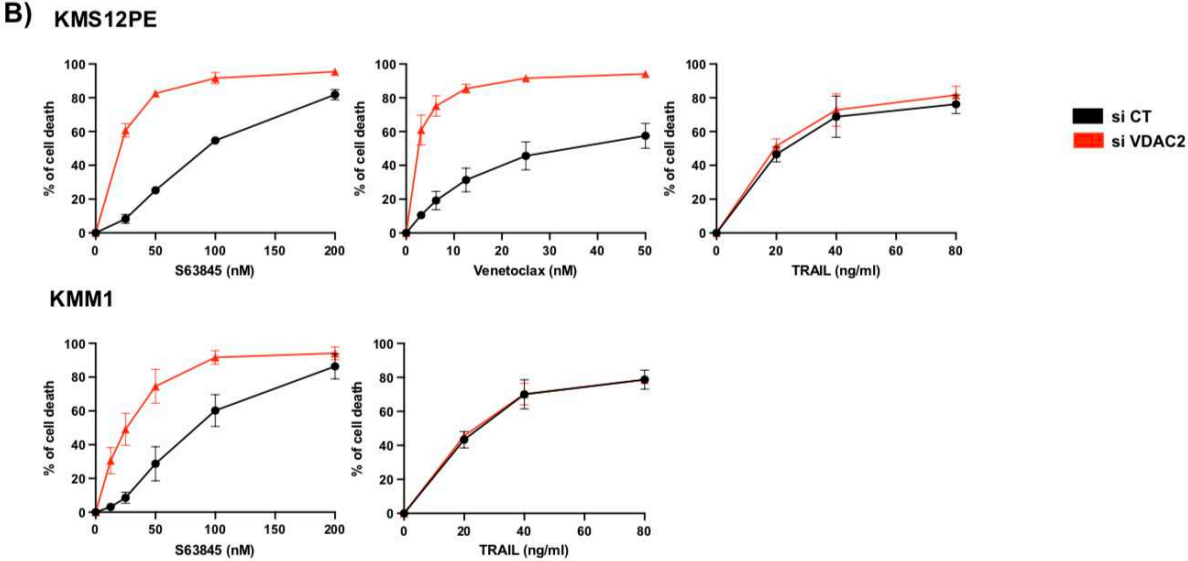
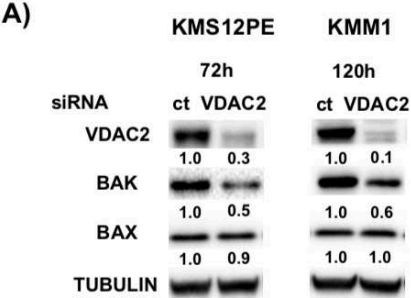
A)



B)

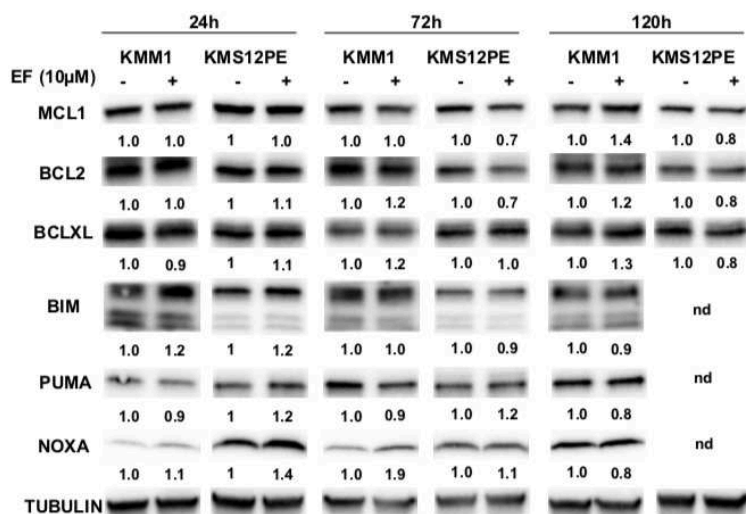


Supplementary Figure 3

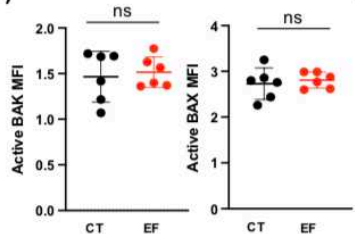


Supplementary Figure 4

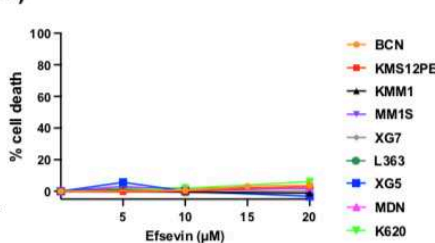
A)



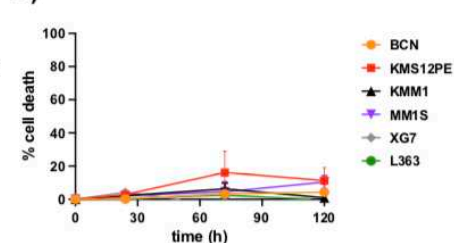
B)



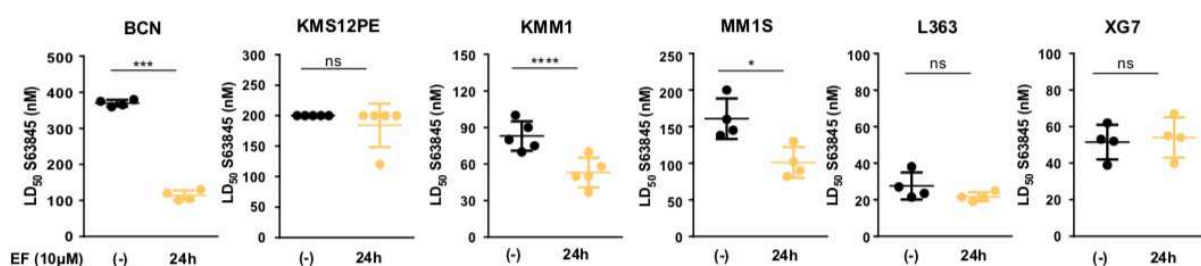
C)



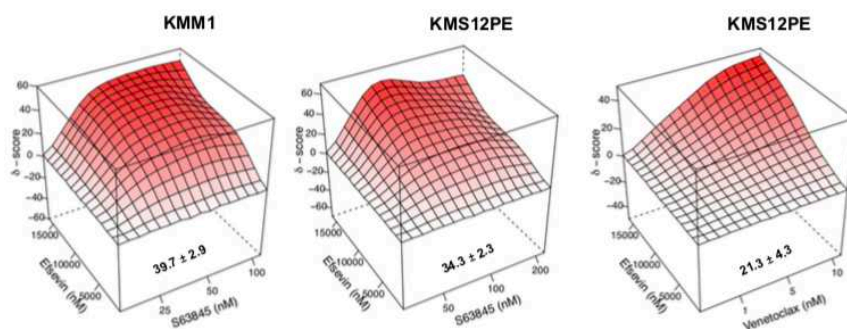
D)



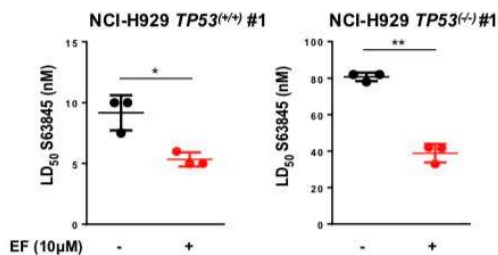
E)



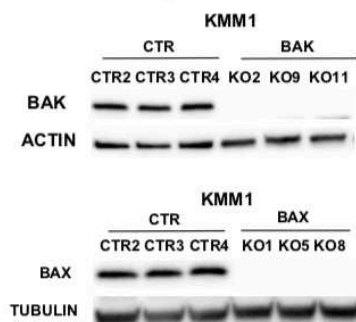
F)



G)



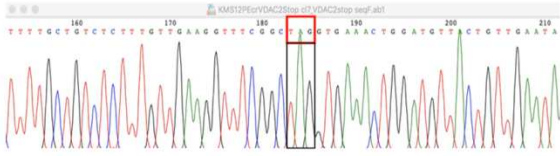
H)



Supplementary Figure 5

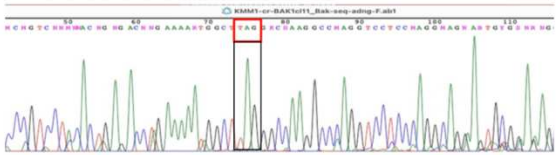
A)

| Gene targeted | dsDNA donor sequence |
|---------------|--|
| VDAC2 | 5' TCATTTTGTTCCTTTTGTGTCTC TTTGTGAAGGTTTCGGCTAGGTGAA ACTGGATGTGAAAACAAAGTCTTGCA GTGGCGTG-3' |



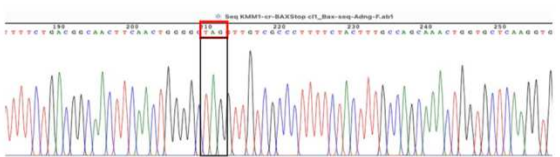
B)

| Gene targeted | dsDNA donor sequence |
|---------------|--|
| BAK1 | 5' CAGGCTGATCCCGTCCCTCCACTGA GACCTGAAAAATGGCTTAGGGCCAAG GCCCAGGTCCTCCAGGCAGGAGTGC GGAGAG-3' |



C)

| Gene targeted | dsDNA donor sequence |
|---------------|---|
| BAX | 5' -GGCAGCTGACATGTTTCTGA CGGCAACTTCAACTGGGGCTAGGTTG TCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAA CTGGTGCTCAAG-3' |



II) Ciblage de la protéine BCL-XL par le DT2216 dans les sPCL

Concernant les protéines MCL-1 et BCL-XL, le développement des BH3 mimétiques S63845 et A1155463 ciblant respectivement celles-ci n'ont pas montré de pertinence clinique pour cause de cardiotoxicité et de thrombocytopénie respectivement. C'est dans ce contexte que l'équipe m'a laissé l'opportunité de continuer le travail initié par le Dr Martine AMIOT et son étudiante en master 2 Alana SOLER sur un PROTAC ciblant la protéine anti apoptotique BCL-XL, le DT2216 afin d'évaluer sa potentielle utilisation clinique dans une pathologie particulière qu'est la leucémie secondaire à plasmocytes. Ce travail a contribué à la publication d'un article dans le journal *Frontiers in Oncology* en 2023, nommé « *BCLXL PROTAC degrader DT2216 targets secondary plasma cell leukemia addicted to BCLXL for survival* » (Champion et al., 2023).

Les travaux de l'équipe ont montré que la protéine BCL-XL joue un rôle clé dans la résistance à la mort cellulaire dans le MM et les PCL. À partir de la cohorte MYRACLE (Benaniba et al., 2019, étude NTC03807128), ils ont observé dans les échantillons de patients une augmentation de la dépendance à MCL-1 (de 33 % au diagnostic à 69 % à la rechute) et une légère hausse de la dépendance à BCL-XL non significative (de 10 % au diagnostic à 30 % à la rechute). BCL-XL a été identifié comme un facteur de résistance face au BH3-mimétique A1210477, qui recapture BAK et BIM lors du traitement (Gomez-Bougie et al., 2018). De plus, une combinaison de S63845 et de vénétoclax a montré un effet synergique, avec une réponse inversement corrélée à l'expression de BCL-XL. La surexpression de BCL-XL induit une résistance, tandis que son inhibition augmente la sensibilité. Ces résultats soulignent l'importance de cibler BCL-XL pour contrer cette résistance (Seiller et al., 2020).

Les leucémies à plasmocytes secondaires (sPCL) sont une forme rare de pathologie hématologique maligne, puisqu'elles surviennent après la rechute d'un MM. Malheureusement, ce groupe de patients présente des opportunités thérapeutiques très limitées et l'espérance de vie de ses patients dépasse rarement les 6 mois.

A partir de la cohorte MYRACLE, notre étude se base sur 13 échantillons de patients présentant une sPCL. Nous avons analysé leur sensibilité à deux BH3-mimétiques, le vénétoclax (ABT-199) qui cible BCL-2 ainsi que le A1155463 qui cible BCL-XL. Nous avons observé que 3 échantillons de patients étaient sensibles à l'ABT-199, 3 à l'A1155463 et les 7 autres étaient résistants aux deux drogues. Cette sensibilité des échantillons de sPCL à l'A1155463 a été confirmée par l'utilisation de la technique de BH3-profiling, puisque l'utilisation du peptide dérivé HRK-BH3 a permis d'observer la dépendance à BCL-XL. De ce fait, nous avons utilisé 4 échantillons de patients, deux étant sensibles et deux résistants à l'A1155463. Nous avons trouvé que les 4 échantillons avaient un fort priming mitochondrial global grâce à

l'utilisation du peptide dérivé de BIM, mais seulement deux avaient un fort priming pour BCL-XL, puisque le relargage de cytochrome c lu par cytométrie en flux était très élevé avec le peptide HRK-BH3.

Pour mieux comprendre cette réponse aux BH3-mimétiques, nous avons fait l'analyse DGE des 13 échantillons primaires de sPCL. Cette analyse de séquençage ARN, le 3'DGE sequencing, nous a donc permis de regarder l'expression génique des membres de la famille BCL-2 chez ces patients. Plus particulièrement, ce séquençage nous a permis de regarder l'expression génique de *BCL-2*, *MCL-1* et *BCL2L1* (le gène qui code pour la protéine BCL-XL).

Ainsi, nous avons observés que le niveau d'expression d'ARNm seul de *BCL-2* ne corrèle pas avec la réponse à l'ABT-199, mais que les ratios *BCL-2/BCL2L1*, *BCL-2/BCL2L1+MCL-1* ainsi que *BCL-2/MCL-1* sont corrélés avec la réponse à ce BH3-mimétique. Pour la réponse au A1155463, l'expression seule de *BCL2L1* corrèle avec la réponse au BH3-mimétique, ainsi que tous les autres ratios précédemment cités, *BCL2L1/MCL-1* étant le plus significatif.

Malheureusement, si 23% des échantillons de sPCLs ont répondu au A1155463, cette molécule, ciblant BCL-XL ne peut pas être utilisée en clinique car elle cause des problèmes de thrombocytopénie. Ceci est notamment expliqué par le fait que les plaquettes expriment beaucoup BCL-XL. Il est donc nécessaire de trouver un autre moyen de cibler BCL-XL qu'un BH3-mimétique. C'est pour cela que nous avons étudié le PROTAC BCL-XL, le DT2216. L'utilisation du DT2216 pourrait contrecarrer cette thrombocytopénie induite par les BH3-mimétiques ciblant BCL-XL car l'E3 ligase VHL est très peu exprimée par les plaquettes.

Nous avons montré qu'il existe une corrélation directe entre la réponse au A1155463 et au DT2216 dans 10 HMCLs et 4 sPCLs. Pour comprendre comment le DT2216 fonctionne, nous avons tout d'abord vérifié que les 10 HMCLs, ainsi que les sPCLs, expriment bien la protéine VHL. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le DT2216 est un PROTAC constitué de l'ABT-263 relié au ligand de l'E3 ligase VHL par un « linker ». Nous avons confirmé l'expression de la protéine VHL dans les échantillons, expression qui ne corrèle d'ailleurs pas avec la réponse au DT2216. Par la suite, nous avons vérifié l'efficacité de ce PROTAC. Nous avons confirmé que l'utilisation du DT2216 à plusieurs doses (de l'ordre du nM) permet de dégrader efficacement la protéine BCL-XL dans 4 HMCLs. De plus, nous avons montré que cette dégradation est spécifique de BCL-XL, puisque ni BCL-2 ni MCL-1 n'a vu son expression modifiée au cours du temps.

L'expression des protéines BCL-XL, MCL-1 et BCL-2 dans 10 HMCLs par Western Blot a confirmé qu'il existe une corrélation entre la sensibilisation au DT2216 des lignées et leur

niveau d'expression de BCL-XL, et non de MCL-1 et BCL-2. De plus, les ratios BCL-XL/MCL-1 et BCLXL/MCL-1+BCL-2 ont aussi montré une forte corrélation avec la réponse au DT2216.

Enfin, pour mieux comprendre le mécanisme mis en place lors de la dégradation de BCL-XL et la mort induite dans les cellules de MM, nous nous sommes intéressés au processus de mort du DT2216. Nous avons étudié ce mécanisme en prenant deux modèles, une lignée dérivée de sPCL (NAN12) très sensible au DT2216 et une autre lignée (XG7) complètement résistante. Nous avons observé dans la lignée NAN12, qui est sensible, que le traitement au DT2216 permettait un clivage des caspases 9 et 3 au cours du temps, ce que l'on n'observe pas dans la lignée XG7, résistante. C'est par la voie intrinsèque que la mort a été induite puisque le DT2216 a permis une activation à la fois de BAK, mais aussi de BAX. Cette activation a été observée par un marquage en cytométrie de flux en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement les formes activées des effecteurs.

Dans la lignée NAN12, nous avons observé l'activation des deux effecteurs, amenant à un relargage du cytochrome c important dans le cytosol. En revanche, dans la lignée XG7, il n'y a pas eu d'activation des effecteurs, ce qui n'a pas abouti au relargage de cytochrome c. Enfin, pour appuyer le message, nous avons réalisé une immunoprécipitation de BCL-XL dans la lignée NAN12. Cela a permis de montrer que les protéines BAK, BAX, mais aussi BIM, PUMA et BIK sont associées à BCL-XL dans cette lignée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le traitement par DT2216 permet de relarguer les facteurs pro-apoptotiques, notamment les BH3-only.

J'ai eu l'opportunité de présenter ce projet lors d'une communication orale au 1^{er} congrès ADBS de l'association des doctorants Nan'thèse à Nantes en 2023. Étant membre et responsable du pôle « communication scientifique » de cette association, j'ai eu l'opportunité d'organiser ce congrès en intégralité avec l'aide de 3 autres doctorants.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Alessandro Isidori,
AORMN Hospital, Italy

REVIEWED BY

Michele Malagola,
University of Brescia, Italy
Priyanka S. Rana,
Case Western Reserve University,
United States

*CORRESPONDENCE

Patricia Gomez-Bougie
✉ patricia.gomez@inserm.fr
Martine Amiot
✉ martine.amiot@inserm.fr

†These authors share senior authorship

RECEIVED 29 March 2023

ACCEPTED 27 June 2023

PUBLISHED 17 July 2023

CITATION

Champion O, Soler A, Maïga S, Bellanger C,
Pellat-Deceunynck C, Talbot A, Touzeau C,
Amiot M and Gomez-Bougie P (2023)

BCLXL PROTAC degrader DT2216 targets
secondary plasma cell leukemia addicted
to BCLXL for survival.

Front. Oncol. 13:1196005.

doi: 10.3389/fonc.2023.1196005

COPYRIGHT

© 2023 Champion, Soler, Maïga, Bellanger,
Pellat-Deceunynck, Talbot, Touzeau, Amiot
and Gomez-Bougie. This is an open-access
article distributed under the terms of the

[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or

reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

BCLXL PROTAC degrader DT2216 targets secondary plasma cell leukemia addicted to BCLXL for survival

Ophélie Champion¹, Alana Soler¹, Sophie Maïga^{1,2},
Céline Bellanger¹, Catherine Pellat-
Deceunynck^{1,2}, Alexis Talbot³, Cyrille Touzeau^{1,2†},
Martine Amiot^{1*†} and Patricia Gomez-
Bougie^{2*†}

¹Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers (CRCI2NA), Nantes, France, ²Département d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes, France, ³Département d'Immuno-hématologie, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Secondary plasma cell leukemia (sPCL) is a rare form of aggressive plasma cell malignancy arising mostly at end-stage refractory multiple myeloma and consequently presenting limited therapeutic options. We analyzed 13 sPCL for their sensitivity to BH3 mimetics targeting either BCL2 (venetoclax) or BCLXL (A1155463) and showed that 3 sPCL were efficiently killed by venetoclax and 3 sPCL by A1155463. Accordingly, BH3 profiling of 2 sPCL sensitive to BCLXL inhibition confirmed their high BCLXL primed profile. While targeting BCLXL using BH3 mimetics induces platelets on-target drug toxicity, the recent development of DT2216, a clinical-stage BCLXL proteolysis targeting chimera PROTAC compound, provides an alternative strategy to target BCLXL. Indeed, DT2216 specifically degrades BCLXL via VHL E3 ligase, without inducing thrombocytopenia. We demonstrated in human myeloma cell lines and sPCL that sensitivity to DT2216 strongly correlated with the sensitivity to A1155463. Interestingly, we showed that low doses of DT2216 (nM range) were sufficient to specifically degrade BCLXL after 48 hours of treatment, consistent with VHL expression, in all cell lines but irrespectively to DT2216 sensitivity. In myeloma cells, DT2216 induced apoptotic cell death and triggered BAX and BAK activation. In conclusion, our study demonstrated that patients with sPCL addicted to BCLXL, a small but a very challenging group, could potentially receive therapeutic benefit from DT2216. Clinical trials of DT2216 in this subset of sPCL patients are warranted.

KEYWORDS

plasma cell leukemia, BCL2 family, BCLXL degrader, PROTAC, DT2216, multiple myeloma

1 Introduction

Apoptosis is mainly controlled by BCL2 protein family members and occurred when BH3-only pro-apoptotic proteins are sufficient to restrain the anti-apoptotic counterparts (MCL1, BCL2 and BCLXL) and activate BAX and BAK effector proteins (1, 2). The mechanism by which BAX and BAK convert from inactive monomers to active oligomers is a multistep process involving both changes in conformation and cellular localization (3). Once BAX/BAK oligomerize and form pores, they induce the permeabilization of the outer mitochondrial membrane, leading to cytochrome c release and apoptosis. While evasion to apoptosis is a hallmark of cancer cells, hematologic cancer cells are often characterized by a high apoptotic priming, mostly due to the upregulation of BCL2 anti-apoptotic members, following selection pressures during malignant transformation (4). This feature highlights the interest of BH3 mimetics to therapeutically exploit the addiction to BCL2 anti-apoptotic proteins (5). Multiple myeloma is a very heterogeneous pathology, which is also manifested by its diverse addiction to the three main anti-apoptotic molecules such as BCL2, BCLXL and MCL1 for survival (6–8). The addiction on these anti-apoptotic proteins relies on their capacity to sequester and restrain their pro-apoptotic counterparts, mechanism that is favored by the overexpression of these pro-survival members observed in MM (7, 9). Of note, MM dependence on MCL1 and BCLXL for survival increases at relapse (8). To date, the only clinically available BH3 mimetic is venetoclax, which targets BCL2. However, targeting BCLXL and MCL1 leads to adverse events, such as thrombocytopenia and cardiotoxicity, respectively (10–12). Currently, proteolysis targeting chimera (ProTAC) technology allowed the development of a safe first-in-class drug DT2216, targeting BCLXL via the VHL E3 ligase (13). Indeed, DT2216 inhibits several xenograft tumors without inducing significant thrombocytopenia (13, 14) and it is currently in Phase 1 trials in relapsed/refractory malignancies (NCT04886622).

Secondary plasma cell leukemia (sPCL) is a rare but highly aggressive form of plasma cell dyscrasias, occurring in patients at a late and advanced stage of aggressive multiple myeloma. Since these patients are mostly refractory to conventional and novel therapies, they consequently have a dismal outcome and limited therapeutic options (15). Recently, the clinical activity of venetoclax has been reported in sPCL (16). Because BCLXL ProTAC degrader allows targeting BCLXL without inducing significant thrombocytopenia, we hypothesized that targeting BCLXL in sPCL could have a potential interest. In the current study, we demonstrated that a subgroup of sPCL exhibited a BCLXL primed profile and therefore could be selectively killed by DT2216. We then addressed the mechanism of action of DT2216 in myeloma cells with a particular attention on the activation of BAX and BAK.

2 Materials and methods

2.1 Primary plasma cells and human myeloma cell lines

After informed consent, blood samples from multiple myeloma patients were collected at the University Hospital of Nantes Department of Hematology (MYRACLE study; NTC03807128) (17). For the present study, inclusion criteria were adult man/woman, diagnosis of relapsed multiple myeloma, presence of circulating plasma cells ($\geq 5\%$). Blood from one patient (sPCL1) was collected at the department of Immuno-hematology of Saint-Louis Hospital (Paris). Cells from this patient were immortalized in our laboratory after being cultured in RPMI1640 with 5% FCS and 3ng/ml recombinant IL-6 and gave rise to NAN12 cell line.

Human myeloma cell lines (HMCLs, n=10) were extensively characterized as previously described (18). The XG5, XG7, MDN, NAN10 and NAN12 HMCLs were derived in our laboratory. The KMS12PE and KMM1 HMCLs were kindly provided by Dr. Otsuki (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan); KARPAS-620 (K620), by Dr. Karpas (Cambridge Clinical School, Cambridge UK); ANBL6 by Dr. Jelinek (Rochester, USA) and MM1S, by Dr. S. Rosen (Northwestern University, Chicago, USA).

2.2 Reagents and antibodies

Venetoclax (ABT-199) and A1155463 were purchased from Selleck Chemicals GmbH, DT2216 from Clinisciences. The following antibodies were used: BCL2 (Dako, M0887), BCLXL (2764S), BAX (2772), BAK (12105), PUMA (12450) and VHL (68547) from Cell Signaling, BCLXL (sc-271121), MCL1 (sc-12756), BIK (sc-10770) from Santa Cruz, ACTIN (MAB1501) and BIM (Ab17003) from Millipore.

2.3 Cell death assays

Mononuclear cells (MNC) were isolated from blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and immediately cultured in RPMI-1640 media with 5% fetal calf serum. Plasma cells were identified using CD138 staining (anti-CD138-PE, Beckman Coulter). MNC were incubated 24h with BCL2, BCLXL BH3 mimetics or DT2216 and an untreated condition was included as a control. After CD138 staining, cell death response was measured by the loss of CD138 expression, as previously described (8). Specific cell death was expressed as the percentage relative to the untreated control condition.

Cell death in HMCL was assessed using AnnexinV-FITC staining. Fluorescence acquisition and analysis were performed using a FACsCanto (Becton Dickinson) and FlowJo software.

2.4 Intracellular BH3 profiling and cytochrome c release

BH3 profiling was performed using the BIM BH3 derived peptide (0.1 mM), HRK BH3 derived peptide (10 mM) and the inert recombinant PUMA BH3-only peptide (PUMA2A) as negative control, as previously described (19). Briefly, cells were permeabilized with 0.004% Digitonin and exposed to peptides for 45 min at 27°C before fixation with 8% formaldehyde at room temperature for 15 min. After addition of neutralizing buffer (Tris 0.41 mol/L glycine pH 9.1) for 5 min, cells are stained with anti-cytochrome *c*-Alexa 647 (BLE612310, Ozyme) 1:40 in 0.1% Saponin/1%BSA/PBS overnight at 4°C. Loss of cytochrome *c* was analyzed by a flow cytometry. The quantification of cytochrome *c* loss induced by each peptide was analyzed by gating the cytochrome *c* negative population. For cytochrome *c* release, cells were treated with DT2216 for 15h, then permeabilized with 0.004% Digitonin and processed as in BH3 profiling.

2.5 Isolation of CD138 positive cells and Gene expression analysis

Plasma cells were isolated from the MNC fraction using CD138 immunomagnetic beads, MS columns and MACS™ Separator (Miltenyl Biotech) following manufacture's protocol. Briefly, cells were magnetically labeled with the CD138 immunomagnetic beads during 15 minutes at 4°C. The MS column was placed on the MACS™ Separator and pre-washed with MACS buffer. Then, cell suspension was loaded into the column and the flow-through fraction, containing the CD138 negative cells, was discarded. After 3 washes with MACS buffer, the column was removed from the separator. The retained cells were eluted as the CD138 + fraction.

Total RNA was obtained from purified CD138+ plasma cells using RNeasy mini kit (Qiagen). The mRNA expression of BCL2 family members was performed by 3'digital gene expression (DGE) RNA-sequencing protocol as previously described (20).

2.6 Immunoblotting and Immunoprecipitation

Cells were lysed for 40 minutes on ice in 0.5% NP40 containing buffer for immunoblotting or lysed in 1% Digitonin containing buffer for co-immunoprecipitation assays. Lysates were centrifugated at 12,000 X g for 30 min and supernatants were collected. Western blotting and immunoprecipitation reactions were performed as previously described (21). Protein expression levels were quantified using ImageLab and Image J software.

2.7 BAX and BAK activation

For the detection of active forms of BAX and BAK, 5×10^5 cells were treated with DT2216 or not. After incubation, cells were fixed

and permeabilized using the FOXP3 transcription factor staining buffer set (Thermo Fischer Scientific, 00-5523-00) following the manufacturer's recommendations. Cells were incubated with the following antibodies: BAX (clone 6A7, Santa Cruz, sc-23959), BAK (clone G317-2, BD Biosciences) and a mouse Ig G1 isotypic control (Miltenyl, 130-106-545) for 30 min. After washing, cells were incubated with the Alexa fluor 647 antibodies for 30 min, washed once in PBS and resuspended in PBS-1% formaldehyde. The flow cytometry acquisition and analysis were performed on a FACS Canto (Becton Dickinson) and FlowJo software, respectively.

2.8 Statistical analysis

Correlation was assessed by the Spearman correlation method, (*r*) and *p* values are indicated.

3 Results

3.1 Analysis of the sensitivity to BCL2 and BCLXL BH3 mimetics in primary sPCL

A cohort of 13 consecutive sPCL was analyzed for the sensitivity to BH3 mimetics targeting either BCL2 (ABT-199/venetoclax) or BCLXL (A1155463) (Table 1). The main molecular characteristics of sPCL were defined on the basis of DGE RNA sequencing profile and are summarized in Table 1. sPCL 4, 6 and 8 were only sensitive to venetoclax, sPCL 1, 5 and 11 were sensitive to A1155463 and the other 7 sPCLs were resistant to both BH3 mimetics (Table 1). Analysis of cell death in sPCL samples upon BH3 mimetics treatment is illustrated for sPCL1, sensitive to A1155463 and for the non-sensitive sPCL3 sample (Supplementary Figure 1). Additionally, sensitivity to A1155463 was paired with BH3 profiling using BIM-BH3 derived peptide, to evaluate the global priming and HRK-BH3 derived peptide, specific for BCLXL, in four sPCL samples; sPCL1 and sPCL5 were sensitive to A1155463 and sPCL6 and sPCL8 sensitive to venetoclax. This analysis showed 91 to 99% cytochrome *c* release after exposure to BIM-derived peptide in the four analyzed samples, reflecting their high capacity to undergo mitochondrial apoptosis, according to their sensitivity to the respective BH3 mimetic. However, only cells from sPCL1 and sPCL5 permeabilized their mitochondria upon the HRK-BH3 peptide (71 and 76% cytochrome *c* release, respectively), confirming the BCLXL primed profile of these samples (Figure 1A). In contrast, cells from sPCL6 and sPCL8 released 12 and 30% of cytochrome *c* upon exposure to HRK-BH3 peptide, in agreement with their resistance to A1155463 (Figure 1A).

We further analyzed the mRNA BCL2 family expression according to BH3 mimetics response. We found that *BCL2* mRNA levels did not correlated with venetoclax sensitivity in contrast to *BCL2/BCL2L1* ($p=0.0437$), *BCL2/BCL2L1+MCL1* ($p=0.0142$) and *BCL2/MCL1* ($p=0.0036$) mRNA ratios, the latter ratio correlated the best with venetoclax response, (Figure 1B). Of note, the sensitivity to A1155463 significantly correlated with

TABLE 1 *Ex vivo* sensitivity of sPCL cells to BH3 mimetics.

| sPCL characteristics | | | | Cell death % | |
|----------------------|---------|-----------------|--------|----------------|------------------|
| N° | Age/sex | Molecular group | Del17p | ABT199 (300nM) | A1155463 (300nM) |
| 1 | 57/F | MF | + | 0 | 59 |
| 2 | 66/F | MS | ND | 31 | 16 |
| 3 | 64/M | HD | ND | 22 | 4 |
| 4 | 69/F | CD2 | ND | 82 | 11 |
| 5 | 67/M | MF | + | 0 | 69 |
| 6 | 56/F | MS | + | 68 | 20 |
| 7 | 72/F | MF | – | 12 | 14 |
| 8 | 69/F | CD1 | – | 54 | 12 |
| 9 | 61/M | CD1 | + | 0 | 15 |
| 10 | 84/M | LB | ND | 15 | 39 |
| 11 | 69/F | CD2 | + | 38 | 73 |
| 12 | 48/M | LB | + | 0 | 30 |
| 13 | 36/M | LB | ND | 0 | 0 |

Blood mononuclear cells were treated with ABT199 (Venetoclax) or A1155463, both at 300 nM for 24 hours. The percentage of cell death was determined by the loss of CD138 staining. sPCL, secondary plasma cell leukemia; F, female; M, male; ND, not determined. Molecular groups were established as previously described (22).

BCL2L1 (coding for BCLXL) mRNA levels ($p=0.006$), though the ratio of *BCL2L1/MCL1* ($p=0.0018$) mRNA appeared the most potent marker associated with A1155463 sensitivity (Figure 1C). Nevertheless, the *MCL1* mRNA levels itself did not correlate with the sensitivity of any of both BH3 mimetics tested. (Supplementary Figure 2).

3.2 BCLXL Protac DT2216 efficiently degrades BCLXL in all myeloma cells

Since the sPCLs sensitive to A1155463 were venetoclax resistant, targeting BCLXL by the specific BCLXL Protac degrader DT2216 could be of interest for this particular sPCL subgroup. To study the specificity and the ability of DT2216 to degrade BCLXL, we took advantage of myeloma cell lines (HMCLs) and in particular of NAN12 cell line, which has been immortalized in presence of IL-6 from the sPCL1. Because DT2216 relies on Von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase to achieve BCLXL protein degradation, we first analyzed VHL expression in 10 HMCLs and CD138+ cells from 3 sPCL (1, 6 and 8). Due to alternative codon initiation, VHL protein is expressed as two isoforms of 18 and 24 kDa (23), which were detected in all HMCL tested ($n=10$), as well as in sPCL cells (Figure 2A). However, the levels of the VHL E3 ligase did not correlate with DT2216 sensitivity ($r=0.1593$, $p=0.604$) (Figure 2A, Supplementary Table 1), suggesting that cell death induced by DT2216 was not influenced by the level of expression of VHL protein. We next analyzed the degradation of BCLXL in 4 different cell lines treated with various doses of DT2216. After 48hrs of treatment, 20 to 50% of BCLXL was already degraded at 25nM DT2216, reaching a major degradation of at least 80% of BCLXL

observed at 150nM in all HMCLs tested (Figure 2B). Finally, we confirmed that DT2216 selectively degraded BCLXL, even after 72 hours at the dose of 150nM, without modifying the levels of *MCL1* or *BCL2* (Figure 2C).

3.3 DT2216 induces apoptosis in highly expressing BCLXL cells through BAX and BAK activation

We further compared the sensitivity to DT2216 and A1155463 in HMCLs ($n=10$) and primary cells from sPCLs (1, 6, 8 and 13). We found a strong and significant correlation between the sensitivity to these two compounds ($r=0.8699$, $p=0.0001$, Spearman test). Three cell lines (ANBL6, MM1S and NAN12) and 1 sPCL (sPCL1) were highly sensitive to DT2216 with LD_{50} values ranging from 15 to 100 nM (Figure 3A, Supplementary Table 1). Because 150nM of DT2216 almost completely degraded BCLXL (at least 80%) in all myeloma cells studied, only cells that were significantly killed at this dose or less were considered as BCLXL dependent. Moreover, DT2216 sensitive cells were resistant to venetoclax (Supplementary Table 1) and therefore dependent on BCLXL. One cell line (KARPAS 620) had a particular sensitivity profile characterized by an intermediate sensitivity to DT2216 ($LD_{50} = 231$ nM) and a high sensitivity to venetoclax ($LD_{50} = 5$ nM). This result indicates a co-dependence on BCLXL as well as BCL2, which may rely on its high BCL2 protein level (Figure 3B).

We also analyzed the expression of the main BCL2 anti-apoptotic proteins in relation to DT2216 response. DT2216 sensitive myeloma cells expressed the highest levels of BCLXL and moderate levels of either BCL2, *MCL1* or both. In

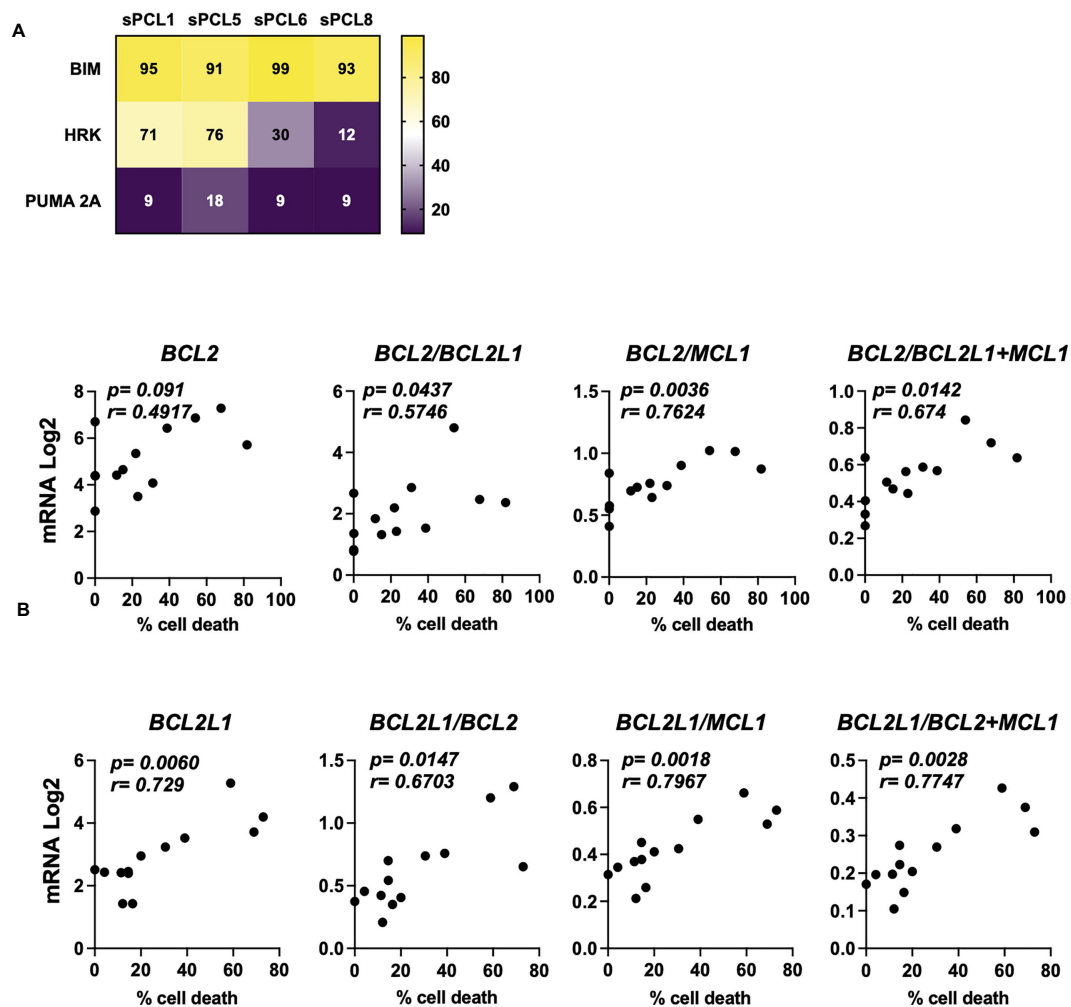


FIGURE 1

Characterization of BCL2 or BCLXL primed profile of sPCL. (A) BH3 profiling was performed exposing CD138 positive cells isolated from patient samples to BH3-derived peptides, values corresponded to the percentage of cytochrome *c* released and measured by flow cytometry. Bim peptide measures global priming, HRK peptide measures BCLXL dependence and PUMA 2A is an inert peptide. (B) Analysis of *BCL2*, *BCL2/BCL2L1*, *BCL2/MCL1* and *BCL2/BCL2L1+MCL1* mRNA seq expression according to venetoclax (300nM) cell death response in primary cells from sPCL (n=13). *BCL2L1* is the BCLXL coding gene. (C) Analysis of *BCL2L1*, *BCL2L1/BCL2*, *BCL2L1/MCL1*, *BCL2L1/BCL2+MCL1* mRNA seq expression according to A1155463 (300nM) cell death response in primary cells from sPCL (n=13). Correlation was assessed by Spearman test, *p* and *r* values are indicated.

opposition, resistant cells were characterized by a lower BCLXL and higher BCL2 and/or MCL1 protein expression (Figure 3B). We further demonstrated that DT2216 sensitivity strongly correlated with BCLXL protein expression ($r = -0.7496$, $p = 0.0067$) as well as the ratio of BCLXL/MCL1+BCL2 protein ($r = -0.7483$, $p = 0.007$) (Figure 3C). Although to a lesser extent, the protein ratio of BCLXL/MCL1 also correlated with induction of cell death by DT2216 ($r = -0.6224$, $p = 0.0347$), while no correlation was found with the ratio of BCLXL/BCL2. At the same time, neither BCL2 nor MCL1 showed any correlation with DT2216 cell death induction (Figure 3C). To go deeper into the mechanism of cell death induction by DT2216, we investigated its impact on the mitochondrial apoptotic pathway. Indeed, we demonstrated cytochrome *c* release (Figure 3D), caspase-9 and consequently caspase-3 activation under DT2216 treatment in sensitive NAN12 cells. In contrast, no caspase activation was observed in the resistant XG7 cell line (Figure 3E). Of note, using antibodies against the

conformational active forms of BAK and BAX, we demonstrated that upon DT2216 treatment both effectors were readily activated from 24hrs (27% BAK and 29% BAX) in NAN12 cells. Activation that clearly progressed at 36 hrs, since around 50% of cells displayed both activated forms. As expected, no activation of BAK or BAX was observed in the resistant XG7 cells (Figure 3F).

Finally, we investigated the nature of BCLXL complexes in the sensitive NAN12 cell line by co-immunoprecipitation assays. Our results revealed that BCLXL was complexed with both BH3-only (BIK, BIM) and effector proteins (BAX, BAK) (Figure 3G). Quantification of pro-apoptotic proteins before and after BCLXL immunoprecipitation indicated that 86% of BIK, 77% of BIM and around 50% of BAX and BAK effectors expressed in NAN12 were sequestered by BCLXL. Thus, these findings supported the activation of BAX and BAK effectors in DT2216 cell death induction, according to the unified model of the BCL2 members interaction (1)

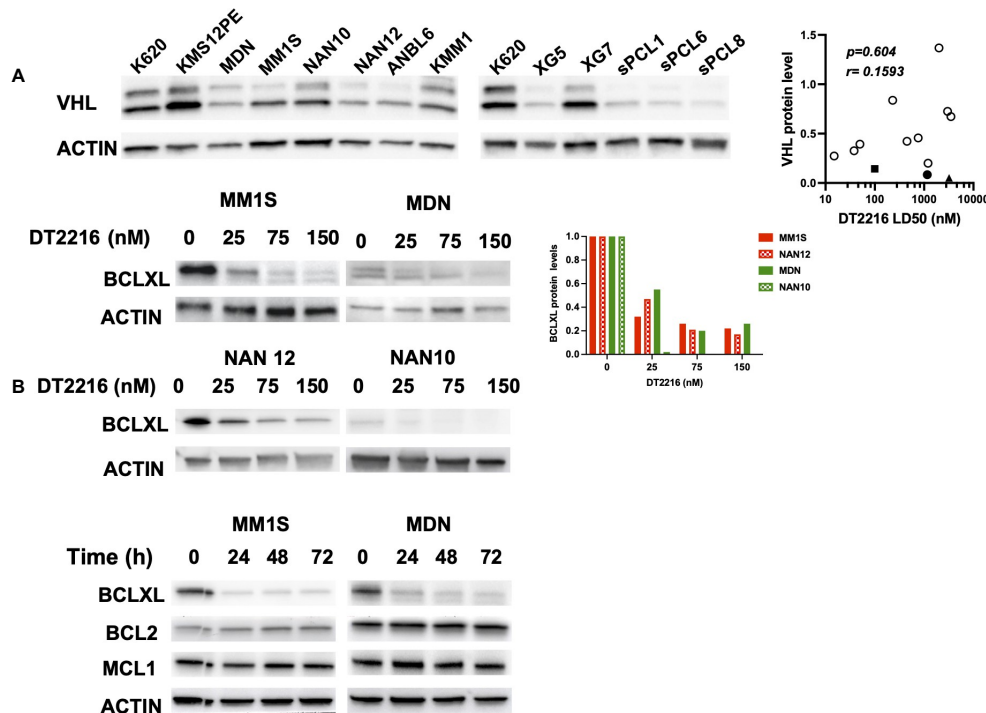


FIGURE 2

DT2216 selectively degrades BCLXL in myeloma cells. (A) Immunoblot of VHL expression in HMCLs (n=10) and CD138 (+) sPCL (n=3). KARPAS 620 (K620) cell lysate was included as an internal control. Results are representative of 2 independent experiments (left panel). VHL relative protein levels were quantified, normalized to actin and plotted against DT2216 LD50 values. Correlation was assessed by Spearman test, p and r values are indicated (right panel). (B) HMCLs were treated for 48h by DT2216 as indicated. Cell lysates were analyzed by western blot for BCLXL and Actin expression. BCLXL protein levels were quantified using Actin as a loading control. Results are representative of 2 independent experiments. (C) HMCLs were treated by DT2216 (150nM) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by western blot. Results are representative of 2 independent experiments.

4 Discussion

The present study demonstrates that the novel platelet-sparing BCLXL proteasome degrader, DT2216, selectively degrades BCLXL in all myeloma cells tested but only kills cells highly primed for BCLXL. The specificity of DT2216 is determined by the recruitment of BCLXL to VHL E3 ligase (13), which we found expressed in sPCL and HMCL cells analyzed. Nevertheless, the protein level of VHL E3 ligase did not correlate with DT2216 cell death induction, as already reported in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines (24). In contrast, BCLXL protein levels strongly correlated with DT2216 cell death, suggesting that the level of BCLXL protein expression dictates the sensitivity to DT2216 in tumor plasma cells. Accordingly, it has been demonstrated that T cell lymphoma cells expressing high BCLXL levels were highly sensitive to DT2216 (14). The same study found that high MCL1 expressing cells were resistant to DT2216, similarly to our results observed in XG7 MM cell line. These observations suggest that MCL1 could act as a brake for cell death induced by DT2216.

It is worth noting that low concentrations of DT2216 (nM range) were needed to induce myeloma cell death compared to the high doses used in solid tumor cells (25). Indeed, similar to our findings, low doses of DT2216 were found to kill BCLXL dependent T cell lymphomas *in vitro* and *in vivo* as well as T-cell acute lymphoblastic leukemia cells (13, 24). Whether high DT2216

sensitivity could be extended to other hematological cancers remains undefined.

Despite the low number of patient samples included in this study, the identification of a subgroup of sPCL addicted to BCLXL, but not to BCL2, for survival fully illustrated the importance of targeting BCLXL for these end-stage refractory patients with a dismal outcome (26). Additionally, our preliminary analysis of bone marrow samples from relapse/refractory MM patients showed that of the 22 samples analyzed, only 2 were sensitive to DT2216 (cell death $\geq 50\%$ at 150nM), suggesting that a small group of relapse/refractory MM patients are dependent on BCLXL and could potentially receive therapeutic benefit from DT2216. However, larger number of samples are needed to confirm this finding.

We could hypothesize that in DT2216 sensitive cells, the degradation of BCLXL could trigger the release of its bound counterparts, namely BH3-only proteins and BAX/BAK effectors. Thus, freed BH3-only proteins may in turn activate BAX and BAK (Mode 1). Not mutually exclusive, the release of BAX and BAK effectors from BCLXL may also lead to their activation (Mode 2), as already described (27, 28). The concomitant activation of BAX and BAK observed under DT2216 suggests the formation of BAX/BAK heterocomplexes at the mitochondria, as previously described in myeloma cells (20). Of note, we demonstrated that a major pool of BIK was bound to BCLXL in NAN12 sensitive cells, this BH3-only

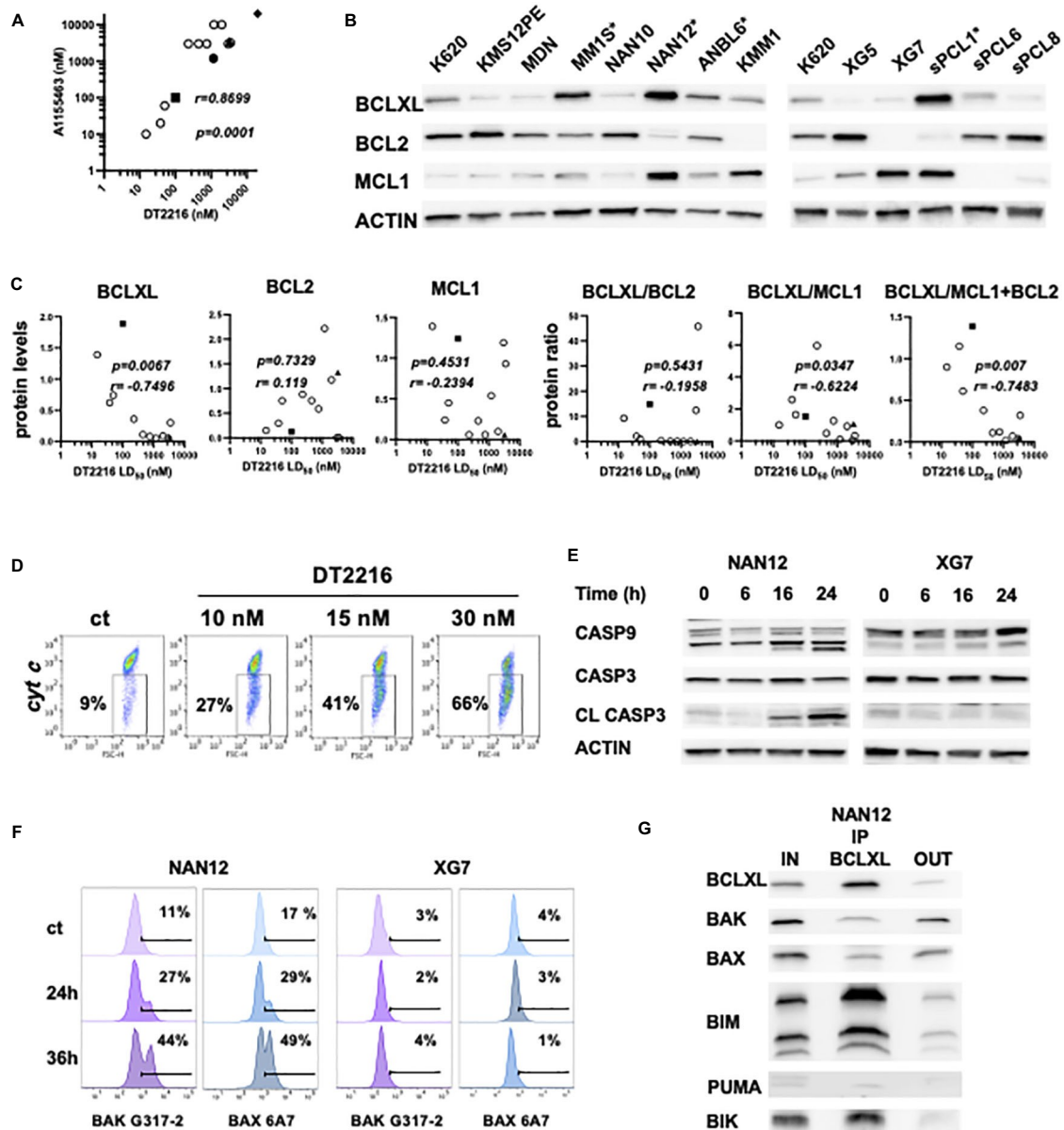


FIGURE 3
 DT2216 induces apoptosis in myeloma cells through BAK and BAX activation. (A) Sensitivity to DT2216 and A1155463 correlates in myeloma cells. DT2216 LD50 values were plotted versus A1155463 LD50 values in 10 HMCLs (empty circles) and 4 sPCLs (sPCL1=square; sPCL6=triangle; sPCL8=triangle and sPCL13=diamond). Correlation was assessed by Spearman test, *p* and *r* values are indicated. (B) BCLXL, BCL2 and MCL1 protein levels were analyzed by western blotting. KARPAS 620 (K620) cell lysate was included as an internal control. * DT2216 sensitive cells. (C) BCLXL, BCL2 and MCL1 protein levels were quantified and normalized to actin. DT2216 LD50 values were analyzed in function to relative protein levels and the protein ratio of BCLXL/BCL2, BCLXL/MCL1 and BCLXL/MCL1+BCL2. Correlation was assessed by Spearman test, *p* and *r* values are indicated. (D) NAN12 cells were treated by DT2216 for 15h, followed by an intracellular staining using an anti-cytochrome *c* mAb and analyzed by flow cytometry. The percentage of cells that released cytochrome *c* upon DT2216 is indicated. Results are representative of 2 independent experiments. (E, F) NAN12 and XG7 were treated for the indicated times with 15nM and 150nM DT2216, respectively. Cells were collected and analyzed by (E) western blotting or (F) stained with anti-BAK (G-317-2) and anti-BAX (6A7) mAb antibodies directed against their active forms. Results are representative of at least 3 independent experiments. (G) BCLXL Immunoprecipitation was performed in cell lysate from NAN12 cell line. Unbound proteins (OUT) were quantified and compared to total lysates (IN). Results are representative of 2 independent experiments.

protein, long described as a sensitizer, is now considered as direct activator of BAX and BAK (29, 30).

Of samples that were sensitive to venetoclax, sPCL 4 and sPCL 8 belonged to CD-2 and CD-1 molecular groups, which are characterized by an over-expression of CCND1 and the presence of t(11;14) (22). Indeed, several studies demonstrated the potential

clinical use of venetoclax in MM patients harboring t(11;14) (31–33). Furthermore, the likelihood of a clinical response was associated with high BCL2/MCL1 and BCL2/BCL2L1 mRNA ratios (31, 32). Accordingly, we confirmed the role of MCL1 as a resistance factor for venetoclax response in our cohort of sPCL. Interestingly, our results propose that in sPCL, MCL1 could also

play a role in resistance to BCLXL targeting. Of note, the gene coding for MCL1 is located in 1q21, region frequently amplified in MM (34).

Because previous studies demonstrated that the functional evaluation of venetoclax sensitivity predicts clinical response (33), we can expect that the functional evaluation of DT2216 sensitivity could also predict the clinical response of sPCL to DT2216. From our results, we conclude that this functional *ex vivo* assays, rapidly and easily analyzed by flow cytometry after 48 hours DT2216 treatment, will be the mandatory partner of personalized approach and represents the missing link between omic data of an individual and clinical application for each patient. Besides the interest of DT2216 to target cancer cells that rely on BCLXL for survival, it was recently shown that DT2216 could improve cancer immunotherapy by eliminating regulatory T cells (Tregs) (35). Thus, the study of Kolb et al. broadens the potential use of BCLXL protect degrader, which is already under clinical trials (NCT04886622).

Finally, even if sPCL addicted to BCLXL remains a small yet a very challenging group of patients, DT2216 appears an additional weapon that merits a clinical evaluation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by University Hospital of Nantes (MYRACLE study; NTC03807128). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

OC, AS, SM and CB performed experiments and participated in the design of the study. AT provided patient samples. CP-D

participated in the design of the study and reviewed the paper, CT provided patient samples and reviewed the paper, PG-B and MA performed experiments, designed the study and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by H e M A NExT (ANR-16-IDEX-0007) and R e g i o n Pays de la Loire.

Acknowledgments

We thank the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for expert technical assistance and Dr Jill Corre (Institut Universitaire du Cancer, Toulouse, France) for the identification of NAN12 translocation.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

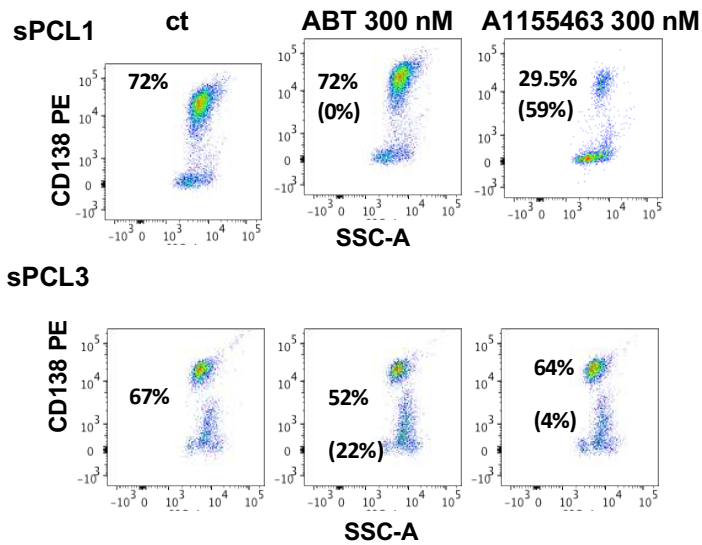
Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1196005/full#supplementary-material>

References

1. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, et al. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* (2011) 44:517–31. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.001
2. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* (2018) 25:65–80. doi: 10.1038/cdd.2017.186
3. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ* (2018) 25:46–55. doi: 10.1038/cdd.2017.179
4. Potter DS, Letai A. To prime, or not to prime: that is the question. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2016) 81:131–40. doi: 10.1101/sqb.2016.81.030841
5. Ni Chonghaile T, Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* (2008) 27:S149–57. doi: 10.1038/onc.2009.52
6. Gong JN, Khong T, Segal D, Yao Y, Rifkin CD, Garnier JM, et al. Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood* (2016) 128:1834–44. doi: 10.1182/blood-2016-03-704908
7. Punnoose EA, Levenson JD, Peale F, Boghaert ER, Belmont LD, Tan N, et al. Expression profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 predicts pharmacological response to the BCL-2 selective antagonist venetoclax in multiple myeloma models. *Mol Cancer Ther* (2016) 5:1132–44. doi: 10.1158/1535-7163

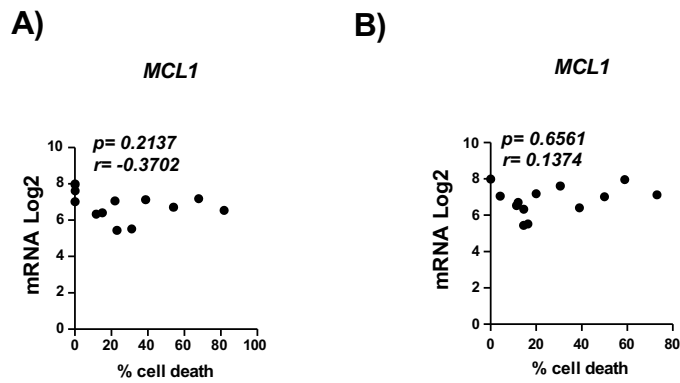
8. Gomez-Bougie P, Maiga S, Tessoulin B, Bourcier J, Bonnet A, Rodriguez MS, et al. BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment. *Blood* (2018) 132:2656–69. doi: 10.1182/blood-2018-03-836718
9. Sarosiek KA, Letai A. Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise. *FEBS J* (2016) 283(19):3523–33. doi: 10.1111/febs.13714
10. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* (2012) 30:488–96. doi: 10.1200/JCO.2011.34.7898
11. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol* (2021) 14:67. doi: 10.1186/s13045-021-01079-1
12. Thomas RL, Roberts DJ, Kubli DA, Lee Y, Quinsay MN, Owens JB, et al. Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes Dev* (2013) 27:1365–77. doi: 10.1101/gad.215871.113
13. Khan S, Zhang X, Lv D, Zhang Q, He Y, Zhang P, et al. A selective BCL-X_L PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat Med* (2019) 12:1938–47. doi: 10.1038/s41591-019-0668-z
14. He Y, Koch R, Budamagunta V, Zhang P, Zhang X, Khan S, et al. DT2216-a bcl-xL-specific degrader is highly active against bcl-xL-dependent T cell lymphomas. *Hematol Oncol* (2020) 13:95–108. doi: 10.1186/s13045-020-00928-9
15. Gowing K, Skerget S, Keats JJ, Cowan AJ. Plasma cell leukemia: a review of the molecular classification, diagnosis, and evidenced-based treatment. *Leukemia Res* (2021) 111:106687. doi: 10.1016/j.leukres.2021.106687
16. Kupsh A, Arnall J, Voorhees J. A successful case of venetoclax-based therapy in relapsed/refractory secondary plasma cell leukemia. *Oncol Pharm Pract* (2020) 5:1274–78. doi: 10.1177/1078155219895072
17. Benaniba L, Tessoulin B, Trudel S, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Minvielle S, et al. The MYRACLE protocol study: a multicentric observational prospective cohort study of patients with multiple myeloma. *BMC Cancer* (2019) 19:855. doi: 10.1186/s12885-019-6080-8
18. Maïga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A* (2015) 87:285–88. doi: 10.1002/cyto.a.22643
19. Dousset C, Maïga S, Gomez-Bougie P, Le Coq J, Touzeau C, Moreau P, et al. BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br J Haematol* (2017) 179:684–88. doi: 10.1111/bjh.14251
20. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoelen C, Descamps G, et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis* (2020) 11:316. doi: 10.1038/s41419-020-2505-1
21. Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, Bataille R, Amiot M. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of mcl-1 and bim and a decrease in the mcl-1/Bim complex. *Oncogene* (2005) 24:8076–89. doi: 10.1038/sj.onc.1208949
22. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* (2006) 108(6):2020–8. doi: 10.1182/blood-2005-11-013458
23. Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. A second major native von hippel-lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1998) 95:8817–22. doi: 10.1073/pnas.95.15.8817
24. Jaiswal A, Jaiswal A, Williamson EA, Gelfond J, Zheng G, Zhou D, et al. Resistance to the BCL-XL degrader DT 2216 in T-cell acute lymphoblastic leukemia is rare and correlates with decreased BCL-XL proteolysis. *Cancer Chemother Pharmacol* (2023) 91:89–95. doi: 10.1007/s00280-022-04490-8
25. Khan S, Wiegand J, Zhang P, Hu W, Thummuri D, Budamagunta V, et al. BCL-X_L PROTAC degrader DT2216 synergizes with sotorasib in preclinical models of KRAS^{G12C}-mutated cancers. *J Hematol Oncol* (2022) 15:23. doi: 10.1186/s13045-022-01241-3
26. Tuazon SA, Holmberg LA, Nadeem O, Richardson PG. A clinical perspective on plasma cell leukemia: current status and future directions. *Blood Cancer J* (2021) 11:23. doi: 10.1038/s41408-021-00414-6
27. Lee EF, Grabow S, Chappaz S, Dewson G, Hockings C, Kluck RM, et al. Physiological restraint of bak by bcl-xL is essential for cell survival. *Genes Dev* (2016) 30:1240–50. doi: 10.1101/gad.279414.116
28. O'Neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y, Luo X. Inactivation of pro-survival bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev* (2016) 30:973–88. doi: 10.1101/gad.276725.115
29. Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, Kuwana T. BH3 domains other than bim and bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem* (2011) 286:491–501. doi: 10.1074/jbc.M110.167148
30. Dai H, Ding H, Peterson KL, Meng XW, Schneider PA, Knorr KL, et al. Measurement of BH3-only protein tolerance. *Cell Death Differ* (2018) 25:282–93. doi: 10.1038/cdd.2017.156
31. Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, Dousset C, Descamps G, Maïga S, et al. Pellat-deceunynck c, amiot m. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* (2011) 118:3901–10. doi: 10.1182/blood-2010-11-317438
32. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11, 14) multiple myeloma. *Blood* (2017) 130:2401–9. doi: 10.1182/blood-2017-06-788786
33. Matulis SM, Gupta VA, Neri P, Bahlis NJ, Maciag P, Levenson JD, et al. Functional profiling of venetoclax sensitivity can predict clinical response in multiple myeloma. *Leukemia* (2019) 33:1291–96. doi: 10.1038/s41375-018-0374-8
34. Barwick B, Gupta V, Vertino PM, Boise LH. Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Front Immunol* (2019) 10:1121. doi: 10.3389/fimmu.2019.01121
35. Kolb R, De U, Khan S, Luo Y, Kim MC, Yu H, et al. Proteolysis-targeting chimera against BCL-X_L destroys tumor-infiltrating regulatory T cells. *Nat Commun* (2021) 12:1281–89. doi: 10.1038/s41467-021-21573-x



Supplementary Figure 1.

BH3 mimetics *ex vivo* testing of sPCL samples

Mononuclear cells obtained from sPCL1 and sPCL3 were cultured in the presence of ABT-199 (300nM), A1155463 (300nM) or untreated (control condition) for 24h. Cells were then stained with anti-CD138-PE mAb. Tumor plasma cell death was assessed by the loss of CD138 expression. The percentage of CD138 positive cells in each condition after 24h of culture is indicated. Specific cell death for each BH3 mimetic was calculated relative to control (ct) and is indicated in brackets.



Supplementary Figure 2.

MCL1 mRNA levels did not correlated with either Venetoclax or A1155463 cell death response in sPCL samples.

Analysis of *MCL1* mRNA expression according to A) venetoclax (300 nM) and B) A1155463 (300nM) cell death response. Correlation was assessed by Spearman test, p and r values are indicated.

| HMCL/sPCL | Translocation | Target Genes | LD ₅₀ (nM) | | |
|------------|---------------|--------------|-----------------------|----------|--------|
| | | | ABT199 | A1155463 | DT2216 |
| KARPAS 620 | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | 5 | 3000 | 231 |
| KMS12PE | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | 15 | > 10000 | 2000 |
| MDN | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | 3 | 3000 | 450 |
| NAN10 | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | 350 | > 3000 | 800 |
| XG5 | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | 5 | > 10000 | 1200 |
| KMM1 | t(6 ;14) | <i>CCND3</i> | 5000 | > 4000 | > 4000 |
| MM1S | t(14 ;16) | <i>c-Maf</i> | 4000 | 20 | 38 |
| ANBL6 | t(14 ;16) | <i>c-Maf</i> | 5500 | 60 | 50 |
| XG7 | t(4 ;14) | <i>MMSET</i> | 5000 | > 3000 | > 3000 |
| NAN12 | t(14 ;20) | <i>MafB</i> | 2000 | 10 | 15 |
| sPCL1 | t(14 ;20) | <i>MafB</i> | n.d. | 100 | 100 |
| sPCL6 | t(4 ;14) | <i>MMSET</i> | n.d. | 1200 | 1160 |
| sPCL8 | t(11 ;14) | <i>CCND1</i> | n.d. | 3500 | 3200 |
| sPCL13 | n.d. | n.d. | n.d. | >20000 | >20000 |

Supplementary Table 1

For human myeloma cell lines (HMCL), cell death was determined after 24 hours of ABT199 (Venetoclax) or A1155463 treatment or after 48 hours of DT2216 treatment. Cell death was assessed by flow cytometry after Annexin V staining. Values corresponded to the mean of at least 3 independent experiments. For sPCL samples, cell death was assessed by the loss of CD138 expression, as presented in Supplementary Figure 1. Target genes were previously defined (36). n.d. (not determined).

Reference Supplementary Table 1

Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, Goldschmidt H, Jauch A, Rème T, Jourdan M, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Hematologica* (2011) 96(4):574-82. doi: 10.3324/haematol.2010.033456

DISCUSSION et PERSPECTIVES

I) VDAC2 prime les cellules myélomateuses à l'apoptose dépendante de BAK en stabilisant BAK et non BAX et représente une nouvelle cible thérapeutique

Les protéines VDACs sont responsables du passage des ions et des métabolites à travers la MOM. Ce sont les protéines les plus abondantes à la MOM. Leur rôle est donc essentiel dans l'homéostasie cellulaire (Heslop et al., 2021). Cheng et ses collaborateurs ont d'ailleurs mis en évidence que VDAC2 est une protéine essentielle dans l'homéostasie cellulaire et le développement puisque les souris dépourvues en VDAC2 meurent à l'état embryonnaire (Cheng et al., 2003).

Dans le contexte du cancer, l'expression et la valeur pronostique de VDAC2 varient en fonction du type de cancer. Dans des tumeurs épithéliales humaines de la thyroïde, on retrouve une surexpression de la protéine VDAC2 en comparaison à des cellules thyroïdiennes normales (Mato et al., 2015). Une autre étude compare des tissus d'adénomes folliculaires et des tissus de thyroïde normaux. Leur analyse protéomique révèle 114 protéines biomarqueurs candidates de ce cancer, dont VDAC2 figure dans le top 5 (Lai and Chen, 2015). Enfin, Zhou et ses collaborateurs ont réalisé des immunohistochimies sur des échantillons de glioblastomes montrant que l'expression de VDAC2 est inversement corrélée avec les grades de la maladie (avec le plus petit grade ayant la plus forte expression de VDAC2). De plus, ils montrent que les patients ont une plus faible survie globale quand ils ont une faible expression de VDAC2 (Zhou et al., 2018). En parallèle, deux études montrent un rôle contraire de VDAC2. En effet, dans le cancer de l'endomètre, une étude montre qu'une forte expression protéique de VDAC2 est prédictive d'une faible survie globale (Józwiak et al., 2020). Enfin, une étude plus récente sur le NSCLC montre qu'une forte expression du gène VDAC2 est associée avec un mauvais pronostic, et que l'expression de VDAC2 est d'autant plus forte dans les stades avancés de la maladie (Ma et al., 2024).

En plus d'observer l'expression de VDAC2 dans des cellules cancéreuses, VDAC2 semble une cible très intéressante dans le cancer. Une étude a démontré que lorsque l'on fait un CRISPR screen sur des cellules où l'on inhibe de manière directe ou indirecte MCL-1 (CRISPRi), VDAC2 ainsi que BCL2L1 (BCL-XL) font partis de la liste des gènes significativement enrichis après inhibition de MCL-1 dans des cellules cancéreuses du poumon (Kabir et al., 2019).

Notre étude permet de mettre en avant que l'expression de VDAC2 pourrait être utilisée comme valeur pronostique dans le MM. En effet, nous avons mis en évidence grâce à la cohorte MMRF-CoMMpass qu'une faible expression de VDAC2 est associée à une moins bonne OS des patients atteints de MM. Or, un résultat clé dans notre étude a été de montrer dans 2 lignées de MM que la perte de la protéine VDAC2 entraîne une diminution drastique de la protéine BAK, protéine essentielle dans l'induction de l'apoptose. Cela suggère que des niveaux plus élevés de VDAC2 pourraient garantir des niveaux adéquats de BAK dans ces échantillons de patients. Cependant, le gène codant pour VDAC2 est situé sur le chromosome 10, qui n'est pas typiquement associé à des anomalies chromosomiques dans le MM (**Introduction, I, b.**). Par conséquent, la cause de l'expression hétérogène de VDAC2 dans les cellules de MM reste inconnue.

VDAC2 est un membre de la famille VDAC qui facilite l'importation mitochondriale de BAK et BAX (**Naghdi et al., 2015**), jouant ainsi un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose. Bien qu'il existe des preuves suggérant que VDAC2 contrôle de manière différentielle BAX et BAK, le mécanisme sous-jacent reste incomplètement compris. En utilisant l'inactivation par CRISPR/Cas9 de VDAC2 dans des cellules de myélome présentant un statut p53 anormal, KMM1 et KMS12PE, nous avons démontré que VDAC2 contrôle la stabilité de BAK, mais pas celle de BAX. Les cellules VDAC2-KO présentent une réduction drastique de la protéine BAK, alors que les niveaux protéiques de BAX ne sont pas affectés. Bien que moins prononcée, d'autres études avaient déjà rapporté une réduction des niveaux protéiques de BAK dans les MEFs déficientes en VDAC2. Cela s'explique par le fait que VDAC2 stabilise BAK, sans pour autant démontrer le mécanisme sous-jacent (**Cheng et al., 2003**).

Roy et ses collègues ont rapporté que la voie apoptotique était altérée suite à la réduction de la protéine BAK dans les MEFs déficientes en VDAC2 (**Roy et al., 2009**). Ils ont proposé que la réduction des niveaux de BAK était due à un ciblage inefficace de BAK à la mitochondrie plutôt qu'à une dégradation accrue du protéasome, puisque les niveaux de BAK n'ont pas été restaurés par le traitement au MG-132. En accord avec cette étude, nous avons démontré que l'inhibition du protéasome seule était insuffisante pour restaurer les niveaux de BAK. En revanche, nous montrons pour la première fois que l'inhibition combinée des voies lysosomales et des voies du protéasome restaure les niveaux de BAK dans les cellules de MM VDAC2-KO.

De plus, afin de confirmer le rôle de VDAC2 dans la stabilité de BAK, nous avons utilisé un inhibiteur de la synthèse protéique, la CHX. Dans la littérature, il n'existe aucune donnée sur la demi-vie de la protéine BAK. Il semble donc que celle-ci soit longue. Dans les cellules de

MM, nous montrons que même après 24h de traitement à la CHX, le protéine BAK reste stable, et augmente même légèrement dans les cellules CTR. En revanche, dans les cellules VDAC2-KO, le peu de protéine BAK restant est très vite dégradé, permettant d'obtenir une demi-vie à environ 10h. VDAC2 semble donc jouer un rôle dans la stabilité de BAK, puisqu'en son absence, BAK est dégradé par les lysosomes et le protéasome.

Ce rôle de VDAC2 dans la stabilité des effecteurs fait lien avec son rôle dans leur localisation cellulaire. En effet, de précédentes études ont montré que VDAC2 était une plateforme pour la rétrotranslocation de BAX (Lauterwasser et al., 2016), mais aussi que cette protéine permettait l'ancrage de BAK à la mitochondrie (Lazarou et al., 2010 ; Roy et al., 2009). Mon travail de thèse a permis de confirmer le rôle de VDAC2 dans la localisation cellulaire de BAX. En effet, nous avons observé dans les cellules de MM VDAC2-KO qu'il y a une redistribution de BAX, à la fois au cytosol et à la mitochondrie, alors que dans les cellules CTR on le retrouve majoritairement à la mitochondrie. Étant donné que BAX doit se situer à la MOM pour induire l'apoptose, VDAC2 semble être essentiel pour sa translocation vers la mitochondrie. En revanche, concernant la localisation de BAK, nous n'avons pas confirmé le rôle de VDAC2 dans sa localisation. En effet, suite à la perte drastique de la protéine BAK dans les cellules VDAC2-KO, nous avons montré que la faible quantité de BAK restante est exclusivement à la mitochondrie. Nous pouvons conclure de notre étude que VDAC2, dans les cellules de MM, est nécessaire en partie pour la localisation mitochondriale de BAX, et est nécessaire pour la stabilisation de la protéine BAK et non sa localisation.

La découverte d'une corrélation directe entre les niveaux de protéines VDAC2 et BAK, mais pas entre les niveaux de VDAC2 et BAX dans les cellules de MM, bien qu'elle n'ait jamais été rapportée dans d'autres modèles cellulaires, renforce l'idée que VDAC2 est nécessaire pour la fonction de BAK. En accord avec un travail précédent, nous avons démontré une interaction endogène entre BAK et VDAC2 dans des fractions mitochondriales enrichies (Cheng et al., 2003). Cette corrélation entre les niveaux protéiques de VDAC2 et BAK est aussi retrouvée sur les niveaux d'ARNm, puisque nous avons montré que cette corrélation existe pour 17 HMCLs. De plus, cette corrélation entre les niveaux d'ARNm de VDAC2 et BAK1 est aussi présente dans la cohorte MMRF-CoMMpass, alors que VDAC2 et BAX ne sont toujours pas corrélés. Bien que cette corrélation soit modérée, ce résultat renforce la relation fonctionnelle entre VDAC2 et BAK dans la régulation de l'apoptose et suggère que leur expression peut être partiellement régulée par une voie commune. Cependant, la régulation transcriptionnelle de VDAC2 n'est pas encore bien comprise. Étant donné qu'il existe de nombreux variants de transcrits de chaque VDAC (Introduction III), a. 2.), cela suggère qu'il existe plusieurs mécanismes de régulation spécifiques (Messina et al., 1999 ; Sampson et al., 1996). Tous

les gènes VDACS de la souris et de l'Homme sont dépourvus d'éléments TATA-box, montrant au contraire un enrichissement du contenu en GC. Le promoteur murin prédit de VDAC2 présente le niveau d'activation transcriptionnelle le plus élevé (Mj et al., 1997). Ce n'est que récemment que les promoteurs des gènes VDACS humains ont été étudiés pour mettre en évidence leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles (Zinghirino et al., 2020). Zinghirino et son équipe ont montré que le promoteur du VDAC3 a l'activité transcriptionnelle la plus élevée et que le promoteur du VDAC1 est, en revanche, le moins actif (Zinghirino et al., 2020). Plus récemment, ils ont montré qu'il existe dans le promoteur de VDAC2 humain un site d'initiation non canonique appelé « le motif TCT/TOP », qui est une cible de la régulation de la traduction par la voie mTOR, le stress oxydatif et métabolique (Zinghirino et al., 2021). Ils ont aussi constaté qu'une forte méthylation est associée au promoteur de VDAC2, au corps du gène et à la région du gène en aval, alors que pour VDAC1 et VDAC3, le statut de méthylation du promoteur peut être absent (Zinghirino et al., 2021).

En plus de cette régulation transcriptionnelle, une étude mentionne les régulations post-traductionnelles qu'il existe chez les protéines VDACS (Pittalà et al., 2021). En raison des difficultés expérimentales liées à leur caractérisation structurelle, les modifications post-traductionnelles des protéines VDACS représentent un domaine peu exploré. Les auteurs ont montré que la séquence du VDAC2 humain contient une méthionine interne conservée (Met166) et une autre spécifiquement retrouvée chez l'Homme (Met12). Ces résidus sont partiellement oxydés en MetO, permettant ainsi la consommation de ROS. Ils ont aussi montré qu'il y a 3 résidus cystéines (Cys8, Cys13, et Cys133) qui sont uniquement retrouvés sous forme réduite, pouvant permettre de former des ponts disulfures. Enfin, des sites de phosphorylation ont été identifiés dans la séquence VDAC2 du rat, mais pour le moment aucune donnée n'existe sur le VDAC2 humain (Pittalà et al., 2021). La régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de VDAC2 semblent donc importantes pour la compréhension de la corrélation existant avec BAK ; et mériteraient d'être explorées dans certaines pathologies, comme dans le MM.

Un autre résultat clé de notre étude a été de montrer que VDAC2 contrôle le priming mitochondrial dans les cellules de MM, puisque les cellules VDAC2-KO ont radicalement perdu le priming global et les dépendances spécifiques à MCL-1 et BCL-2. La raison principale de la perte du priming mitochondrial dans les cellules VDAC2-KO pourrait être la perte de BAK, puisque les cellules BAK-KO ont récapitulé cette découverte. Des travaux antérieurs utilisant différents modèles d'extinction de VDAC2 ont montré des résultats contrastés sur la fonction de ce canal, certaines études ne montrant aucun rôle, un antagonisme ou même une promotion de la réponse apoptotique (**Introduction, III** c. 2. i.). En effet, si Cheng démontre

que VDAC2 inhibe l'apoptose BAK dépendante en séquestrant BAK sous sa forme inactive, Setoguchi et Roy démontrent que VDAC2 est tout de même nécessaire pour l'ancrage de BAK à la MOM. Néanmoins, Baines réfute l'hypothèse que VDAC2 fait partie du PTP puisqu'il ne semble pas obligatoire dans l'induction de la MOMP et le relargage *in fine* de cytochrome c (Baines et al., 2007 ; Cheng et al., 2003 ; Roy et al., 2009 ; Setoguchi et al., 2006).

Pour mieux comprendre ces différences, nous avons transitoirement réduit au silence VDAC2 par des siRNA dans les cellules MM, ce qui n'a pas modifié l'expression de BAK mais a conduit à une augmentation du priming mitochondrial et, par conséquent, à une augmentation de la réponse apoptotique. En revanche, une extinction plus longue, pendant 5 jours, a permis de récapituler l'effet des cellules VDAC2-KO puisque l'on observe une diminution de l'expression de la protéine BAK. De plus, des données préliminaires nous suggèrent que cette diminution par siRNA à long terme perturbe le priming mitochondrial vers une diminution à la fois du priming mitochondrial global, mais aussi des dépendances à MCL-1 et BCL-2. Ces résultats contrastés suggèrent que les niveaux mitochondriaux de VDAC2 peuvent déterminer la stabilité et la fonction de BAK ainsi que le seuil apoptotique. En effet, nos résultats suggèrent que la suppression complète de VDAC2 peut être délétère en raison de la dégradation induite de BAK, ayant comme conséquence de nuire au priming mitochondrial. En revanche, une diminution partielle et de courte durée de VDAC2 n'affecte pas les niveaux de BAK et pourrait ainsi laisser BAK libre d'être activé, permettant sa fonction pro-apoptotique.

Ce mécanisme finement ajusté de régulation de BAK par VDAC2 pourrait expliquer pourquoi, dans différents contextes, il a été démontré que VDAC2 supprime et favorise l'activité pro-apoptotique de BAK (Cheng et al., 2003 ; Chin et al., 2018 ; Naghdi et al., 2015 ; Ren et al., 2009). Cheng et ses collaborateurs ont démontré que les MEFs déficientes en VDAC2, tout en présentant une diminution modérée des niveaux de BAK, montraient une activation accrue de BAK et étaient plus sensibles aux signaux apoptotiques (Cheng et al., 2003). De plus, il a été démontré que l'inhibition de BAK par VDAC2 dépend de leur interaction physique à travers le domaine transmembranaire de BAK (Lazarou et al., 2010). A l'inverse, Roy et son équipe ont rapporté que les MEFs déficients en VDAC2 présentaient une perte de sensibilité à l'apoptose induite par le t-BID et une réduction partielle des niveaux de BAK (Roy et al., 2009).

Ces résultats opposés reflètent la nature complexe par laquelle VDAC2 contrôle BAK. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la divergence de ces résultats avec les nôtres puisse provenir de différences dans les modèles cellulaires utilisés. En effet, la majorité des publications sur VDAC2 utilisent les MEFs comme modèle, et bien qu'il existe près de 90% de

similitudes entre VDAC2 chez l'Homme et chez la souris, on peut supposer que la différence entre les deux réside dans les résidus impliqués dans leur interaction physique avec BAK.

Si Chin et ses collaborateurs ont montré un rôle majeur de VDAC2 dans l'apoptose médiée par BAX (Chin et al., 2018), nous n'avons pas pu le mettre en évidence dans notre modèle. En effet, bien que les cellules VDAC2 et BAK-KO ont totalement perdu leur priming mitochondrial, les cellules BAX-KO ont seulement vu leur priming diminuer, mais une partie est encore présente. Cela nous montre que, dans des cellules TP53 mutées, il semble plutôt que la mort soit médiée par BAK. Néanmoins, nous ne pouvons pas affirmer que ce soit le cas dans toutes les cellules de MM. En effet, récemment, l'équipe a démontré que les cellules sauvages en TP53 rendues TP53^{-/-} par CRISPR/Cas9 ont une diminution de la protéine BAX et que par conséquent, elles deviennent résistantes aux BH3-mimétiques ciblant MCL-1, du fait de la perte du complexe MCL-1/BAX dans ces cellules. Ces résultats montrent que BAK et BAX ne sont pas complètement redondants et que l'expression de BAX induite par p53 est un facteur limitant de l'apoptose mitochondriale (Durand et al., 2023).

Le rôle distinct et controversé de VDAC2 dans la littérature depuis maintenant près de 20 ans peut probablement s'expliquer par le fait que certaines cellules vont plutôt fonctionner vers un mode « BAK » alors que d'autres vont plutôt aller vers un mode « BAX », amenant par conséquent un rôle pro- ou anti-apoptotique de VDAC2. De plus, les complexes existants entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques BH3-only et effectrices doivent aussi jouer un rôle prédominant dans la réponse à la mort cellulaire (Gomez-Bougie et al., 2018 ; Seiller et al., 2020).

Nos travaux ont permis de mettre en avant que, même s'il n'existe pas de corrélation directe entre l'expression protéique de VDAC2 et celle de BAX, on retrouve une interaction physique entre elles dans les cellules de MM. Bien que cette interaction ait déjà été rapportée auparavant (Yuan et al., 2021), cela ne peut pas nous permettre de conclure directement sur le rôle de VDAC2 dans l'apoptose BAX dépendante. Néanmoins, cela montre bien le rôle important de VDAC2 dans la régulation de l'apoptose, puisqu'il interagit non seulement avec BAX, mais aussi avec BAK. Ces trois protéines font d'ailleurs partis d'un complexe beaucoup plus grand de plus de 400 kDa (Lazarou et al., 2010 ; Ma et al., 2014). Si les chercheurs ont démontré que dans ce macro-complexe, on retrouve aussi VDAC1 et VDAC3, il serait intéressant de voir si d'autres membres de la famille BCL-2 ne font pas partie intégrante de celui-ci.

L'interaction entre VDAC2 et BAK a été considérée comme une cible thérapeutique potentielle pour découvrir des molécules susceptibles de promouvoir l'apoptose (van Delft et al., 2019). Des études récentes ont d'ailleurs permis de mettre en évidence les résidus clés dans leur interaction, permettant le développement de petites molécules ciblant spécifiquement VDAC2. De ce fait, la région entre les feuillets $\beta 7$ à $\beta 10$ de VDAC2 semble primordiale dans son interaction avec BAK (Naghdi et al., 2015 ; Yuan et al., 2024). Plusieurs études ont montré que plusieurs résidus sont importants pour BAK, se trouvant principalement au niveau des hélices $\alpha 4$ et 5, comme le résidu L78 (Cheng et al., 2003 ; Dudko et al., 2020).

Certaines molécules, comme l'érastine, inhibe à la fois VDAC2 et VDAC3 (Dolma et al., 2003 ; Yang et al., 2020). Trouver des molécules ciblant spécifiquement VDAC2 sans pour autant l'inhiber serait un bon compromis. À notre connaissance, seules deux molécules ciblent spécifiquement VDAC2 et pourraient être susceptibles de promouvoir l'apoptose en agissant sur l'interaction entre VDAC2 et BAK.

La première, WEHI-9625, n'atteint pas cet objectif, car elle bloque l'apoptose induite par BAK chez la souris en stabilisant l'interaction entre VDAC2 et BAK, sans pouvoir entraver l'apoptose induite par le BAK humain (van Delft et al., 2019). La seconde, l'Efsevin, est un nouveau modulateur de VDAC2 qui a été trouvé lié à VDAC2 (Wilting et al., 2020). Il a été démontré que cette molécule inversait le phénotype d'arythmie cardiaque observé dans le modèle de poisson zèbre tremblor, activité qui est dépendante de VDAC2 (Shimizu et al., 2015). En effet, l'Efsevin s'insère dans le canal, dans la paroi interne du canal, entre un feuillet β et l'hélice α (Wilting et al., 2020), ce qui a pour conséquence de garder le canal en conformation fermée pour ainsi pouvoir laisser passer les cations, comme le Ca^{2+} (Introduction, III) d. 2. iii.) Cependant, l'Efsevin n'a jamais été évaluée en tant que modulateur apoptotique. Avec notre étude, nous apportons la première preuve que l'Efsevin a renforcé le priming mitochondrial et a créé une synergie avec le S63845 ou le Vénétoclax sans pour autant modifier les niveaux d'expression de la protéine BAK et quel que soit le statut p53. Nous présentons également une preuve de concept selon laquelle l'Efsevin a effectivement renforcé la mort cellulaire induite par le S63845 dans les cellules primaires de patients atteints de MM. La question de savoir si l'Efsevin peut également renforcer la réponse apoptotique dans d'autres hémopathies malignes est actuellement à l'étude. Par ailleurs, même si l'effet sensibilisateur à la mort de l'Efsevin a montré son efficacité, bien qu'elle n'induisse pas la mort seule, le mécanisme sous-jacent demeure encore inconnu. Nous avons néanmoins démontré qu'il existait une corrélation entre la sensibilisation à la mort cellulaire et l'expression de la protéine VDAC2 dans nos HMCLs. A l'heure actuelle, nos données suggèrent que bien que l'Efsevin augmente le priming mitochondrial dans les cellules de MM, ce composé seul ne permet pas une activation des

effecteurs, notamment de BAK, comme nous pouvions l'observer par l'extinction transitoire de BAK. Néanmoins, BAK semble avoir un rôle dans cet effet sensibilisateur puisque si les cellules BAX-KO sont toujours sensibilisées par la combinaison de l'Efsevin avec un BH3-mimétique, ce n'est plus le cas des cellules BAK-KO. Il semble donc qu'un mécanisme différent soit mis en place dans ce contexte.

Une de nos hypothèses repose sur le fait que l'Efsevin pourrait déstabiliser l'interaction entre VDAC2 et BAK, sans pour autant l'inhiber complètement, du fait que le canal soit fermé et qu'il perde donc son activité principale, à savoir faire passer les métabolites, les grosses molécules et les anions au travers de la MOM. Pour le démontrer, une de nos expérimentations préliminaires montre d'ailleurs que lors du traitement des cellules avec l'Efsevin, l'interaction entre VDAC2 et BAK est diminuée. Cela reste bien évidemment à confirmer. De plus, une autre donnée préliminaire nous montre que lors du traitement avec l'Efsevin, quand on immunoprécipite MCL-1, on retrouve plus de BAK et de BAX associés à celle-ci. De plus, on retrouve plus de BIM associé à la protéine BCL-2 (données préliminaires). Cela suggère que lors du traitement à l'Efsevin, il y a une redistribution des complexes qui expliquerait pourquoi, lors de la combinaison avec un BH3-mimétique, on observe une forte sensibilisation à la mort cellulaire. Une autre explication dans son mécanisme d'action pourrait aussi être expliquée par le Ca^{2+} . En effet, jusqu'à présent, toutes les publications sur cette molécule montrent que l'Efsevin permet de favoriser le passage du Ca^{2+} au travers de la MOM, pour le faire entrer dans la mitochondrie et ainsi réguler les flux calciques. Il serait donc intéressant d'observer les flux de Ca^{2+} dans les cellules de MM et voir si cela peut avoir un impact direct sur la mort cellulaire. En effet, plusieurs études rapportent le rôle des transporteurs et canaux calciques dans le MM, et concernant les canaux à la mitochondrie, seuls le MCU (Landowski et al., 2005) et VDAC1 (Liu et al., 2006) ont été étudiés (Li et al., 2021). Un des seules études, avec les études sur l'Efsevin, faisant part du rôle de VDAC2 dans les flux calciques montre que VDAC2 interagit avec le récepteur à la ryanodine 2 (RyR2) qui se trouve à la membrane du RE afin de contrôler les flux calciques dans le cœur (Min et al., 2012).

Enfin, il nous semble nécessaire d'évaluer cette molécule dans d'autres modèles cancéreux. Nos données préliminaires suggèrent que la combinaison entre l'Efsevin et les BH3-mimétiques dans le LCM semble tout aussi bien fonctionner.

Les études sur VDAC2 et l'Efsevin ont mis en évidence que cette molécule supprime puissamment l'arythmie cardiaque dans les modèles murins et humains (Schweitzer et al., 2017 ; Shimizu et al., 2015). Cependant, en ce qui concerne une application clinique de cette substance, il convient de noter qu'elle augmente le transfert de Ca^{2+} entre le réticulum

sarcoplasmique et la mitochondrie avec une EC_{50} d'environ 5 μ M, une concentration susceptible de favoriser des effets « off-target » (Sander et al., 2021a). En outre, les données concernant la biodisponibilité, la pharmacodynamie, la stabilité et la toxicité de l'Efsevin font largement défaut et sont une réelle nécessité à comprendre pour pouvoir prétendre à son utilisation clinique (Rosenberg, 2022). Il faut donc par la suite étudier tous ses paramètres ainsi que bien comprendre son mécanisme d'action. VDAC2 a donc un rôle bien distinct sur la régulation de l'apoptose au travers de sa régulation de BAX et son rôle stabilisateur sur BAK (Cheng et al., 2003 ; Chin et al., 2018 ; Lauterwasser et al., 2016 ; Roy et al., 2009).

Notre étude met en avant une synergie entre l'Efsevin et les BH3-mimétiques ciblant MCL-1 et BCL-2. Nos données préliminaires suggèrent bien une sensibilisation à la mort en combinaison avec le A1155463, qui cible BCL-XL. L'utilisation de la combinaison entre l'Efsevin et un BH3-mimétique semble donc une bonne opportunité thérapeutique à envisager, notamment dans le MM. Toutefois, si le vénétoclax est approuvé pour le traitement de MM et montre une réelle efficacité, le S63845 ciblant MCL-1 n'a pas abouti dans les essais cliniques dans le MM suite à des problèmes de cardiotoxicité. Une étude très récente a évalué un nouvel inhibiteur de MCL-1, le BRD-810. Elle montre que le BRD-810 est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses après 4 heures d'incubation avec la molécule, sans compromettre la viabilité des autres cellules, y compris les cardiomyocytes. Cet inhibiteur a aussi fait ses preuves *in vivo*, et a montré qu'il est rapidement éliminé de la circulation systémique. Il représente donc un excellent candidat pour des essais cliniques pour le ciblage de MCL-1 dans les cancers hématologiques et solides (Rauh et al., 2024) afin de contourner la cardiotoxicité observée jusqu'à maintenant.

De manière étonnante, nos données suggèrent encore une fois que l'Efsevin semble agir par un mécanisme spécifique, encore différent que lorsque l'on utilise un siRNA dirigé contre VDAC2. En effet, nous avons observé que lorsque l'on fait un siVDAC2, on augmente le priming mitochondrial et on sensibilise aux signaux apoptotiques, à la fois avec les BH3-mimétiques, mais aussi avec le Bortezomib, le Melphalan et la Thapsigargine. Il serait intéressant de voir si l'Efsevin peut augmenter la mort cellulaire induite par ces molécules.

Toutes ces études ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de VDAC2 dans l'apoptose mitochondriale (Yuan et al., 2021). Étant donné que VDAC2 est une des protéines les plus abondantes à la MOM, on s'attendrait à ce que son rôle se retrouve uniquement à la mitochondrie. En plus de son rôle dans l'apoptose, de nombreuses autres fonctions de VDAC2 seraient intéressantes à étudier, surtout dans le cadre du cancer, comme dans le MM. C'est le cas de son rôle dans le métabolisme, qui pourrait être une perspective intéressante à

développer à la suite de mon projet de thèse. En effet, nous avons observé par microscopie confocale que les cellules VDAC2-KO ne présentent pas de modification de structure des mitochondries, et le réseau mitochondrial ne semble pas modifié. Nous avons vérifié la structure des mitochondries car une étude récente a montré que parfois, l'inhibition de VDAC2, un composant majeur de la MOM, pouvait affecter à la fois la morphologie de la mitochondrie mais aussi la concentration en ATP (Sato et al., 2023). De nombreuses études ont montré que VDAC2 peut interagir avec de nombreuses protéines, comme la tubuline (Carreá et al., 2002) ou encore l'hexokinase II (Mathupala et al., 2006). L'hexokinase II peut lier à la fois l'ATP et le glucose entrant, produisant le glucose-6-phosphate à un taux élevé. Ce métabolite critique sert alors à la fois de précurseur biosynthétique pour soutenir la prolifération cellulaire et de précurseur de l'acide lactique, produit par les cellules cancéreuses et créant un environnement défavorable pour les cellules normales. La localisation mitochondriale de l'hexokinase II grâce aux VDACs permet de supprimer la mort des cellules cancéreuses, augmentant ainsi leur possibilité de métastases (Mathupala et al., 2006). Parmi les autres partenaires de liaison de VDAC2, on retrouve également les céramides insérées dans la MOM qui permettraient, de par leur liaison à VDAC2, de jouer un rôle dans l'apoptose (Dadsena et al., 2019). Enfin, on retrouve aussi une interaction entre VDAC2 et STING. Cette interaction permet des contacts entre le RE et la mitochondrie puisque STING se trouve à la membrane du RE. La liaison entre ses deux protéines perturbe le contact entre le RE et les mitochondries pour restreindre le transfert de Ca^{2+} du RE vers les mitochondries pour maintenir l'homéostasie calcique. L'inhibition de STING entraîne alors une augmentation des taux de Ca^{2+} mitochondriaux et la production de ROS, aboutissant à une diminution de la production d'ATP (Zhu et al., 2022). Cela montre donc l'importance de VDAC2 dans le métabolisme et l'homéostasie mitochondriale, qui méritent d'être explorées dans le MM.

La protéine VDAC2, en régulant l'échange de métabolites entre la mitochondrie et le cytosol, joue un rôle crucial dans l'apoptose en influençant notamment la stabilisation des facteurs pro-apoptotiques à la mitochondrie. En tant que modulateur clé de la voie mitochondriale de l'apoptose, VDAC2 représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer, offrant une opportunité de développer des stratégies visant à restaurer l'apoptose dans les cellules tumorales résistantes.

II) **Le PROTAC DT2216 dégrade spécifiquement BCL-XL et cible efficacement la leucémie plasmocytaire secondaire dépendante de BCLXL pour sa survie**

Notre étude a permis de mettre en évidence que le DT2216, un nouveau dégradeur de BCL-XL épargnant les plaquettes, dégrade sélectivement le BCL-XL dans les cellules de MM et de sPCL, mais n'induit la mort que les cellules fortement primées pour BCL-XL. La spécificité du DT2216 est déterminée par le recrutement de BCLXL par la VHL E3 ligase, tout comme Khan et ses collaborateurs l'ont montré (Khan et al., 2019).

Nous avons donc confirmé que celle-ci est bien exprimée dans les cellules sPCL et HMCL analysées. Néanmoins, le niveau protéique de l'E3 ligase VHL n'est pas corrélé avec l'induction de la mort cellulaire par le DT2216. Ceci avait déjà été rapporté dans des lignées cellulaires de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (Jaiswal et al., 2023). En revanche, les niveaux protéiques de BCL-XL sont eux fortement corrélés à la mort cellulaire induite par le DT2216, ce qui suggère que le niveau d'expression de la protéine BCL-XL dicte la sensibilité au DT2216 dans les plasmocytes tumoraux. En accord avec nos résultats, une autre étude a démontré que les cellules de lymphome à cellules T exprimant des niveaux élevés de BCL-XL étaient très sensibles au DT2216 (He et al., 2020). Cette même étude a montré que les cellules exprimant un taux élevé de MCL-1 étaient résistantes au DT2216, de façon similaire à nos résultats observés dans la lignée cellulaire de MM XG7. Ces observations suggèrent que MCL-1 pourrait agir comme un facteur de résistance à la mort cellulaire induite par le DT2216.

Il est important de noter que de faibles concentrations de DT2216, de l'ordre du nM, ont été nécessaires pour induire la mort des cellules myélomateuses par rapport aux doses élevées utilisées dans les cellules de tumeurs solides. En effet, Khan et ses collaborateurs ont montré l'efficacité du DT2216 sur des lignées de NSCLC, de cancer pancréatique ou encore de cancer colorectal avec des doses de l'ordre du μM (Khan et al., 2024, 2022) tout comme Jenkins et son équipe deux ans plus tard dans des lignées de cancer colorectal où l'ordre du μM est aussi utilisé pour le DT2216 (Jenkins et al., 2024). Tout comme nos résultats, dans deux études, de faibles doses de DT2216 ont permis de d'induire la mort des lymphomes à cellules T dépendants de BCL-XL *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (Jaiswal et al., 2023 ; Khan et al., 2019). La question de savoir si la sensibilité élevée du DT2216 pourrait être étendue à d'autres cancers hématologiques n'est pas encore actée. Néanmoins, il semblerait que le DT2216 soit efficace puisqu'une étude récente a aussi montré son efficacité dans des cellules de leucémie mégacaryoblastique aiguë (Gress et al., 2023).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans les cellules sensibles au DT2216, la dégradation de BCL-XL pourrait déclencher la libération de ses contreparties liées, à savoir les protéines BH3-only et les effecteurs BAK et BAX. Ainsi, les protéines BH3-only libérées peuvent à leur tour activer BAK et BAX (Mode 1). Sans s'exclure mutuellement, la libération des protéines effectrices de BCL-XL peut également conduire à leur activation (Mode 2) (**Introduction, II e. 2.**) ([Lee et al., 2016](#) ; [O'Neill et al., 2016](#)). L'activation concomitante de BAX et BAK observée sous DT2216 suggère la formation d'hétéro-complexes BAX/BAK au niveau des mitochondries, comme décrit précédemment dans les cellules de MM ([Seiller et al., 2020](#)). Enfin, la MOMP est mise en place favorisant la libération de cytochrome c, amenant au clivage des caspases, comme nous avons pu le voir dans la lignée NAN12, sensible au DT2216. L'immunoprécipitation de BCL-XL dans la lignée sensible NAN12 suggère que le Mode 1 puisse être mis en place puisque les BH3-only comme BIM ou encore BIK, sont fortement associés à BCL-XL, comme PUMA qui semble faiblement associé. Ce pool important de BIK, lié à BCL-XL dans la lignée NAN12, est intéressant puisque cette protéine BH3-only, longtemps décrite comme une protéine sensibilisatrice, est maintenant considérée comme un activateur direct de BAX et BAK ([Dai et al., 2018](#) ; [Du et al., 2011](#)).

Malgré le faible nombre d'échantillons de patients inclus dans cette étude, l'identification d'un sous-groupe de sPCL dépendants de BCL-XL, mais pas de BCL-2, pour la survie a pleinement illustré l'importance de cibler BCLXL pour ces patients réfractaires en phase terminale dont l'issue est sombre puisqu'elle ne dépasse généralement pas l'année ([Tuazon et al., 2021](#)).

De plus, notre analyse préliminaire d'échantillons de MO provenant de patients atteints de MM en rechute/réfractaire a montré que sur les 42 échantillons analysés, seuls 3 étaient sensibles au DT2216 (mort cellulaire $\geq 50\%$ à 150nM), soit environ 7% des patients, suggérant qu'un petit groupe de patients atteints de MM en rechute/réfractaire est dépendant de BCL-XL et pourrait potentiellement bénéficier d'un bénéfice thérapeutique avec le DT2216. L'équipe avait déjà montré qu'un faible pourcentage de patients atteints de MM était dépendant uniquement de BCL-XL ([Gomez-Bougje et al., 2018](#)). Parmi les échantillons sensibles au vénétoclax, les sPCL 4 et sPCL 8 appartenaient aux groupes moléculaires CD-2 et CD-1, qui se caractérisent par une surexpression de *CCND1* et la présence de t(11;14) ([Zhan et al., 2006](#)). En effet, plusieurs études ont démontré l'utilisation clinique potentielle du vénétoclax chez les patients atteints de MM présentant une t(11;14) ([Bodet et al., 2011](#) ; [Kumar et al., 2017](#) ; [Touzeau et al., 2016](#)). En outre, la probabilité d'une réponse clinique était associée à des ratios élevés d'ARNm *BCL2/MCL1* et *BCL2/BCL2L1*. Par conséquent, nous avons confirmé le rôle de MCL-1 en tant que facteur de résistance à la réponse au vénétoclax dans notre cohorte de sPCL. Il est intéressant de noter que nos résultats suggèrent que, dans les sPCL, MCL-1 pourrait également jouer un rôle dans la résistance au ciblage de BCL-XL. Il convient de noter que le

gène codant pour MCL-1 est situé en 1q21, région fréquemment amplifiée dans le MM (Barwick et al., 2019b). L'amplification de MCL-1 est aussi très fréquente dans de nombreux cancers, autant dans les cancers solides qu'hématologiques (Mittal et al., 2021).

L'équipe a précédemment montré que le ciblage combiné de BCL-2 et MCL-1 avec des BH3-mimétiques était efficace dans le MM (Seiller et al., 2020). Cela nous suggère que combiner le DT2216 avec d'autres molécules ciblant les autres protéines anti-apoptotiques permettrait de cibler les patients à la fois dépendants de BCL-XL ou de MCL-1 par exemple. Si l'utilisation de BH3-mimétique ciblant BCL-XL était mis de côté pour cause de thrombocytopénie, c'est aussi le cas pour les BH3-mimétiques ciblant MCL-1, qui causent des problèmes cardiotoxiques. De ce fait, de nouvelles molécules pourraient être envisagées, comme la technologie PROTAC, dont nous avons montré l'efficacité pour BCL-XL dans les sPCL. Certaines molécules récentes, comme le BRD-810, semblent très encourageantes puisqu'elle permet l'inhibition de MCL-1 sans causer de dommages aux cardiomyocytes (Rauh et al., 2024). Ceci suggère que, si un groupe de patients peut bénéficier de l'utilisation du PROTAC ciblant BCL-XL, une combinaison avec des molécules ciblant les autres protéines anti-apoptotiques, comme par exemple le vénétoclax ciblant BCL-2, peut être une bonne opportunité thérapeutique, tant dans les PCL que le MM.

Des études antérieures ayant démontré que l'évaluation fonctionnelle de la sensibilité au vénétoclax permettait de prédire la réponse clinique (Matulis et al., 2019), nous pouvons penser que l'évaluation fonctionnelle de la sensibilité au DT2216 pourrait également permettre de prédire la réponse clinique des sPCL au DT2216. D'après nos résultats, nous pensons que ces tests *ex vivo*, simples et rapides à analyser par cytométrie en flux après 48 heures de traitement avec le DT2216, seront essentiels pour une approche personnalisée et feront le lien entre les données génétiques d'un individu et leur application en clinique pour chaque patient. Même si les sPCL dépendants de BCL-XL restent un petit groupe de patients, le DT2216 apparaît comme une arme supplémentaire qui mérite une évaluation clinique dans cette pathologie. Outre l'intérêt du DT2216 pour cibler les cellules cancéreuses qui dépendent de BCL-XL pour leur survie, il a été récemment montré que le DT2216 pouvait améliorer l'immunothérapie du cancer en éliminant les cellules T régulatrices (Kolb et al., 2021). Ainsi, l'étude de Kolb et ses collègues élargit l'utilisation potentielle du dégradeur de BCL-XL, qui fait déjà l'objet d'essais cliniques (NCT04886622).

Suite à la publication de notre article, trois autres études ont rapidement émergé, évaluant l'efficacité du DT2216 dans le traitement de trois autres types de cancers. Une première étude a permis de mettre en évidence que des cellules de leucémie mégacaryoblastique aiguë sont sensibles à l'inhibition de la protéine BCL-XL par le navitoclax mais aussi par le DT2216. Ses deux molécules, en association avec une faible dose de cytarabine, ont permis de réduire de manière significative la charge leucémique *in vivo*, chez les souris, montrant que BCL-XL est une vulnérabilité thérapeutique à cibler dans ce cancer (Gress et al., 2023). Une deuxième étude a montré l'efficacité du DT2216 dans le cancer colorectal métastatique BRAFV600E. Ce cancer, qui présente une mutation de BRAF, est de très mauvais pronostic. Les chercheurs ont évalué l'efficacité de l'encorafenib, un inhibiteur de BRAFV600E, en combinaison avec le DT2216 afin de cibler la protéine BCL-XL qui semble être fortement exprimée dans ce cancer. Cette combinaison augmente de manière significative l'apoptose dans les lignées cellulaires testées, et pourrait amener à d'autres études, et notamment des essais cliniques sur cette combinaison qui pourrait être tolérée par les patients (Jenkins et al., 2024). Enfin, l'équipe de Khan, ayant déjà montré l'efficacité du DT2216 dans une précédente étude, a permis de montrer que la combinaison entre le DT2216 et le Vénétoclax est efficace aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le NSCLC. Cela a permis le développement d'une molécule dégradant à la fois BCL-2 et BCL-XL, le 753b, montrant une excellente efficacité tout en s'affranchissant de la thrombocytopenie, comme le DT2216 (Khan et al., 2024).

Ainsi, ces trois études font suite à notre étude et celles d'autres équipes et démontrent l'importance du ciblage de BCL-XL dans les cancers, à conditions qu'ils soient dépendants de BCL-XL. D'ailleurs, l'étude de phase 1 sur l'utilisation du DT2216 est toujours en cours à la fois dans des cancers hématologiques et des cancers solides (NCT04886622).

BIBLIOGRAPHIE

- Abdallah, N., Kumar, S.K., 2019. Daratumumab in untreated newly diagnosed multiple myeloma. *Ther. Adv. Hematol.* 10, 2040620719894871. <https://doi.org/10.1177/2040620719894871>
- Ackler, S., Mitten, M.J., Foster, K., Oleksijew, A., Refici, M., Tahir, S.K., Xiao, Y., Tse, C., Frost, D.J., Fesik, S.W., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., 2010. The Bcl-2 inhibitor ABT-263 enhances the response of multiple chemotherapeutic regimens in hematologic tumors in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 869–880. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1232-1>
- Adams, C.M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., Eischen, C.M., 2018. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Front. Oncol.* 8, 636. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00636>
- Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R.H., Edwards*, S.W., 2000. Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 684–691. <https://doi.org/10.1007/PL00000728>
- Aksoy, O., Lind, J., Sunder-Plaßmann, V., Vallet, S., Podar, K., 2023. Bone marrow microenvironment- induced regulation of Bcl-2 family members in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. *Cytokine* 161, 156062. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156062>
- Al Jamal, J.A., 2005. Involvement of porin N,N-dicyclohexylcarbodiimide-reactive domain in hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane. *Protein J.* 24, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10930-004-0600-2>
- Algarín, E.M., Díaz-Tejedor, A., Mogollón, P., Hernández-García, S., Corchete, L.A., San-Segundo, L., Martín-Sánchez, M., González-Méndez, L., Schoumacher, M., Banquet, S., Kraus-Berthier, L., Kloos, I., Derreal, A., Halilovic, E., Maacke, H., Gutiérrez, N.C., Mateos, M.-V., Paíno, T., Garayoa, M., Ocio, E.M., 2020. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica* 105, e116–e120. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212308>
- Alles, A., Alley, K., Barrett, J.C., Buttyan, R., Columbano, A., Cope, F.O., Copelan, E.A., Duke, R.C., Farel, P.B., Gershenson, L.E., 1991. Apoptosis: a general comment. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2127–2128. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.8.2022310>
- Alsop, A.E., Fennell, S.C., Bartolo, R.C., Tan, I.K.L., Dewson, G., Kluck, R.M., 2015. Dissociation of Bak α 1 helix from the core and latch domains is required for apoptosis. *Nat. Commun.* 6, 6841. <https://doi.org/10.1038/ncomms7841>
- Anflous, K., Armstrong, D.D., Craigen, W.J., 2001. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 276, 1954–1960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006587200>
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Kuehl, W.M., Staudt, L.M., 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.004>
- Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., Hardwick, J.M., 2013. Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends Cell Biol.* 23, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.10.010>

- Arai, S., Varkaris, A., Nouri, M., Chen, S., Xie, L., Balk, S.P., 2020. MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation. *eLife* 9, e54954. <https://doi.org/10.7554/eLife.54954>
- Arbel, N., Ben-Hail, D., Shoshan-Barmatz, V., 2012. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 23152–23161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345918>
- Arbel, N., Shoshan-Barmatz, V., 2010. Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity. *J. Biol. Chem.* 285, 6053–6062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082990>
- Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K., 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev. Cell* 4, 587–598. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00090-x)
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., Roussel, M., Payen, C., Mathiot, C., Fermand, J.P., Meuleman, N., Rollet, S., Maglio, M.E., Zeytoonjian, A.A., Weller, E.A., Munshi, N., Anderson, K.C., Richardson, P.G., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Moreau, P., IFM 2009 Study, 2017. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 376, 1311–1320. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611750>
- Attal, M., Richardson, P.G., Rajkumar, S.V., San-Miguel, J., Beksac, M., Spicka, I., Leleu, X., Schjesvold, F., Moreau, P., Dimopoulos, M.A., Huang, J.S.-Y., Minarik, J., Cavo, M., Prince, H.M., Macé, S., Corzo, K.P., Campana, F., Le-Guenec, S., Dubin, F., Anderson, K.C., ICARIA-MM study group, 2019. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond. Engl.* 394, 2096–2107. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32556-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32556-5)
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A.-M., Sotto, J.-J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J.-G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J.-L., Facon, T., Mathiot, C., 2007. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 109, 3489–3495. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040410>
- Avet-Loiseau, H., Li, C., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.-L., Attal, M., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T., Moreau, P., Anderson, K.C., Campion, L., Munshi, N.C., Minvielle, S., 2009. Prognostic Significance of Copy-Number Alterations in Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* 27, 4585–4590. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6136>
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M.J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., Harousseau, J.L., Bataille, R., 1998. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res.* 58, 5640–5645.
- Bae, I.H., Park, M.-J., Yoon, S.H., Kang, S.W., Lee, S.-S., Choi, K.-M., Um, H.-D., 2006. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res.* 66, 4991–4995. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4254>

- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., Molkentin, J.D., 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* 9, 550–555. <https://doi.org/10.1038/ncb1575>
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., Korsmeyer, S.J., 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899–906. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80070-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80070-2)
- Baldarelli, R.M., Smith, C.M., Finger, J.H., Hayamizu, T.F., McCright, I.J., Xu, J., Shaw, D.R., Beal, J.S., Blodgett, O., Campbell, J., Corbani, L.E., Frost, P.J., Giannatto, S.C., Miers, D.B., Kadin, J.A., Richardson, J.E., Ringwald, M., 2021. The mouse Gene Expression Database (GXD): 2021 update. *Nucleic Acids Res.* 49, D924–D931. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa914>
- Banerjee, J., Ghosh, S., 2004. Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 310–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.094>
- Barwick, B.G., Gupta, V.A., Vertino, P.M., Boise, L.H., 2019a. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front. Immunol.* 10, 1121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01121>
- Barwick, B.G., Neri, P., Bahlis, N.J., Nooka, A.K., Dhodapkar, M.V., Jaye, D.L., Hofmeister, C.C., Kaufman, J.L., Gupta, V.A., Auclair, D., Keats, J.J., Lonial, S., Vertino, P.M., Boise, L.H., 2019b. Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nat. Commun.* 10, 1911. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09555-6>
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Zeth, K., 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15370–15375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>
- Bednarek, A.K., Keck-Waggoner, C.L., Daniel, R.L., Laflin, K.J., Bergsagel, P.L., Kiguchi, K., Brenner, A.J., Aldaz, C.M., 2001. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res.* 61, 8068–8073.
- Benaniba, L., Tessoulin, B., Trudel, S., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., Minvielle, S., Gourraud, P.A., de Visme, S., Maisonneuve, H., Lok, A., Le Gouill, S., Moreau, P., Touzeau, C., 2019. The MYRACLE protocol study: a multicentric observational prospective cohort study of patients with multiple myeloma. *BMC Cancer* 19, 855. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6080-8>
- Benboubker, L., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J., Belch, A.R., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N., Banos, A., Tiab, M., Delforge, M., Cavenagh, J., Gherlone, C., Lee, J.-J., Chen, C., Oriol, A., de la Rubia, J., Qiu, L., White, D.J., Binder, D., Anderson, K., Fermand, J.-P., Moreau, P., Attal, M., Knight, R., Chen, G., Van Oostendorp, J., Jacques, C., Ervin-Haynes, A., Avet-Loiseau, H., Hulin, C., Facon, T., FIRST Trial Team, 2014. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N. Engl. J. Med.* 371, 906–917. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402551>
- Benz, R., 1994. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 167–196. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90004-3)
- Berdeja, J.G., Madduri, D., Usmani, S.Z., Jakubowiak, A., Agha, M., Cohen, A.D., Stewart, A.C., 2019. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with multiple myeloma: a phase 3 randomized clinical trial. *J. Clin. Oncol.* 37, 1155–1163. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.8121>

- A.K., Hari, P., Htut, M., Lesokhin, A., Deol, A., Munshi, N.C., O'Donnell, E., Avigan, D., Singh, I., Zudaire, E., Yeh, T.-M., Allred, A.J., Olyslager, Y., Banerjee, A., Jackson, C.C., Goldberg, J.D., Schechter, J.M., Deraedt, W., Zhuang, S.H., Infante, J., Geng, D., Wu, X., Carrasco-Alfonso, M.J., Akram, M., Hossain, F., Rizvi, S., Fan, F., Lin, Y., Martin, T., Jagannath, S., 2021. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet Lond. Engl.* 398, 314–324. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8)
- Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., Shaughnessy, J., 2005. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106, 296–303. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0034>
- Bernardini, J.P., Brouwer, J.M., Tan, I.K., Sandow, J.J., Huang, S., Stafford, C.A., Bankovacki, A., Riffkin, C.D., Wardak, A.Z., Czabotar, P.E., Lazarou, M., Dewson, G., 2019. Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy. *EMBO J.* 38, e99916. <https://doi.org/10.15252/emj.201899916>
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K.T., Pinchback, R.M., Ligon, A.H., Cho, Y.-J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M.S., Weir, B.A., Tanaka, K.E., Chiang, D.Y., Bass, A.J., Loo, A., Hoffman, C., Prensner, J., Liefeld, T., Gao, Q., Yecies, D., Signoretti, S., Maher, E., Kaye, F.J., Sasaki, H., Tepper, J.E., Fletcher, J.A., Tabernero, J., Baselga, J., Tsao, M.-S., Demichelis, F., Rubin, M.A., Janne, P.A., Daly, M.J., Nucera, C., Levine, R.L., Ebert, B.L., Gabriel, S., Rustgi, A.K., Antonescu, C.R., Ladanyi, M., Letai, A., Garraway, L.A., Loda, M., Beer, D.G., True, L.D., Okamoto, A., Pomeroy, S.L., Singer, S., Golub, T.R., Lander, E.S., Getz, G., Sellers, W.R., Meyerson, M., 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., Andrews, D.W., 2008. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27, S93–S104. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.47>
- Birkinshaw, R.W., Czabotar, P.E., 2017. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.04.001>
- Birkinshaw, R.W., Iyer, S., Lio, D., Luo, C.S., Brouwer, J.M., Miller, M.S., Robin, A.Y., Uren, R.T., Dewson, G., Kluck, R.M., Colman, P.M., Czabotar, P.E., 2021. Structure of detergent-activated BAK dimers derived from the inert monomer. *Mol. Cell* 81, 2123–2134.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.014>
- Blachly-Dyson, E., Baldini, A., Litt, M., McCabe, E.R., Forte, M., 1994. Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics* 20, 62–67. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1127>
- Blachly-Dyson, E., Zambronicz, E.B., Yu, W.H., Adams, V., McCabe, E.R., Adelman, J., Colombini, M., Forte, M., 1993. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* 268, 1835–1841.
- Bleicken, S., Jeschke, G., Stegmüller, C., Salvador-Gallego, R., García-Sáez, A.J., Bordignon, E., 2014. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol. Cell* 56, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.022>

- Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Dousset, C., Descamps, G., Maïga, S., Avet-Loiseau, H., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2011. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* 118, 3901–3910. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317438>
- Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., Thompson, C.B., 1993. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597–608. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90508-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90508-n)
- Bondeson, D.P., Mares, A., Smith, I.E.D., Ko, E., Campos, S., Miah, A.H., Mulholland, K.E., Routly, N., Buckley, D.L., Gustafson, J.L., Zinn, N., Grandi, P., Shimamura, S., Bergamini, G., Faeth-Savitski, M., Bantscheff, M., Cox, C., Gordon, D.A., Willard, R.R., Flanagan, J.J., Casillas, L.N., Votta, B.J., den Besten, W., Famm, K., Kruidenier, L., Carter, P.S., Harling, J.D., Churcher, I., Crews, C.M., 2015. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* 11, 611–617. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1858>
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21–26. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)88932-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)88932-1)
- Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L.C., Strasser, A., Adams, J.M., 2001. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell* 1, 645–653. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00083-1)
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., 1995. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, 1921–1928.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R.L., Cepero, E., Boise, L.H., 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* 14, 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- Bricelj, A., Steinebach, C., Kuchta, R., Gütschow, M., Sosič, I., 2021. E3 Ligase Ligands in Successful PROTACs: An Overview of Syntheses and Linker Attachment Points. *Front. Chem.* 9, 707317. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.707317>
- Bridgham, J.T., Wilder, J.A., Hollocher, H., Johnson, A.L., 2003. All in the family: evolutionary and functional relationships among death receptors. *Cell Death Differ.* 10, 19–25. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401174>
- Brien, G., Debaud, A.-L., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M.-C., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F.M., Haser, R., Bonnefoy-Berard, N., 2009. C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J. Biol. Chem.* 284, 30257–30263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040824>
- Brigle, K., Rogers, B., 2017. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin. Oncol. Nurs., Multiple Myeloma* 33, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.012>
- Brouwer, J.M., Lan, P., Cowan, A.D., Bernardini, J.P., Birkinshaw, R.W., van Delft, M.F., Sleebs, B.E., Robin, A.Y., Wardak, A., Tan, I.K., Reljic, B., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Call, M.J., Smith, B.J., Dewson, G., Lessene, G., Colman, P.M., Czabotar, P.E., 2017. Conversion of Bim-BH3 from Activator to Inhibitor of Bak through Structure-Based Design. *Mol. Cell* 68, 659–672.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.001>
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V.,

- Colman, P.M., Kluck, R.M., Czabotar, P.E., 2014. Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol. Cell* 55, 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.016>
- Bruce, D., 2002. The Nobel Prize for Physiology or Medicine 2002. *Genome Biol.* 3, gb-spotlight-20021008-01. <https://doi.org/10.1186/gb-spotlight-20021008-01>
- Bui, N.-L.-C., Pandey, V., Zhu, T., Ma, L., Basappa, Lobie, P.E., 2018. Bad phosphorylation as a target of inhibition in oncology. *Cancer Lett.* 415, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.017>
- Caenepeel, S., Brown, S.P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K.S., Chui, D., Whittington, D.A., Huang, X., Poppe, L., Cheng, A.C., Cardozo, M., Houze, J., Li, Y., Lucas, B., Paras, N.A., Wang, X., Taygerly, J.P., Vimolratana, M., Zancanella, M., Zhu, L., Cajulis, E., Osgood, T., Sun, J., Damon, L., Egan, R.K., Greninger, P., McClanaghan, J.D., Gong, J., Moujalled, D., Pomilio, G., Beltran, P., Benes, C.H., Roberts, A.W., Huang, D.C., Wei, A., Canon, J., Coxon, A., Hughes, P.E., 2018. AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. *Cancer Discov.* 8, 1582–1597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0387>
- Campbell, K.J., Bath, M.L., Turner, M.L., Vandenberg, C.J., Bouillet, P., Metcalf, D., Scott, C.L., Cory, S., 2010. Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood* 116, 3197–3207. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281071>
- Carpio, M.A., Means, R.E., Brill, A.L., Sainz, A., Ehrlich, B.E., Katz, S.G., 2021. BOK controls apoptosis by Ca²⁺ transfer through ER-mitochondrial contact sites. *Cell Rep.* 34, 108827. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108827>
- Carpio, M.A., Michaud, M., Zhou, W., Fisher, J.K., Walensky, L.D., Katz, S.G., 2015. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7201–7206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421063112>
- Carreá, M., Andreá, N., Carles, G., Borghi, H., Brichese, L., Briand, C., Braguer, D., 2002. Tubulin Is an Inherent Component of Mitochondrial Membranes That Interacts with the Voltage-dependent Anion Channel *. *J. Biol. Chem.* 277, 33664–33669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203834200>
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., Juin, P., 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.028>
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., Letai, A., 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027>
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y., 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855–862. <https://doi.org/10.1038/35022514>
- Chami, M., Prandini, A., Campanella, M., Pinton, P., Szabadkai, G., Reed, J.C., Rizzuto, R., 2004. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *J. Biol. Chem.* 279, 54581–54589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409663200>

- Champion, O., Soler, A., Maïga, S., Bellanger, C., Pellat-Deceunynck, C., Talbot, A., Touzeau, C., Amiot, M., Gomez-Bougie, P., 2023. BCLXL PROTAC degrader DT2216 targets secondary plasma cell leukemia addicted to BCLXL for survival. *Front. Oncol.* 13, 1196005. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1196005>
- Chandra, D., Choy, G., Daniel, P.T., Tang, D.G., 2005. Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J. Biol. Chem.* 280, 19051–19061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501391200>
- Chari, A., Minnema, M.C., Berdeja, J.G., Oriol, A., van de Donk, N.W.C.J., Rodríguez-Otero, P., Askari, E., Mateos, M.-V., Costa, L.J., Caers, J., Verona, R., Girgis, S., Yang, S., Goldsmith, R.B., Yao, X., Pillarisetti, K., Hilder, B.W., Russell, J., Goldberg, J.D., Krishnan, A., 2022. Talquetamab, a T-Cell-Redirecting GPRC5D Bispecific Antibody for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 387, 2232–2244. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2204591>
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., Anderson, K.C., 2007. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 26, 2374–2380. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210028>
- Chen, L., Sun, C.Y., An, B.W., Yu, J.M., Zhao, F., Zhang, C., Hu, Y., 2021. [Clinical characteristics of patients with multiple myeloma harboring 6q deletion]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi* 42, 642–645. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.08.005>
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.030>
- Cheng, E.H.-Y., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., Korsmeyer, S.J., 2003. VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis. *Science* 301, 513–517. <https://doi.org/10.1126/science.1083995>
- Chesi, M., Bergsagel, P.L., Shonukan, O.O., Martelli, M.L., Brents, L.A., Chen, T., Schröck, E., Ried, T., Kuehl, W.M., 1998a. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91, 4457–4463.
- Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schröck, E., Ried, T., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 16, 260–264. <https://doi.org/10.1038/ng0797-260>
- Chesi, M., Nardini, E., Lim, R.S., Smith, K.D., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., 1998b. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92, 3025–3034.
- Chin, H.S., Li, M.X., Tan, I.K.L., Ninnis, R.L., Reljic, B., Scicluna, K., Dagley, L.F., Sandow, J.J., Kelly, G.L., Samson, A.L., Chappaz, S., Khaw, S.L., Chang, C., Morokoff, A., Brinkmann, K., Webb, A., Hockings, C., Hall, C.M., Kueh, A.J., Ryan, M.T., Kluck, R.M., Bouillet, P., Herold, M.J., Gray, D.H.D., Huang, D.C.S., van Delft, M.F., Dewson, G., 2018. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat. Commun.* 9, 4976. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., Rashmi, R., 2008. BIK-the founding member of the BH3-

only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27, S20–S29. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.40>

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R., 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>

Chonghaile, T.N., Sarosiek, K.A., Vo, T.-T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.-T., Mitsiades, C.S., Matulonis, U.A., Drapkin, R., Stone, R., DeAngelo, D.J., McConkey, D.J., Sallan, S.E., Silverman, L., Hirsch, M.S., Carrasco, D.R., Letai, A., 2011. Pretreatment Mitochondrial Priming Correlates with Clinical Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Science* 334, 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1206727>

Choudhary, O.P., Ujwal, R., Kowallis, W., Coalson, R., Abramson, J., Grabe, M., 2010. The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating. *J. Mol. Biol.* 396, 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.006>

Cleary, M.L., Smith, S.D., Sklar, J., 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19–28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90362-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90362-4)

Colombini, M., 2016. The VDAC channel: Molecular basis for selectivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2498–2502. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.019>

Colombini, M., 2012. VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1457–1465. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.026>

Colombini, M., 2004. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* 256–257, 107–115. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009862.17396.8d>

Colombini, M., 1980. Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 341, 552–563. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb47198.x>

Colombini, M., Blachly-Dyson, E., Forte, M., 1996. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 4, 169–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_5

Corre, J., Perrot, A., Caillot, D., Belhadj, K., Hulin, C., Leleu, X., Mohty, M., Facon, T., Buisson, L., Do Souto, L., Lannes, R., Dufrechou, S., Prade, N., Orsini-Piocelle, F., Voillat, L., Jaccard, A., Karlin, L., Macro, M., Brechignac, S., Dib, M., Sanhes, L., Fontan, J., Clement-Filliatre, L., Marolleau, J.-P., Minvielle, S., Moreau, P., Avet-Loiseau, H., 2021. del(17p) without TP53 mutation confers a poor prognosis in intensively treated newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Blood* 137, 1192–1195. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008346>

Costa, B.A., Mouhieddine, T.H., Ortiz, R.J., Richter, J., 2023. Revisiting the role of alkylating agents in multiple myeloma: Up-to-date evidence and future perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 187, 104040. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104040>

Costa, L.J., Davies, F.E., Monohan, G.P., Kovacsovics, T., Burwick, N., Jakubowiak, A., Kaufman, J.L., Hong, W.-J., Dail, M., Salem, A.H., Yang, X., Masud, A.A., Munasinghe, W., Ross, J.A., Bueno, O.F., Kumar, S.K., Stadtmauer, E.A., 2021. Phase 2 study of venetoclax plus carfilzomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood Adv.* 5, 3748–3759. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020004146>

Cowan, A.D., Smith, N.A., Sandow, J.J., Kapp, E.A., Rustam, Y.H., Murphy, J.M., Brouwer, J.M., Bernardini, J.P., Roy, M.J., Wardak, A.Z., Tan, I.K., Webb, A.I., Gulbis, J.M., Smith, B.J., Reid, G.E., Dewson, G., Colman, P.M., Czabotar, P.E., 2020. BAK core dimers bind lipids and can be bridged by them. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 1024–1031. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0494-5>

Cowan, A.J., Allen, C., Barac, A., Basaleem, H., Bensenor, I., Curado, M.P., Foreman, K., Gupta, R., Harvey, J., Hosgood, H.D., Jakovljevic, M., Khader, Y., Linn, S., Lad, D., Mantovani, L., Nong, V.M., Mokdad, A., Naghavi, M., Postma, M., Roshandel, G., Shackelford, K., Sisay, M., Nguyen, C.T., Tran, T.T., Xuan, B.T., Ukwaja, K.N., Vollset, S.E., Weiderpass, E., Libby, E.N., Fitzmaurice, C., 2018. Global Burden of Multiple Myeloma. *JAMA Oncol.* 4, 1221–1227. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2128>

Czabotar, P.E., Garcia-Saez, A.J., 2023. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 732–748. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00629-4>

Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J.M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>

Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Kluck, R.M., Adams, J.M., Colman, P.M., 2013. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.031>

Dadsena, S., Bockelmann, S., Mina, J.G.M., Hassan, D.G., Korneev, S., Razzera, G., Jahn, H., Niekamp, P., Müller, D., Schneider, M., Tafesse, F.G., Marrink, S.J., Melo, M.N., Holthuis, J.C.M., 2019. Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis. *Nat. Commun.* 10, 1832. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09654-4>

D'Agostino, M., Cairns, D.A., Lahuerta, J.J., Wester, R., Bertsch, U., Waage, A., Zamagni, E., Mateos, M.-V., Dall'Olio, D., van de Donk, N.W.C.J., Jackson, G., Rocchi, S., Salwender, H., Bladé Creixenti, J., van der Holt, B., Castellani, G., Bonello, F., Capra, A., Mai, E.K., Dürig, J., Gay, F., Zweegman, S., Cavo, M., Kaiser, M.F., Goldschmidt, H., Hernández Rivas, J.M., Larocca, A., Cook, G., San-Miguel, J.F., Boccadoro, M., Sonneveld, P., 2022. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project. *J. Clin. Oncol.* 40, 3406–3418. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02614>

Dai, H., Ding, H., Peterson, K.L., Meng, X.W., Schneider, P.A., Knorr, K.L.B., Kaufmann, S.H., 2018. Measurement of BH3-only protein tolerance. *Cell Death Differ.* 25, 282–293. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.156>

Dai, H., Meng, X.W., Kaufmann, S.H., 2016. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Research* 5, 2804. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9629.1>

Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E., Steenbergen, C., 2008. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ. Res.* 103, 983–991. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178970>

De Blasio, A., Vento, R., Di Fiore, R., 2018. Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer. *J. Cell. Physiol.* 233, 8482–8498. <https://doi.org/10.1002/jcp.26786>

De Pinto, V., Messina, A., Lane, D.J.R., Lawen, A., 2010. Voltage-dependent anion-selective

channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Lett.* 584, 1793–1799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.049>

De Pinto, V., Reina, S., Guarino, F., Messina, A., 2008. Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 139–147. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9140-3>

De Pinto, V., Tomasello, F., Messina, A., Guarino, F., Benz, R., La Mendola, D., Magri, A., Milardi, D., Pappalardo, G., 2007. Determination of the conformation of the human VDAC1 N-terminal peptide, a protein moiety essential for the functional properties of the pore. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 8, 744–756. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700009>

DeHart, D.N., Fang, D., Heslop, K., Li, L., Lemasters, J.J., Maldonado, E.N., 2018. Opening of voltage dependent anion channels promotes reactive oxygen species generation, mitochondrial dysfunction and cell death in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 148, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.022>

Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., Vaux, D.L., 2016. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 16, 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.17>

Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Cin, P.D., Shipp, M., Letai, A., 2007. BH3 Profiling Identifies Three Distinct Classes of Apoptotic Blocks to Predict Response to ABT-737 and Conventional Chemotherapeutic Agents. *Cancer Cell* 12, 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.001>

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., Kluck, R.M., 2008. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol. Cell* 30, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.005>

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., Kluck, R.M., 2012. Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* 19, 661–670. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.138>

Diepstraten, S.T., Anderson, M.A., Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., Kelly, G.L., 2022. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nat. Rev. Cancer* 22, 45–64. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00407-4>

Diepstraten, S.T., Chang, C., Tai, L., Gong, J.-N., Lan, P., Dowell, A.C., Taylor, G.S., Strasser, A., Kelly, G.L., 2020. BCL-W is dispensable for the sustained survival of select Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Blood Adv.* 4, 356–366. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000541>

Dimopoulos, M., Quach, H., Mateos, M.-V., Landgren, O., Leleu, X., Siegel, D., Weisel, K., Yang, H., Klippel, Z., Zahlten-Kumeli, A., Usmani, S.Z., 2020. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond. Engl.* 396, 186–197. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30734-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30734-0)

Dimopoulos, M.A., Moreau, P., Terpos, E., Mateos, M.-V., Zweegman, S., Cook, G., Delforge, M., Hájek, R., Schjesvold, F., Cavo, M., Goldschmidt, H., Facon, T., Einsele, H., Boccadoro, M., San-Miguel, J., Sonneveld, P., Mey, U., 2021. Multiple Myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *HemaSphere* 5, e528. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000528>

- Dimopoulos, M.A., Stewart, A.K., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., Hájek, R., Rosiñol, L., Siegel, D., Mihaylov, G.G., Goranova-Marinova, V., Rajnics, P., Suvorov, A., Niesvizky, R., Jakubowiak, A., San-Miguel, J., Ludwig, H., Palumbo, A., Obreja, M., Aggarwal, S., Moreau, P., 2017. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed multiple myeloma categorised by age: secondary analysis from the phase 3 ASPIRE study. *Br. J. Haematol.* 177, 404–413. <https://doi.org/10.1111/bjh.14549>
- Distelhorst, C.W., Bootman, M.D., 2011. Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca(2+) signaling and disease. *Cell Calcium* 50, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.011>
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Doerflinger, M., Glab, J.A., Puthalakath, H., 2015. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J.* 282, 1006–1016. <https://doi.org/10.1111/febs.13190>
- Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., Stockwell, B.R., 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3, 285–296. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00050-3)
- Donepudi, M., Grütter, M.G., 2002. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.*, Special issue in honour of John A Schellman 101–102, 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00151-5)
- D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., Chinnadurai, G., 1996. bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. *Cancer Res.* 56, 3879–3882.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., Kuwana, T., 2011. BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak*. *J. Biol. Chem.* 286, 491–501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167148>
- Dudko, H.V., Urban, V.A., Davidovskii, A.I., Veresov, V.G., 2020. Structure-based modeling of turnover of Bcl-2 family proteins bound to voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2): Implications for the mechanisms of proapoptotic activation of Bak and Bax in vivo. *Comput. Biol. Chem.* 85, 107203. <https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2020.107203>
- Durand, R., Descamps, G., Dousset, C., Bellanger, C., Maïga, S., Alberge, J.-B., Derrien, J., Cruard, J., Minvielle, S., Lilli, N.L., Godon, C., Le Bris, Y., Tessoulin, B., Amiot, M., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Moreau, P., Chiron, D., Moreau-Aubry, A., Pellat-Deceunynck, C., 2023. A p53 score derived from TP53 CRISPR/Cas9 HMCLs predicts survival and reveals major role of BAX in BH3 mimetics response. *Blood* blood.2023021581. <https://doi.org/10.1182/blood.2023021581>
- Durie, B.G.M., Harousseau, J.-L., Miguel, J.S., Bladé, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., Ludwig, H., Gahrton, G., Beksac, M., Crowley, J., Belch, A., Boccadaro, M., Turesson, I., Joshua, D., Vesole, D., Kyle, R., Alexanian, R., Tricot, G., Attal, M., Merlini, G., Powles, R., Richardson, P., Shimizu, K., Tosi, P., Morgan, G., Rajkumar, S.V., 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1467–1473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404284>
- Durie, B.G.M., Hoering, A., Abidi, M.H., Rajkumar, S.V., Epstein, J., Kahanic, S.P., Thakuri, M.,

- Reu, F., Reynolds, C.M., Sexton, R., Orlowski, R.Z., Barlogie, B., Dispenzieri, A., 2017. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 389, 519–527. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31594-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31594-X)
- Duru, A.D., Sutlu, T., Wallblom, A., Uttervall, K., Lund, J., Stellan, B., Gahrton, G., Nahi, H., Alici, E., 2015. Deletion of Chromosomal Region 8p21 Confers Resistance to Bortezomib and Is Associated with Upregulated Decoy TRAIL Receptor Expression in Patients with Multiple Myeloma. *PLoS One* 10, e0138248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138248>
- Eastman, A., 1993. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121, 160–164. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1141>
- Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, A., Simon, H.U., Kaufmann, T., 2013. Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ.* 20, 785–799. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.10>
- Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G.V., Foskett, J.K., White, C., 2010. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 13678–13684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096040>
- Eddy, M.T., Yu, T.-Y., Wagner, G., Griffin, R.G., 2019. Structural characterization of the human membrane protein VDAC2 in lipid bilayers by MAS NMR. *J. Biomol. NMR* 73, 451–460. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00242-8>
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Facon, T., Dimopoulos, M.-A., Leleu, X.P., Beksac, M., Pour, L., Hájek, R., Liu, Z., Minarik, J., Moreau, P., Romejko-Jarosinska, J., Spicka, I., Vorobyev, V.I., Besemer, B., Ishida, T., Janowski, W., Kalayoglu-Besisik, S., Parmar, G., Robak, P., Zamagni, E., Goldschmidt, H., Martin, T.G., Manier, S., Mohty, M., Oprea, C., Brégeault, M.-F., Macé, S., Berthou, C., Bregman, D., Klippel, Z., Orlowski, R.Z., IMROZ Study Group, 2024. Isatuximab, Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2400712>
- Facon, T., Kumar, S., Plesner, T., Orlowski, R.Z., Moreau, P., Bahlis, N., Basu, S., Nahi, H., Hulin, C., Quach, H., Goldschmidt, H., O'Dwyer, M., Perrot, A., Venner, C.P., Weisel, K., Mace, J.R., Raje, N., Attal, M., Tiab, M., Macro, M., Frenzel, L., Leleu, X., Ahmadi, T., Chiu, C., Wang, J., Van Rampelbergh, R., Uhlar, C.M., Kobos, R., Qi, M., Usmani, S.Z., 2019. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 380, 2104–2115. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817249>
- Facon, T., Venner, C.P., Bahlis, N.J., Offner, F., White, D.J., Karlin, L., Benboubker, L., Rigaudeau, S., Rodon, P., Voog, E., Yoon, S.-S., Suzuki, K., Shibayama, H., Zhang, X., Twumasi-Ankrah, P., Yung, G., Rifkin, R.M., Moreau, P., Lonial, S., Kumar, S.K., Richardson, P.G., Rajkumar, S.V., 2021. Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for transplant-ineligible patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 137, 3616–3628. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008787>
- Fan, M., Zhang, J., Tsai, C.-W., Orlando, B.J., Rodriguez, M., Xu, Y., Liao, M., Tsai, M.-F., Feng, L., 2020. Structure and mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter holocomplex. *Nature* 582, 129–133. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2309-6>

- Fang, D., Maldonado, E.N., 2018. VDAC Regulation: A Mitochondrial Target to Stop Cell Proliferation. *Adv. Cancer Res.* 138, 41–69. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.002>
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C., Brown, R., 1995. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731–733. <https://doi.org/10.1038/374731a0>
- Fernald, K., Kurokawa, M., 2013. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 23, 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Fernández de Larrea, C., Kyle, R., Rosiñol, L., Paiva, B., Engelhardt, M., Usmani, S., Caers, J., Gonsalves, W., Schjesvold, F., Merlini, G., Lentzsch, S., Ocio, E., Garderet, L., Moreau, P., Sonneveld, P., Badros, A., Gahrton, G., Goldschmidt, H., Tuchman, S., Einsele, H., Durie, B., Wirk, B., Musto, P., Hayden, P., Kaiser, M., Miguel, J.S., Bladé, J., Rajkumar, S.V., Mateos, M.V., 2021. Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage. *Blood Cancer J.* 11, 192. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00587-0>
- Ferrarini, I., Rigo, A., Visco, C., 2022. The mitochondrial anti-apoptotic dependencies of hematologic malignancies: from disease biology to advances in precision medicine. *Haematologica* 107, 790–802. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280201>
- Ferrer, P.E., Frederick, P., Gulbis, J.M., Dewson, G., Kluck, R.M., 2012. Translocation of a Bak C-terminus mutant from cytosol to mitochondria to mediate cytochrome C release: implications for Bak and Bax apoptotic function. *PLoS One* 7, e31510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031510>
- Fonseca, R., Debes-Marun, C.S., Picken, E.B., Dewald, G.W., Bryant, S.C., Winkler, J.M., Blood, E., Oken, M.M., Santana-Dávila, R., González-Paz, N., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Greipp, P.R., 2003. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 102, 2562–2567. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0493>
- Fonseca, R., Van Wier, S.A., Chng, W.J., Ketterling, R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Bergsagel, P.L., Rajkumar, S.V., Greipp, P.R., Litzow, M.R., Price-Troska, T., Henderson, K.J., Ahmann, G.J., Gertz, M.A., 2006. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 20, 2034–2040. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404403>
- Fonseca, Rodrigo, Zhu, Y.X., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Pandey, A., Mangalparthi, K., Chen, Yi, Tan, F., Anthony, S.P., Chen, Yu, Shen, Y., Dai, B., Braggio, E., Fonseca, Rafael, 2022. LP-118, a Novel BCL2 Inhibitor, Shows Potent in Vitro Anti-Myeloma Activity. *Blood, Annual Meeting Abstracts* 140, 7129–7130. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-167372>
- Fujiki, Y., Miyata, N., Mukai, S., Okumoto, K., Cheng, E.H., 2017. BAK regulates catalase release from peroxisomes. *Mol. Cell. Oncol.* 4, e1306610. <https://doi.org/10.1080/23723556.2017.1306610>
- Fukuhara, S., Rowley, J.D., 1978. Chromosome 14 translocations in non-Burkitt lymphomas. *Int. J. Cancer* 22, 14–21. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910220105>
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., Samali, A., 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>
- Galluzzi, L., Vitale, I., 2018. Oncogene-induced senescence and tumour control in complex biological systems. *Cell Death Differ.* 25, 1005–1006. <https://doi.org/10.1038/s41418-018->

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Gao, S., Fu, W., Dürrenberger, M., De Geyter, C., Zhang, H., 2005. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 62, 1015–1024. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4543-3>

Garrison, S.P., Jeffers, J.R., Yang, C., Nilsson, J.A., Hall, M.A., Rehg, J.E., Yue, W., Yu, J., Zhang, L., Onciu, M., Sample, J.T., Cleveland, J.L., Zambetti, G.P., 2008. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5391–5402. <https://doi.org/10.1128/MCB.00907-07>

Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Davis, M.L., Bird, G.H., Walensky, L.D., 2010. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol. Cell* 40, 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.019>

George, N.M., Evans, J.J.D., Luo, X., 2007. A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* 21, 1937–1948. <https://doi.org/10.1101/gad.1553607>

Giam, M., Huang, D.C.S., Bouillet, P., 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27 Suppl 1, S128-136. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.50>

Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., Cory, S., 1996. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665–675.

- Gincel, D., Shoshan-Barmatz, V., 2004. Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 179–186. <https://doi.org/10.1023/b:jobb.0000023621.72873.9e>
- Glaser, S.P., Lee, E.F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W.D., Izon, D.J., Zuber, J., Rappaport, A.R., Herold, M.J., Alexander, W.S., Lowe, S.W., Robb, L., Strasser, A., 2012. Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev.* 26, 120–125. <https://doi.org/10.1101/gad.182980.111>
- Gomez-Bougie, P., Amiot, M., 2013. Apoptotic Machinery Diversity in Multiple Myeloma Molecular Subtypes. *Front. Immunol.* 4, 467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00467>
- Gomez-Bougie, P., Halliez, M., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2016. Repression of Mcl-1 and disruption of the Mcl-1/Bak interaction in myeloma cells couple ER stress to mitochondrial apoptosis. *Cancer Lett.* 383, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.030>
- Gomez-Bougie, P., Maiga, S., Tessoulin, B., Bourcier, J., Bonnet, A., Rodriguez, M.S., Le Gouill, S., Touzeau, C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2018. BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment. *Blood* 132, 2656–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836718>
- Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., Amiot, M., 2007. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res.* 67, 5418–5424. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4322>
- Gong, J.-N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C.D., Garnier, J.-M., Khaw, S.L., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M.J., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., 2016. Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood* 128, 1834–1844. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704908>
- Gonsalves, W.I., Rajkumar, S.V., Go, R.S., Dispenzieri, A., Gupta, V., Singh, P.P., Buadi, F.K., Lacy, M.Q., Kapoor, P., Dingli, D., Lust, J.A., Zeldenrust, S.R., Hayman, S.R., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Kumar, S.K., 2014. Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis. *Blood* 124, 907–912. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-565051>
- Gowin, K., Skerget, S., Keats, J.J., Mikhael, J., Cowan, A.J., 2021. Plasma cell leukemia: A review of the molecular classification, diagnosis, and evidenced-based treatment. *Leuk. Res.* 111, 106687. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106687>
- Granell, M., Calvo, X., Garcia-Guiñón, A., Escoda, L., Abella, E., Martínez, C.M., Teixidó, M., Gimenez, M.T., Senín, A., Sanz, P., Campoy, D., Vicent, A., Arenillas, L., Rosiñol, L., Sierra, J., Bladé, J., de Larrea, C.F., 2017. Prognostic impact of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: implications for plasma cell leukemia definition. *Haematologica* 102, 1099–1104. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.158303>
- Gress, V., Roussy, M., Boulianne, L., Bilodeau, M., Cardin, S., El-Hachem, N., Lisi, V., Khakipoor, B., Rouette, A., Farah, A., Thérêt, L., Aubert, L., Fatima, F., Audemard, É., Thibault, P., Bonneil, É., Chagraoui, J., Laramée, L., Gendron, P., Jouan, L., Jammali, S., Paré, B., Simpson, S.M., Tran, T.H., Duval, M., Teira, P., Bittencourt, H., Santiago, R., Barabé, F., Sauvageau, G., Smith, M.A., Hébert, J., Roux, P.P., Gruber, T.A., Lavallée, V.-P., Wilhelm, B.T., Cellot, S., 2023. CBFA2T3::GLIS2 pediatric acute megakaryoblastic leukemia is sensitive to BCL-XL inhibition by navitoclax and DT2216. *Blood Adv.* 8, 112–129.

<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008899>

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., Hickman, J.A., 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.5.903>

Grills, C., Jithesh, P.V., Blayney, J., Zhang, S.-D., Fennell, D.A., 2011. Gene expression meta-analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer. *PLoS One* 6, e14635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014635>

Große, L., Wurm, C.A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D.C., Jakobs, S., 2016. Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J.* 35, 402–413. <https://doi.org/10.15252/embj.201592789>

GTEX Consortium, 2015. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* 348, 648–660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>

Guicciardi, M.E., Gores, G.J., 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>

Gundesen, M.T., Lund, T., Moeller, H.E.H., Abildgaard, N., 2019. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 8. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0754-x>

Gutman, D., Morales, A.A., Boise, L.H., 2009. Acquisition of a Multidrug Resistant Phenotype with a Proteasome Inhibitor in Multiple Myeloma. *Leukemia* 23, 2181–2183. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.123>

Ha, H., Hajek, P., Bedwell, D.M., Burrows, P.D., 1993. A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins. *J. Biol. Chem.* 268, 12143–12149. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50319-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50319-2)

Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E., 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278, 5557–5563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210269200>

Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu, L., Chittenden, T., 2001. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11318–11323. <https://doi.org/10.1073/pnas.201208798>

Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanamura, I., Iida, S., Akano, Y., Hayami, Y., Kato, M., Miura, K., Harada, S., Banno, S., Wakita, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Shimizu, S., Sonta, S., Nitta, M., Taniwaki, M., Ueda, R., 2001. Ectopic Expression of MAFB Gene in Human Myeloma Cells Carrying (14;20)(q32;q11) Chromosomal Translocations. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 92, 638–644. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01142.x>

Hartman, M.L., Czyz, M., 2020. BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease. *Cell Death Dis.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2417-0>

- Hausmann, G., O'Reilly, L.A., van Driel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M., Huang, D.C., 2000. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J. Cell Biol.* 149, 623–634. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.3.623>
- He, Y., Khan, S., Huo, Z., Lv, D., Zhang, X., Liu, X., Yuan, Y., Hromas, R., Xu, M., Zheng, G., Zhou, D., 2020. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) are emerging therapeutics for hematologic malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 13, 103. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00924-z>
- Heslop, K.A., Milesi, V., Maldonado, E.N., 2021. VDAC Modulation of Cancer Metabolism: Advances and Therapeutic Challenges. *Front. Physiol.* 12, 742839. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.742839>
- Hiller, S., Abramson, J., Mannella, C., Wagner, G., Zeth, K., 2010. The 3D structures of VDAC represent a native conformation. *Trends Biochem. Sci.* 35, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.005>
- Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M., Wagner, G., 2008. Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* 321, 1206–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1161302>
- Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C.S., Day, C.L., 2007. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ.* 14, 128–136. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401934>
- Hinsch, K.D., Asmarinah, null, Hinsch, E., Konrad, L., 2001. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1518, 329–333. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00199-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00199-3)
- Horvitz, H.R., 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59, 1701s–1706s.
- Hosaka, T., Okazaki, M., Kimura-Someya, T., Ishizuka-Katsura, Y., Ito, K., Yokoyama, S., Dodo, K., Sodeoka, M., Shirouzu, M., 2017. Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 26, 1749–1758. <https://doi.org/10.1002/pro.3211>
- Hosoi, K.-I., Miyata, N., Mukai, S., Furuki, S., Okumoto, K., Cheng, E.H., Fujiki, Y., 2017. The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability. *J. Cell Biol.* 216, 709–722. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605002>
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A.J., 1997. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12401–12406. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12401>
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., Youle, R.J., 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3668–3672.
- Huang, A.S., Chin, H.S., Reljic, B., Djajawi, T.M., Tan, I.K.L., Gong, J.-N., Stroud, D.A., Huang, D.C.S., van Delft, M.F., Dewson, G., 2023. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCHF5 controls BAK apoptotic activity independently of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 30, 632–646. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01067-z>

- Huang, H., Shah, K., Bradbury, N.A., Li, C., White, C., 2014. Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca²⁺ uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death Dis.* 5, e1482. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.419>
- Huang, H.-T., Dobrovolsky, D., Paulk, J., Yang, G., Weisberg, E.L., Doctor, Z.M., Buckley, D.L., Cho, J.-H., Ko, E., Jang, J., Shi, K., Choi, H.G., Griffin, J.D., Li, Y., Treon, S.P., Fischer, E.S., Bradner, J.E., Tan, L., Gray, N.S., 2018. A Chemoproteomic Approach to Query the Degradable Kinome Using a Multi-kinase Degradator. *Cell Chem. Biol.* 25, 88-99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.005>
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Staudt, L.M., 2004. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 5, 191–199. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00019-4)
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., Núñez, G., 1997. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J.* 16, 1686–1694. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.7.1686>
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., Handa, H., 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327, 1345–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1177319>
- Iyer, S., Uren, R.T., Dengler, M.A., Shi, M.X., Uno, E., Adams, J.M., Dewson, G., Kluck, R.M., 2020. Robust autoactivation for apoptosis by BAK but not BAX highlights BAK as an important therapeutic target. *Cell Death Dis.* 11, 268. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2463-7>
- Jagannath, S., Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Cowan, J.M., Anderson, K.C., 2007. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia* 21, 151–157. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404442>
- Jaiswal, Arunima, Jaiswal, Aruna, Williamson, E.A., Gelfond, J., Zheng, G., Zhou, D., Hromas, R., 2023. Resistance to the BCL-XL degrader DT2216 in T-cell acute lymphoblastic leukemia is rare and correlates with decreased BCL-XL proteolysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 91, 89–95. <https://doi.org/10.1007/s00280-022-04490-8>
- Jenkins, L.J., Luk, I.Y., Chionh, F., Tan, T., Needham, K., Ayton, J., Reehorst, C.M., Vukelic, N., Sieber, O.M., Mouradov, D., Gibbs, P., Williams, D.S., Tebbutt, N.C., Desai, J., Hollande, F., Dhillon, A.S., Lee, E.F., Merino, D., Fairlie, W.D., Mariadason, J.M., 2024. BCL-XL inhibitors enhance the apoptotic efficacy of BRAF inhibitors in BRAFV600E colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06478-z>
- Jenner, M.W., Leone, P.E., Walker, B.A., Ross, F.M., Johnson, D.C., Gonzalez, D., Chiecchio, L., Dachs Cabanas, E., Dagrada, G.P., Nightingale, M., Protheroe, R.K.M., Stockley, D., Else, M., Dickens, N.J., Cross, N.C.P., Davies, F.E., Morgan, G.J., 2007. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood* 110, 3291–3300. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-075069>
- Jin, P., Jiang, J., Zhou, L., Huang, Z., Nice, E.C., Huang, C., Fu, L., 2022. Mitochondrial adaptation in cancer drug resistance: prevalence, mechanisms, and management. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 15, 97. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01313-4>
- Johnsen, H.E., Bergkvist, K.S., Schmitz, A., Kjeldsen, M.K., Hansen, S.M., Gaihede, M.,

- Nørgaard, M.A., Bæch, J., Grønholdt, M.-L., Jensen, F.S., Johansen, P., Bødker, J.S., Bøgsted, M., Dybkær, K., 2014. Cell of origin associated classification of B-cell malignancies by gene signatures of the normal B-cell hierarchy. *Leuk. Lymphoma* 55, 1251–1260. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.839785>
- Josefsson, E.C., James, C., Henley, K.J., Debrincat, M.A., Rogers, K.L., Dowling, M.R., White, M.J., Kruse, E.A., Lane, R.M., Ellis, S., Nurden, P., Mason, K.D., O'Reilly, L.A., Roberts, A.W., Metcalf, D., Huang, D.C.S., Kile, B.T., 2011. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med.* 208, 2017–2031. <https://doi.org/10.1084/jem.20110750>
- Jovanović, K.K., Escure, G., Demonchy, J., Willaume, A., Van de Wyngaert, Z., Farhat, M., Chauvet, P., Facon, T., Quesnel, B., Manier, S., 2019. Deregulation and Targeting of TP53 Pathway in Multiple Myeloma. *Front. Oncol.* 8, 665. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00665>
- Jóźwiak, P., Ciesielski, P., Forma, E., Kozal, K., Wójcik-Krowiranda, K., Cwonda, Ł., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., Krześlak, A., 2020. Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer and its potential prognostic significance. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 42, 1010428320951057. <https://doi.org/10.1177/1010428320951057>
- Jung, S.-H., Lee, J.-J., 2022. Update on primary plasma cell leukemia. *Blood Res.* 57, 62–66. <https://doi.org/10.5045/br.2022.2022033>
- Kabir, S., Cidado, J., Andersen, C., Dick, C., Lin, P.-C., Mitros, T., Ma, H., Baik, S.H., Belmonte, M.A., Drew, L., Corn, J.E., 2019. The CUL5 ubiquitin ligase complex mediates resistance to CDK9 and MCL1 inhibitors in lung cancer cells. *eLife* 8, e44288. <https://doi.org/10.7554/eLife.44288>
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W., 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 25, 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Kaloni, D., Diepstraten, S.T., Strasser, A., Kelly, G.L., 2023. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 28, 20–38. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01780-7>
- Kanwar, P., Samtani, H., Sanyal, S.K., Srivastava, A.K., Suprasanna, P., Pandey, G.K., 2020. VDAC and its interacting partners in plant and animal systems: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40, 715–732. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1756214>
- Karst, A.M., Dai, D.L., Martinka, M., Li, G., 2005. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene* 24, 1111–1116. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208374>
- Kashyap, D., Garg, V.K., Goel, N., 2021. Chapter Four - Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis, in: Donev, R. (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Apoptosis in Health and Disease - Part A*. Academic Press, pp. 73–120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
- Katodritou, E., Terpos, E., Kelaidi, C., Kotsopoulou, M., Delimpasi, S., Kyrtsionis, M.-C., Symeonidis, A., Giannakoulas, N., Stefanoudaki, A., Christoulas, D., Chatziaggelidou, C., Gastari, V., Spyridis, N., Verrou, E., Konstantinidou, P., Zervas, K., Dimopoulos, M.A., 2014. Treatment with bortezomib-based regimens improves overall response and predicts for survival in patients with primary or secondary plasma cell leukemia: Analysis of the Greek myeloma study group. *Am. J. Hematol.* 89, 145–150. <https://doi.org/10.1002/ajh.23600>

- Kaufman, G.P., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Buadi, F.K., Dingli, D., Hayman, S.R., Kapoor, P., Lust, J.A., Russell, S., Go, R.S., Hwa, Y.L., Kyle, R.A., Rajkumar, S.V., Kumar, S.K., 2016. Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 30, 633–639. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.287>
- Ke, F.F.S., Vanyai, H.K., Cowan, A.D., Delbridge, A.R.D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P.E., Voss, A.K., Strasser, A., 2018. Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* 173, 1217–1230.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.036>
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.-J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.-X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.-X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A.K., Carpten, J., Bergsagel, P.L., 2007. Promiscuous Mutations Activate the Non-Canonical NF- κ B Pathway in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 12, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.003>
- Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., Belch, A.R., Pilarski, L.M., 2003. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 101, 1520–1529. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1675>
- Keinan, N., Tyomkin, D., Shoshan-Barmatz, V., 2010. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5698–5709. <https://doi.org/10.1128/MCB.00165-10>
- Kelly, P.N., Strasser, A., 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18, 1414–1424. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.17>
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Khan, S., Cao, L., Wiegand, J., Zhang, P., Zajac-Kaye, M., Kaye, F.J., Zheng, G., Zhou, D., 2024. PROTAC-Mediated Dual Degradation of BCL-xL and BCL-2 Is a Highly Effective Therapeutic Strategy in Small-Cell Lung Cancer. *Cells* 13, 528. <https://doi.org/10.3390/cells13060528>
- Khan, S., Wiegand, J., Zhang, P., Hu, W., Thummuri, D., Budamagunta, V., Hua, N., Jin, L., Allegra, C.J., Kopetz, S.E., Zajac-Kaye, M., Kaye, F.J., Zheng, G., Zhou, D., 2022. BCL-XL PROTAC degrader DT2216 synergizes with sotorasib in preclinical models of KRASG12C-mutated cancers. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 15, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01241-3>
- Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J.S., Pei, J., Zhang, W., Sharma, A., McCurdy, C.R., Kuruvilla, V.M., Baran, N., Ferrando, A.A., Kim, Y.-M., Rogojina, A., Houghton, P.J., Huang, G., Hromas, R., Konopleva, M., Zheng, G., Zhou, D., 2019. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat. Med.* 25, 1938–1947. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0668-z>
- Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J., 1995. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736–739. <https://doi.org/10.1038/374736a0>
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., Cheng,

- E.H.-Y., 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 8, 1348–1358. <https://doi.org/10.1038/ncb1499>
- Kim, J.-H., Bae, J., 2013. MCL-1ES Induces MCL-1L-Dependent BAX- and BAK-Independent Mitochondrial Apoptosis. *PLoS ONE* 8, e79626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079626>
- Kline, M.P., Rajkumar, S.V., Timm, M.M., Kimlinger, T.K., Haug, J.L., Lust, J.A., Greipp, P.R., Kumar, S., 2007. ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 21, 1549–1560. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404719>
- Klingenberg, M., 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1978–2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>
- Knight, T., Luedtke, D., Edwards, H., Taub, J.W., Ge, Y., 2019. A delicate balance – The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol., Canonical, non-canonical and immunogenic cell death: Basic mechanisms and translational applications* 162, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.015>
- Kolb, R., De, U., Khan, S., Luo, Y., Kim, M.-C., Yu, H., Wu, C., Mo, J., Zhang, X., Zhang, P., Zhang, Xuan, Borcherdig, N., Koppel, D., Fu, Y.-X., Zheng, S.G., Avram, D., Zheng, G., Zhou, D., Zhang, W., 2021. Proteolysis-targeting chimera against BCL-XL destroys tumor-infiltrating regulatory T cells. *Nat. Commun.* 12, 1281. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21573-x>
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z.B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I., Matassova, N., Smith, J., Pedder, C., Graham, C., Studeny, A., Lysiak-Auvity, G., Girard, A.-M., Gravé, F., Segal, D., Riffkin, C.D., Pomilio, G., Galbraith, L.C.A., Aubrey, B.J., Brennan, M.S., Herold, M.J., Chang, C., Guasconi, G., Cauquil, N., Melchiorre, F., Guigal-Stephan, N., Lockhart, B., Colland, F., Hickman, J.A., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., Wei, A.H., Strasser, A., Lessene, G., Geneste, O., 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477–482. <https://doi.org/10.1038/nature19830>
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig, R.W., 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3516–3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., Reed, J.C., 1995. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* 146, 1309–1319.
- Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* 2, 175–187. <https://doi.org/10.1038/nrc746>
- Kumar, S., Fonseca, R., Ketterling, R.P., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Gertz, M.A., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Dingli, D., Knudson, R.A., Greenberg, A., Russell, S.J., Zeldenrust, S.R., Lust, J.A., Kyle, R.A., Bergsagel, L., Rajkumar, S.V., 2012. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 119, 2100–2105. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390658>
- Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Gertz, M.A., Buadi, F.K., Pandey, S., Kapoor, P., Dingli, D., Hayman, S.R., Leung, N., Lust, J., McCurdy, A., Russell, S.J., Zeldenrust, S.R., Kyle, R.A., Rajkumar, S.V., 2014. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes

in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 28, 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.313>

Kumar, S.K., Harrison, S.J., Cavo, M., de la Rubia, J., Popat, R., Gasparetto, C., Hungria, V., Salwender, H., Suzuki, K., Kim, I., Punnoose, E.A., Hong, W.-J., Freise, K.J., Yang, X., Sood, A., Jalaluddin, M., Ross, J.A., Ward, J.E., Maciag, P.C., Moreau, P., 2020. Venetoclax or placebo in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (BELLINI): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 21, 1630–1642. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30525-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30525-8)

Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., Anderson, K.C., 2017. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>

Kupsh, A., Arnall, J., Voorhees, P., 2020. A successful case of venetoclax-based therapy in relapsed/refractory secondary plasma cell leukemia. *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.* 26, 1274–1278. <https://doi.org/10.1177/1078155219895072>

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 17, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.003>

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331–342. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01036-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01036-x)

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., Colman, P.M., 2008. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.* 15, 1564–1571. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.83>

Kyle, R.A., Larson, D.R., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kumar, S., Cerhan, J.R., Rajkumar, S.V., 2018. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N. Engl. J. Med.* 378, 241–249. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709974>

Kyle, R.A., Maldonado, J.E., Bayrd, E.D., 1974. Plasma Cell Leukemia: Report on 17 Cases. *Arch. Intern. Med.* 133, 813–818. <https://doi.org/10.1001/archinte.133.5.813>

Lai, A.C., Toure, M., Hellerschmied, D., Salami, J., Jaime-Figueroa, S., Ko, E., Hines, J., Crews, C.M., 2016. Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 55, 807–810. <https://doi.org/10.1002/anie.201507634>

Lai, X., Chen, S., 2015. Identification of Novel Biomarker and Therapeutic Target Candidates for Diagnosis and Treatment of Follicular Adenoma. *Cancer Genomics Proteomics* 12, 271–281.

Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., Hoover, R., Rajkumar, S.V., 2009. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 113, 5412–5417. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194241>

Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M., Dorr, R.T., 2005. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res.* 65, 3828–3836. <https://doi.org/10.1158/0008->

Lauterwasser, J., Todt, F., Zerbes, R.M., Nguyen, T.N., Craigen, W., Lazarou, M., van der Laan, M., Edlich, F., 2016. The porin VDAC2 is the mitochondrial platform for Bax retrotranslocation. *Sci. Rep.* 6, 32994. <https://doi.org/10.1038/srep32994>

Lazarou, M., Stojanovski, D., Frazier, A.E., Kotevski, A., Dewson, G., Craigen, W.J., Kluck, R.M., Vaux, D.L., Ryan, M.T., 2010. Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J. Biol. Chem.* 285, 36876–36883. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159301>

Lee, E.F., Fairlie, W.D., 2019. The Structural Biology of Bcl-xL. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092234>

Lee, E.F., Grabow, S., Chappaz, S., Dewson, G., Hockings, C., Kluck, R.M., Debrincat, M.A., Gray, D.H., Witkowski, M.T., Evangelista, M., Pettikiriachchi, A., Bouillet, P., Lane, R.M., Czabotar, P.E., Colman, P.M., Smith, B.J., Kile, B.T., Fairlie, W.D., 2016. Physiological restraint of Bak by Bcl-xL is essential for cell survival. *Genes Dev.* 30, 1240–1250. <https://doi.org/10.1101/gad.279414.116>

Leiter, U., Schmid, R.M., Kaskel, P., Peter, R.U., Krähn, G., 2000. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s004030050479>

Lemasters, J.J., 2017. Evolution of Voltage-Dependent Anion Channel Function: From Molecular Sieve to Governor to Actuator of Ferroptosis. *Front. Oncol.* 7, 303. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00303>

Lemeshko, V.V., 2021. Electrical control of the cell energy metabolism at the level of mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863, 183493. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183493>

Lesokhin, A.M., Tomasson, M.H., Arnulf, B., Bahlis, N.J., Miles Prince, H., Niesvizky, R., Rodríguez-Otero, P., Martínez-Lopez, J., Koehne, G., Touzeau, C., Jethava, Y., Quach, H., Depaus, J., Yokoyama, H., Gabayan, A.E., Stevens, D.A., Nooka, A.K., Manier, S., Raje, N., Iida, S., Raab, M.-S., Searle, E., Leip, E., Sullivan, S.T., Conte, U., Elmeliegy, M., Czibere, A., Viqueira, A., Mohty, M., 2023. Elranatamab in relapsed or refractory multiple myeloma: phase 2 MagnetisMM-3 trial results. *Nat. Med.* 29, 2259–2267. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02528-9>

Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., Flygare, J.A., Gibbons, P., Kersten, W.J.A., Kulasegaram, S., Moss, R.M., Parisot, J.P., Smith, B.J., Street, I.P., Yang, H., Huang, D.C.S., Watson, K.G., 2013. Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 9, 390–397. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1246>

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J., 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00127-7)

Levenson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., Kovar, P., Tanaka, A., Bruncko, M., Sheppard, G.S., Wang, L., Gierke, S., Kategaya, L., Anderson, D.J., Wong, C., Eastham-Anderson, J., Ludlam, M.J.C., Sampath, D., Fairbrother, W.J., Wertz, I., Rosenberg, S.H., Tse, C., Elmore, S.W., Souers, A.J., 2015. Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity

as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* 6, e1590. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.561>

Li, C., Wang, X., Vais, H., Thompson, C.B., Foskett, J.K., White, C., 2007. Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12565–12570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702489104>

Li, T., Chen, J., Zeng, Z., 2021. Pathophysiological role of calcium channels and transporters in the multiple myeloma. *Cell Commun. Signal.* CCS 19, 99. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00781-4>

Liebisch, P., Scheck, D., Ern , S.A., Wellmann, A., Wendl, C., Janczik, S., Kolmus, S., Kr ber, A., Einsele, H., Straka, C., Goldschmidt, H., Benner, A., Stilgenbauer, S., D hner, H., 2005. Duplication of chromosome arms 9q and 11q: evidence for a novel, 14q32 translocation-independent pathogenetic pathway in multiple myeloma. *Genes. Chromosomes Cancer* 42, 78–81. <https://doi.org/10.1002/gcc.20098>

Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., Prystowsky, M.B., 1993. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 1979–1988.

Lin, Y.-H.T., Way, G.P., Barwick, B.G., Mariano, M.C., Marcoulis, M., Ferguson, I.D., Driessen, C., Boise, L.H., Greene, C.S., Wiita, A.P., 2019. Integrated phosphoproteomics and transcriptional classifiers reveal hidden RAS signaling dynamics in multiple myeloma. *Blood Adv.* 3, 3214–3227. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000303>

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* 6, 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00136-2)

Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., Strasser, A., 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 411–417.

Liu, B., Wang, P., Wang, Z., Zhang, W., 2011. The use of anti-VDAC2 antibody for the combined assessment of human sperm acrosome integrity and ionophore A23187-induced acrosome reaction. *PloS One* 6, e16985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016985>

Liu, S., Ishikawa, H., Tsuyama, N., Li, F.-J., Abroun, S., Otsuyama, K., Zheng, X., Ma, Z., Maki, Y., Iqbal, M.S., Obata, M., Kawano, M.M., 2006. Increased susceptibility to apoptosis in CD45+ myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* 25, 419–429. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208982>

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., Green, D.R., 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.001>

Llambi, F., Wang, Y.-M., Victor, B., Yang, M., Schneider, D.M., Gingras, S., Parsons, M.J., Zheng, J.H., Brown, S.A., Pelletier, S., Moldoveanu, T., Chen, T., Green, D.R., 2016. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell* 165, 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.026>

- Lokhorst, H.M., Plesner, T., Laubach, J.P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M.C., Lassen, U., Krejci, J., Palumbo, A., van de Donk, N.W.C.J., Ahmadi, T., Khan, I., Uhlar, C.M., Wang, J., Sasser, A.K., Losic, N., Lisby, S., Basse, L., Brun, N., Richardson, P.G., 2015. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 1207–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506348>
- Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M.-V., Magen, H., Belch, A., Reece, D., Beksac, M., Spencer, A., Oakervee, H., Orłowski, R.Z., Taniwaki, M., Röllig, C., Einsele, H., Wu, K.L., Singhal, A., San-Miguel, J., Matsumoto, M., Katz, J., Bleickardt, E., Poulart, V., Anderson, K.C., Richardson, P., ELOQUENT-2 Investigators, 2015. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 621–631. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505654>
- Lonial, S., Lee, H.C., Badros, A., Trudel, S., Nooka, A.K., Chari, A., Abdallah, A.-O., Callander, N., Lendvai, N., Sborov, D., Suvannasankha, A., Weisel, K., Karlin, L., Libby, E., Arnulf, B., Facon, T., Hulin, C., Kortüm, K.M., Rodríguez-Otero, P., Usmani, S.Z., Hari, P., Baz, R., Quach, H., Moreau, P., Voorhees, P.M., Gupta, I., Hoos, A., Zhi, E., Baron, J., Piontek, T., Lewis, E., Jewell, R.C., Dettman, E.J., Papat, R., Esposti, S.D., Opalinska, J., Richardson, P., Cohen, A.D., 2020. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 21, 207–221. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30788-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30788-0)
- Lossi, L., 2022. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochem. J.* 479, 357–384. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., Andrews, D.W., 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.010>
- Lu, G., Middleton, R.E., Sun, H., Naniong, M., Ott, C.J., Mitsiades, C.S., Wong, K.-K., Bradner, J.E., Kaelin, W.G., 2014. The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science* 343, 305–309. <https://doi.org/10.1126/science.1244917>
- Lu, J., Qian, Y., Altieri, M., Dong, H., Wang, J., Raina, K., Hines, J., Winkler, J.D., Crew, A.P., Coleman, K., Crews, C.M., 2015. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* 22, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.009>
- Luo, Q., Pan, W., Zhou, S., Wang, G., Yi, H., Zhang, L., Yan, X., Yuan, L., Liu, Z., Wang, J., Chen, H., Qiu, M., Yang, D., Sun, J., 2020. A Novel BCL-2 Inhibitor APG-2575 Exerts Synthetic Lethality With BTK or MDM2-p53 Inhibitor in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncol. Res.* 28, 331–344. <https://doi.org/10.3727/096504020X15825405463920>
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81589-5)
- Luo, X., O'Neill, K.L., Huang, K., 2020. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? *F1000Research* 9, F1000 Faculty Rev-935. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25607.1>
- Lutter, M., Perkins, G.A., Wang, X., 2001. The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.* 2, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-2-22>
- Ma, S., Hockings, C., Anwari, K., Kratina, T., Fennell, S., Lazarou, M., Ryan, M.T., Kluck, R.M.,

- Dewson, G., 2013. Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the Bak protein $\alpha 6$ helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 26027–26038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490094>
- Ma, S., Seymour, J.F., Brander, D.M., Kipps, T.J., Choi, M.Y., Anderson, M.A., Humphrey, K., Al Masud, A., Pesko, J., Nandam, R., Salem, A.H., Chyla, B., Arzt, J., Jacobson, A., Kim, S.Y., Roberts, A.W., 2021. Efficacy of venetoclax plus rituximab for relapsed CLL: 5-year follow-up of continuous or limited-duration therapy. *Blood* 138, 836–846. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009578>
- Ma, S.B., Nguyen, T.N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D.A., Menard, M., Kluck, R.M., Ryan, M.T., Dewson, G., 2014. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* 21, 1925–1935. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.119>
- Ma, Y., Han, B., Yu, Q., Zha, N., Deng, Z., Liang, J., Yu, R., 2024. Single-cell and bulk RNA sequencing data jointly reveals *VDAC2*'s impacts on prognosis and immune landscape of NSCLC. *Aging* 16, 3160–3184. <https://doi.org/10.18632/aging.205517>
- Magrì, A., Reina, S., De Pinto, V., 2018. VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis. *Front. Chem.* 6, 108. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00108>
- Maldonado, E.N., Sheldon, K.L., DeHart, D.N., Patnaik, J., Manevich, Y., Townsend, D.M., Bezrukov, S.M., Rostovtseva, T.K., Lemasters, J.J., 2013. Voltage-dependent anion channels modulate mitochondrial metabolism in cancer cells: regulation by free tubulin and erastin. *J. Biol. Chem.* 288, 11920–11929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433847>
- Mandal, T., Shin, S., Aluvila, S., Chen, H.-C., Grieve, C., Choe, J.-Y., Cheng, E.H., Hustedt, E.J., Oh, K.J., 2016. Assembly of Bak homodimers into higher order homooligomers in the mitochondrial apoptotic pore. *Sci. Rep.* 6, 30763. <https://doi.org/10.1038/srep30763>
- Mannella, C.A., 2021. VDAC-A Primal Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1685. <https://doi.org/10.3390/ijms22041685>
- Mannella, C.A., 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 542–548. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.006>
- Mannella, C.A., 1996. Mitochondrial channels revisited. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 89–91. <https://doi.org/10.1007/BF02110637>
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., Lemoine, N.R., 2002. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3577–3589. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.11.3577-3589.2002>
- Martin, S.S., Ridgeway, A.G., Pinkas, J., Lu, Y., Reginato, M.J., Koh, E.Y., Michelman, M., Daley, G.Q., Brugge, J.S., Leder, P., 2004. A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. *Oncogene* 23, 4641–4645. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207595>
- Martin, T., Baz, R., Benson, D.M., Lendvai, N., Wolf, J., Munster, P., Lesokhin, A.M., Wack, C., Charpentier, E., Campana, F., Vij, R., 2017. A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 129, 3294–3303. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-740787>
- Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control

physiology and disease. *Nat. Commun.* 11, 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

Mateos, M.-V., Kumar, S., Dimopoulos, M.A., González-Calle, V., Kastritis, E., Hajek, R., De Larrea, C.F., Morgan, G.J., Merlini, G., Goldschmidt, H., Galdes, C., Gozzetti, A., Kyriakou, C., Garderet, L., Hansson, M., Zamagni, E., Fantl, D., Leleu, X., Kim, B.-S., Esteves, G., Ludwig, H., Usmani, S., Min, C.-K., Qi, M., Ukropec, J., Weiss, B.M., Rajkumar, S.V., Durie, B.G.M., San-Miguel, J., 2020. International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer J.* 10, 102. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00366-3>

Mathupala, S., Ko, Y., Pedersen, P., 2006. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25, 4777–4786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209603>

Mato, E., Barceló-Batllori, S., Orera, I., Selva, L., Corra, M., González, C., Bell, O., Lerma, E., Moral, A., Pérez, J.I., de Leiva, A., 2015. The proteomic 2D-DIGE approach reveals the protein voltage-dependent anion channel 2 as a potential therapeutic target in epithelial thyroid tumours. *Mol. Cell. Endocrinol.* 404, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.021>

Matulis, S.M., Gupta, V.A., Neri, P., Bahlis, N.J., Maciag, P., Levenson, J.D., Heffner, L.T., Lonial, S., Nooka, A.K., Kaufman, J.L., Boise, L.H., 2019. Functional profiling of venetoclax sensitivity can predict clinical response in multiple myeloma. *Leukemia* 33, 1291–1296. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0374-8>

McCarthy, P.L., Owzar, K., Hofmeister, C.C., Hurd, D.D., Hassoun, H., Richardson, P.G., Giralt, S., Stadtmauer, E.A., Weisdorf, D.J., Vij, R., Moreb, J.S., Callander, N.S., Van Besien, K., Gentile, T., Isola, L., Maziarz, R.T., Gabriel, D.A., Bashey, A., Landau, H., Martin, T., Qazilbash, M.H., Levitan, D., McClune, B., Schlossman, R., Hars, V., Postiglione, J., Jiang, C., Bennett, E., Barry, S., Bressler, L., Kelly, M., Seiler, M., Rosenbaum, C., Hari, P., Pasquini, M.C., Horowitz, M.M., Shea, T.C., Devine, S.M., Anderson, K.C., Linker, C., 2012. Lenalidomide after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 366, 1770–1781. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114083>

McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., Korsmeyer, S.J., 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79–88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90174-8)

Medina-Herrera, A., Sarasquete, M.E., Jiménez, C., Puig, N., García-Sanz, R., 2023. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Past, Present, and Future. *Cancers* 15, 3687. <https://doi.org/10.3390/cancers15143687>

Mérino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* 186, 355–362. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905153>

Merino, D., Kelly, G.L., Lessene, G., Wei, A.H., Roberts, A.W., Strasser, A., 2018. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell* 34, 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.004>

Merry, D.E., Veis, D.J., Hickey, W.F., Korsmeyer, S.J., 1994. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Dev. Camb. Engl.* 120, 301–311. <https://doi.org/10.1242/dev.120.2.301>

Messina, A., Oliva, M., Rosato, C., Huizinga, M., Ruitenberg, W., van den Heuvel, L.P., Forte,

- M., Rocchi, M., De Pinto, V., 1999. Mapping of the Human Voltage-Dependent Anion Channel Isoforms 1 and 2 Reconsidered. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 707–710. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.0136>
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., De Pinto, V., 2012. VDAC isoforms in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1466–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., Magri, A., Tomasello, F., Clark, R.E., Ramsay, R.R., De Pinto, V., 2014. Live cell interactome of the human voltage dependent anion channel 3 (VDAC3) revealed in HeLa cells by affinity purification tag technique. *Mol. Biosyst.* 10, 2134–2145. <https://doi.org/10.1039/c4mb00237g>
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., Rosenwald, A., Sugimoto, K.-J., Wheat, L.M., Karran, E.L., García, J.F., Sanchez, L., Prosper, F., Staudt, L.M., Pinkel, D., Dyer, M.J.S., Martínez-Climent, J.A., 2007. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109, 271–280. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-026500>
- Min, C.K., Yeom, D.R., Lee, K.-E., Kwon, H.-K., Kang, M., Kim, Y.-S., Park, Z.Y., Jeon, H., Kim, D.H., 2012. Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca²⁺ transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochem. J.* 447, 371–379. <https://doi.org/10.1042/BJ20120705>
- Mina, R., D'Agostino, M., Cerrato, C., Gay, F., Palumbo, A., 2017. Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leuk. Lymphoma* 58, 1538–1547. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1250263>
- Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Aupérin, A., Viguier, J., Velasco, V., Duvillard, P., Praz, F., Sabourin, J.-C., 2005. Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am. J. Clin. Pathol.* 123, 562–570. <https://doi.org/10.1309/JQ2X-3RV3-L8F9-TGYW>
- Mittal, P., Singh, S., Sinha, R., Shrivastava, A., Singh, A., Singh, I.K., 2021. Myeloid cell leukemia 1 (MCL-1): Structural characteristics and application in cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* 187, 999–1018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.166>
- Mj, S., Rs, L., Wj, C., 1997. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J. Biol. Chem.* 272. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18966>
- Moldoveanu, T., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., Kriwacki, R.W., Green, D.R., 2013. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 589–597. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2563>
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., Gehring, K., 2006. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* 24, 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.014>
- Monaco, G., Decrock, E., Arbel, N., van Vliet, A.R., La Rovere, R.M., De Smedt, H., Parys, J.B., Agostinis, P., Leybaert, L., Shoshan-Barmatz, V., Bultynck, G., 2015. The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 290, 9150–9161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622514>
- Montero, J., Haq, R., 2022. Adapted to Survive: Targeting Cancer Cells with BH3 Mimetics. *Cancer Discov.* 12, 1217–1232. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1334>

Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., Jänne, P.A., Amrein, P.C., Cichowski, K., Drapkin, R., Letai, A., 2015. Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy. *Cell* 160, 977–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.042>

Morciano, G., Giorgi, C., Balestra, D., Marchi, S., Perrone, D., Pinotti, M., Pinton, P., 2016. Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Mol. Biol. Cell* 27, 20–34. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-01-0028>

Moreau, P., Attal, M., Hulin, C., Arnulf, B., Belhadj, K., Benboubker, L., Béné, M.C., Broijl, A., Caillon, H., Caillot, D., Corre, J., Delforge, M., Dejoie, T., Doyen, C., Facon, T., Sonntag, C., Fontan, J., Garderet, L., Jie, K.-S., Karlin, L., Kuhnowski, F., Lambert, J., Leleu, X., Lenain, P., Macro, M., Mathiot, C., Orsini-Piocelle, F., Perrot, A., Stoppa, A.-M., Donk, N.W. van de, Willeme, S., Zweegman, S., Kolb, B., Touzeau, C., Roussel, M., Tiab, M., Marolleau, J.-P., Meuleman, N., Vekemans, M.-C., Westerman, M., Klein, S.K., Levin, M.-D., Femand, J.P., Escoffre-Barbe, M., Eveillard, J.-R., Garidi, R., Ahmadi, T., Zhuang, S., Chiu, C., Pei, L., Boer, C. de, Smith, E., Deraedt, W., Kampfinkel, T., Schechter, J., Vermeulen, J., Avet-Loiseau, H., Sonneveld, P., 2019. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 394, 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31240-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31240-1)

Moreau, P., Chanan-Khan, A., Roberts, A.W., Agarwal, A.B., Facon, T., Kumar, S., Touzeau, C., Punnoose, E.A., Cordero, J., Munasinghe, W., Jia, J., Salem, A.H., Freise, K.J., Levenson, J.D., Enschede, S.H., Ross, J.A., Maciag, P.C., Verdugo, M., Harrison, S.J., 2017. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood* 130, 2392–2400. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788323>

Moreau, P., Dimopoulos, M.-A., Mikhael, J., Yong, K., Capra, M., Facon, T., Hajek, R., Špička, I., Baker, R., Kim, K., Martinez, G., Min, C.-K., Pour, L., Leleu, X., Oriol, A., Koh, Y., Suzuki, K., Risse, M.-L., Asset, G., Macé, S., Martin, T., IKEMA study group, 2021. Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 397, 2361–2371. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00592-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00592-4)

Moreau, P., Garfall, A.L., van de Donk, N.W.C.J., Nahi, H., San-Miguel, J.F., Oriol, A., Nooka, A.K., Martin, T., Rosinol, L., Chari, A., Karlin, L., Benboubker, L., Mateos, M.-V., Bahlis, N., Popat, R., Besemer, B., Martínez-López, J., Sidana, S., Delforge, M., Pei, L., Trancucci, D., Verona, R., Girgis, S., Lin, S.X.W., Olyslager, Y., Jaffe, M., Uhlir, C., Stephenson, T., Van Rempelbergh, R., Banerjee, A., Goldberg, J.D., Kobos, R., Krishnan, A., Usmani, S.Z., 2022. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 387, 495–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203478>

Moreau, P., Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N.J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B.W., Jackson, S.R., Stoppa, A.-M., Simpson, D.R., Gimsing, P., Palumbo, A., Garderet, L., Cavo, M., Kumar, S., Touzeau, C., Buadi, F.K., Laubach, J.P., Berg, D.T., Lin, J., Di Bacco, A., Hui, A.-M., van de Velde, H., Richardson, P.G., TOURMALINE-MM1 Study Group, 2016. Oral ixazomib, lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 374, 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>

Morris, J.L., Gillet, G., Prudent, J., Popgeorgiev, N., 2021. Bcl-2 Family of Proteins in the Control of Mitochondrial Calcium Signalling: An Old Chap with New Roles. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3730. <https://doi.org/10.3390/ijms22073730>

- Morsi, R.Z., Hage-Sleiman, R., Kobeissy, H., Dbaibo, G., 2018. Noxa: Role in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Curr. Cancer Drug Targets* 18, 914–928. <https://doi.org/10.2174/1568009618666180308105048>
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, Kei-ichi, Nakayama, Keiko, Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., Loh, D.Y., 1995. Massive Cell Death of Immature Hematopoietic Cells and Neurons in Bcl-x-Deficient Mice. *Science* 267, 1506–1510. <https://doi.org/10.1126/science.7878471>
- Munkhbaatar, E., Dietzen, M., Agrawal, D., Anton, M., Jesinghaus, M., Boxberg, M., Pfarr, N., Bidola, P., Uhrig, S., Höckendorf, U., Meinhardt, A.-L., Wahida, A., Heid, I., Braren, R., Mishra, R., Warth, A., Muley, T., Poh, P.S.P., Wang, X., Fröhling, S., Steiger, K., Slotta-Huspenina, J., van Griensven, M., Pfeiffer, F., Lange, S., Rad, R., Spella, M., Stathopoulos, G.T., Ruland, J., Bassermann, F., Weichert, W., Strasser, A., Branca, C., Heikenwalder, M., Swanton, C., McGranahan, N., Jost, P.J., 2020. MCL-1 gains occur with high frequency in lung adenocarcinoma and can be targeted therapeutically. *Nat. Commun.* 11, 4527. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18372-1>
- Munshi, N.C., Anderson, L.D., Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., Petrocca, F., Massaro, M., Connarn, J.N., Kaiser, S., Patel, P., Huang, L., Campbell, T.B., Hege, K., San-Miguel, J., 2021. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 384, 705–716. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024850>
- Musto, P., Statuto, T., Valvano, L., Grieco, V., Nozza, F., Vona, G., Bochicchio, G.B., La Rocca, F., D'Auria, F., 2019. An update on biology, diagnosis and treatment of primary plasma cell leukemia. *Expert Rev. Hematol.* 12, 245–253. <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1598258>
- Naghdi, S., Várnai, P., Hajnóczky, G., 2015. Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5590–E5599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510574112>
- Nakamura, M., Shimada, K., Konishi, N., 2008. The role of HRK gene in human cancer. *Oncogene* 27, S105–S113. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.48>
- Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00214-3)
- Nalghranyan, S., Singh, A.P., Schinke, C., 2020. The combination of venetoclax, daratumumab and dexamethasone for the treatment of refractory primary plasma cell leukemia. *Am. J. Hematol.* 95, E34–E35. <https://doi.org/10.1002/ajh.25676>
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., Youle, R.J., 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* 18, 2330–2341. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2330>
- Negi, A., Voisin-Chiret, A.S., 2022. Strategies to Reduce the On-Target Platelet Toxicity of Bcl-xL Inhibitors: PROTACs, SNIPERs and Prodrug-Based Approaches. *Chembiochem* 23, e202100689. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100689>
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., Wang, X., 2003. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 17, 1475–1486. <https://doi.org/10.1101/gad.1093903>

- Niu, X., Brahmabhatt, H., Mergenthaler, P., Zhang, Z., Sang, J., Daude, M., Ehlert, F.G.R., Diederich, W.E., Wong, E., Zhu, W., Pogmore, J., Nandy, J.P., Satyanarayana, M., Jimmidi, R.K., Arya, P., Leber, B., Lin, J., Culmsee, C., Yi, J., Andrews, D.W., 2017. A Small-Molecule Inhibitor of Bax and Bak Oligomerization Prevents Genotoxic Cell Death and Promotes Neuroprotection. *Cell Chem. Biol.* 24, 493-506.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.011>
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., Huang, D.C., 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17, 384–395. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.384>
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N., 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>
- Oh, K.J., Singh, Pawan, Lee, K., Foss, K., Lee, Shinyoub, Park, Minji, Lee, Steffi, Aluvila, S., Park, Matthew, Singh, Puja, Kim, R.-S., Symersky, J., Walters, D.E., 2010. Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers. *J. Biol. Chem.* 285, 28924–28937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135293>
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W., Rosenberg, S.H., 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)
- O'Neill, K.L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y., Luo, X., 2016. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev.* 30, 973–988. <https://doi.org/10.1101/gad.276725.115>
- Opferman, J.T., 2016. Attacking Cancer's Achilles Heel: Antagonism of Anti-Apoptotic BCL-2 Family Members. *FEBS J.* 283, 2661–2675. <https://doi.org/10.1111/febs.13472>
- Osterlund, E.J., Hirniz, N., Nguyen, D., Pemberton, J.M., Fang, Q., Andrews, D.W., 2023. Endoplasmic reticulum protein BIK binds to and inhibits mitochondria-localized antiapoptotic proteins. *J. Biol. Chem.* 299, 102863. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102863>
- Ottillie, S., Diaz, J.L., Horne, W., Chang, J., Wang, Y., Wilson, G., Chang, S., Weeks, S., Fritz, L.C., Oltersdorf, T., 1997. Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 30866–30872. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30866>
- Padala, S.A., Barsouk, Adam, Barsouk, Alexander, Rawla, P., Vakiti, A., Kolhe, R., Kota, V., Ajebo, G.H., 2021. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med. Sci.*

9, 3. <https://doi.org/10.3390/medsci9010003>

Pagano, L., Valentini, C.G., Stefano, V.D., Venditti, A., Visani, G., Petrucci, M.T., Candoni, A., Specchia, G., Visco, C., Pogliani, E.M., Ferrara, F., Galieni, P., Gozzetti, A., Fianchi, L., Muro, M.D., Leone, G., Musto, P., Pulsoni, A., 2011. Primary plasma cell leukemia: a retrospective multicenter study of 73 patients. *Ann. Oncol.* 22, 1628–1635. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq646>

Palmieri, F., Pierri, C.L., 2010. Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem.* 47, 37–52. <https://doi.org/10.1042/bse0470037>

Palumbo, A., Cavallo, F., Gay, F., Di Raimondo, F., Ben Yehuda, D., Petrucci, M.T., Pezzatti, S., Caravita, T., Cerrato, C., Ribakovskiy, E., Genuardi, M., Cafro, A., Marcatti, M., Catalano, L., Offidani, M., Carella, A.M., Zamagni, E., Patriarca, F., Musto, P., Evangelista, A., Ciccone, G., Omedé, P., Crippa, C., Corradini, P., Nagler, A., Boccadoro, M., Cavo, M., 2014. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 371, 895–905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402888>

Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A.K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M.V., Mark, T.M., Qi, M., Schecter, J., Amin, H., Qin, X., Deraedt, W., Ahmadi, T., Spencer, A., Sonneveld, P., CASTOR Investigators, 2016. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 754–766. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606038>

Papadhimitriou, S.I., Terpos, E., Liapis, K., Pavlidis, D., Marinakis, T., Kastritis, E., Dimopoulos, M.-A., Tsitsilonis, O.E., Kostopoulos, I.V., 2022. The Cytogenetic Profile of Primary and Secondary Plasma Cell Leukemia: Etiopathogenetic Perspectives, Prognostic Impact and Clinical Relevance to Newly Diagnosed Multiple Myeloma with Differential Circulating Clonal Plasma Cells. *Biomedicines* 10, 209. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020209>

Papenfuss, K., Cordier, S.M., Walczak, H., 2008. Death receptors as targets for anti-cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2566–2585. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00514.x>

Parman, T., Wiley, M.J., Wells, P.G., 1999. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med.* 5, 582–585. <https://doi.org/10.1038/8466>

Pastorino, J.G., Hoek, J.B., 2008. Regulation of Hexokinase Binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9148-8>

Pastorino, J.G., Shulga, N., Hoek, J.B., 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 7610–7618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109950200>

Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., 2013. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.* 14, 290–297. <https://doi.org/10.1038/ni.2527>

Perrot, A., Lauwers-Cances, V., Tournay, E., Hulin, C., Chretien, M.-L., Royer, B., Dib, M., Decaux, O., Jaccard, A., Belhadj, K., Brechignac, S., Fontan, J., Voillat, L., Demarquette, H., Collet, P., Rodon, P., Sohn, C., Lifermann, F., Orsini-Piocelle, F., Richez, V., Mohty, M., Macro, M., Minvielle, S., Moreau, P., Leleu, X., Facon, T., Attal, M., Avet-Loiseau, H., Corre, J., 2019. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* 37, 1657–1665. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00776>

Pihán, P., Carreras-Sureda, A., Hetz, C., 2017. BCL-2 family: integrating stress responses at

the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 24, 1478–1487. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.82>

Pittalà, M.G.G., Conti Nibali, S., Reina, S., Cunsolo, V., Di Francesco, A., De Pinto, V., Messina, A., Foti, S., Saletti, R., 2021. VDACs Post-Translational Modifications Discovery by Mass Spectrometry: Impact on Their Hub Function. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12833. <https://doi.org/10.3390/ijms222312833>

Plötz, M., Gillissen, B., Hossini, A.M., Daniel, P.T., Eberle, J., 2012. Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-x(S) mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ.* 19, 1928–1938. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.71>

Popovic, R., Martinez-Garcia, E., Giannopoulou, E.G., Zhang, Quanwei, Zhang, Qingyang, Ezponda, T., Shah, M.Y., Zheng, Y., Will, C.M., Small, E.C., Hua, Y., Bulic, M., Jiang, Y., Carrara, M., Calogero, R.A., Kath, W.L., Kelleher, N.L., Wang, J.-P., Elemento, O., Licht, J.D., 2014. Histone Methyltransferase MMSET/NSD2 Alters EZH2 Binding and Reprograms the Myeloma Epigenome through Global and Focal Changes in H3K36 and H3K27 Methylation. *PLoS Genet.* 10, e1004566. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004566>

Porcelli, A.M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., Rugolo, M., 2005. pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 799–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.105>

Potter, D.S., Letai, A., 2016. To Prime, or Not to Prime: That Is the Question. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81, 131–140. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030841>

Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Köntgen, F., Adams, J.M., Cory, S., 1998. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12424–12431. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12424>

Puertas, B., González-Calle, V., Sobejano-Fuertes, E., Escalante, F., Queizán, J.A., Bárez, A., Labrador, J., Alonso-Alonso, J.M., García de Coca, A., Cantalapiedra, A., Villaescusa, T., Aguilar-Franco, C., Alejo-Alonso, E., Rey-Bua, B., López-Corral, L., García-Sanz, R., Puig, N., Gutiérrez, N.C., Mateos, M.-V., 2023. Novel Agents as Main Drivers for Continued Improvement in Survival in Multiple Myeloma. *Cancers* 15, 1558. <https://doi.org/10.3390/cancers15051558>

Punnoose, E.A., Levenson, J.D., Peale, F., Boghaert, E.R., Belmont, L.D., Tan, N., Young, A., Mitten, M., Ingalla, E., Darbonne, W.C., Oleksijew, A., Tapang, P., Yue, P., Oeh, J., Lee, L., Maiga, S., Fairbrother, W.J., Amiot, M., Souers, A.J., Sampath, D., 2016. Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models. *Mol. Cancer Ther.* 15, 1132–1144. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0730>

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., Strasser, A., 2001. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829–1832. <https://doi.org/10.1126/science.1062257>

Queralt-Martín, M., Bergdoll, L., Tejjido, O., Munshi, N., Jacobs, D., Kuszak, A.J., Protchenko, O., Reina, S., Magri, A., De Pinto, V., Bezrukov, S.M., Abramson, J., Rostovtseva, T.K., 2020. A lower affinity to cytosolic proteins reveals VDAC3 isoform-specific role in mitochondrial biology. *J. Gen. Physiol.* 152, e201912501. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912501>

- Raghavan, A., Sheiko, T., Graham, B.H., Craigen, W.J., 2012. Voltage-dependant anion channels: Novel insights into isoform function through genetic models. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1477–1485. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.019>
- Raina, K., Lu, J., Qian, Y., Altieri, M., Gordon, D., Rossi, A.M.K., Wang, J., Chen, X., Dong, H., Siu, K., Winkler, J.D., Crew, A.P., Crews, C.M., Coleman, K.G., 2016. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7124–7129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521738113>
- Rajkumar, S.V., 2022. Multiple Myeloma: 2022 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *Am. J. Hematol.* 97, 1086–1107. <https://doi.org/10.1002/ajh.26590>
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S.Y., Caers, J., Usmani, S.Z., Lahuerta, J.J., Johnsen, H.E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R.A., Anderson, K.C., Durie, B.G.M., Miguel, J.F.S., 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15, e538-548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Rajkumar, S.V., Hayman, S.R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Geyer, S.M., Kabat, B., Zeldenrust, S.R., Kumar, S., Greipp, P.R., Fonseca, R., Lust, J.A., Russell, S.J., Kyle, R.A., Witzig, T.E., Gertz, M.A., 2005a. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 106, 4050–4053. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2817>
- Rajkumar, S.V., Richardson, P.G., Hideshima, T., Anderson, K.C., 2005b. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 630–639. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.11.030>
- Ramesh, P., Lannagan, T.R.M., Jackstadt, R., Atencia Taboada, L., Lansu, N., Wirapati, P., van Hooff, S.R., Dekker, D., Pritchard, J., Kirov, A.B., van Neerven, S.M., Tejpar, S., Kops, G.J.P.L., Sansom, O.J., Medema, J.P., 2021. BCL-XL is crucial for progression through the adenoma-to-carcinoma sequence of colorectal cancer. *Cell Death Differ.* 28, 3282–3296. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00816-w>
- Ramsingh, G., Mehan, P., Luo, J., Vij, R., Morgensztern, D., 2009. Primary plasma cell leukemia. *Cancer* 115, 5734–5739. <https://doi.org/10.1002/cncr.24700>
- Rauh, U., Wei, G., Serrano-Wu, M., Kosmidis, G., Kaulfuss, S., Siegel, F., Thede, K., McFarland, J., Lemke, C.T., Werbeck, N., Nowak-Reppel, K., Pilari, S., Menz, S., Ocker, M., Zhang, W., Davis, K., Poncet-Montange, G., Roth, J., Daniels, D., Kaushik, V.K., Hubbard, B., Ziegelbauer, K., Golub, T.R., 2024. BRD-810 is a highly selective MCL1 inhibitor with optimized in vivo clearance and robust efficacy in solid and hematological tumor models. *Nat. Cancer* 1–15. <https://doi.org/10.1038/s43018-024-00814-0>
- Ravi, P., Kumar, S.K., Roeker, L., Gonsalves, W., Buadi, F., Lacy, M.Q., Go, R.S., Dispenzieri, A., Kapoor, P., Lust, J.A., Dingli, D., Lin, Y., Russell, S.J., Leung, N., Gertz, M.A., Kyle, R.A., Bergsagel, P.L., Rajkumar, S.V., 2018. Revised diagnostic criteria for plasma cell leukemia: results of a Mayo Clinic study with comparison of outcomes to multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 8, 116. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0140-1>
- Reina, S., De Pinto, V., 2017. Anti-Cancer Compounds Targeted to VDAC: Potential and Perspectives. *Curr. Med. Chem.* 24, 4447–4469. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170530074039>

- Reina, S., Guarino, F., Magri, A., De Pinto, V., 2016. VDAC3 As a Potential Marker of Mitochondrial Status Is Involved in Cancer and Pathology. *Front. Oncol.* 6, 264. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00264>
- Ren, D., Kim, H., Tu, H.-C., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Korsmeyer, S.J., Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y., 2009. The VDAC2-BAK Rheostat Controls Thymocyte Survival. *Sci. Signal.* 2, 10.1126/scisignal.2000274. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000274>
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y., 2010. BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program. *Science* 330, 1390–1393. <https://doi.org/10.1126/science.1190217>
- Reyna, D.E., Garner, T.P., Lopez, A., Kopp, F., Choudhary, G.S., Sridharan, A., Narayanagari, S.-R., Mitchell, K., Dong, B., Bartholdy, B.A., Walensky, L.D., Verma, A., Steidl, U., Gavathiotis, E., 2017. Direct Activation of BAX by BTSA1 Overcomes Apoptosis Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 32, 490-505.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.001>
- Richardson, P.G., Blood, E., Mitsiades, C.S., Jagannath, S., Zeldenrust, S.R., Alsina, M., Schlossman, R.L., Rajkumar, S.V., Desikan, K.R., Hideshima, T., Munshi, N.C., Kelly-Colson, K., Doss, D., McKenney, M.L., Gorelik, S., Warren, D., Freeman, A., Rich, R., Wu, A., Olesnyckyj, M., Wride, K., Dalton, W.S., Zeldis, J., Knight, R., Weller, E., Anderson, K.C., 2006a. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 108, 3458–3464. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015909>
- Richardson, P.G., Jacobus, S.J., Weller, E.A., Hassoun, H., Lonial, S., Raje, N.S., Medvedova, E., McCarthy, P.L., Libby, E.N., Voorhees, P.M., Orlowski, R.Z., Anderson, L.D., Zonder, J.A., Milner, C.P., Gasparetto, C., Agha, M.E., Khan, A.M., Hurd, D.D., Gowin, K., Kamble, R.T., Jagannath, S., Nathwani, N., Alsina, M., Cornell, R.F., Hashmi, H., Campagnaro, E.L., Andreescu, A.C., Gentile, T., Liedtke, M., Godby, K.N., Cohen, A.D., Openshaw, T.H., Pasquini, M.C., Giralt, S.A., Kaufman, J.L., Yee, A.J., Scott, E., Torke, P., Foley, A., Fulciniti, M., Hebert, K., Samur, M.K., Masone, K., Maglio, M.E., Zeytoonjian, A.A., Nadeem, O., Schlossman, R.L., Laubach, J.P., Paba-Prada, C., Ghobrial, I.M., Perrot, A., Moreau, P., Avet-Loiseau, H., Attal, M., Anderson, K.C., Munshi, N.C., 2022. Triplet Therapy, Transplantation, and Maintenance until Progression in Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 387, 132–147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2204925>
- Richardson, P.G., Lonial, S., Jakubowiak, A.J., Harousseau, J.-L., Anderson, K.C., 2011. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 154, 745–754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08790.x>
- Richardson, P.G., Mitsiades, C., Hideshima, T., Anderson, K.C., 2006b. Bortezomib: Proteasome Inhibition as an Effective Anticancer Therapy. *Annu. Rev. Med.* 57, 33–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.042905.122625>
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K.C., Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators, 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 352, 2487–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043445>
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., Korsmeyer, S.J., 2000. Mcl-1 deficiency

results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 23–27.

Rodriguez-Otero, P., Ailawadhi, S., Arnulf, B., Patel, K., Cavo, M., Nooka, A.K., Manier, S., Callander, N., Costa, L.J., Vij, R., Bahlis, N.J., Moreau, P., Solomon, S.R., Delforge, M., Berdeja, J., Truppel-Hartmann, A., Yang, Z., Favre-Kontula, L., Wu, F., Piasecki, J., Cook, M., Giralt, S., 2023. Ide-cel or Standard Regimens in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 388, 1002–1014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213614>

Rodriguez-Otero, P., Paiva, B., San-Miguel, J.F., 2021. Roadmap to cure multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev.* 100. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102284>

Roos, W.P., Thomas, A.D., Kaina, B., 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* 16, 20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>

Rosenberg, P., 2022. VDAC2 as a novel target for heart failure: Ca²⁺ at the sarcomere, mitochondria and SR. *Cell Calcium* 104, 102586. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102586>

Rostovtseva, T.K., Sheldon, K.L., Hassanzadeh, E., Monge, C., Saks, V., Bezrukov, S.M., Sackett, D.L., 2008. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18746–18751. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806303105>

Roth, K.A., Motoyama, N., Loh, D.Y., 1996. Apoptosis of bcl-x-deficient telencephalic cells in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 1753–1758. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01753.1996>

Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., Murshid, N., 2022. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life* 12, 256. <https://doi.org/10.3390/life12020256>

Rovini, A., Gurnev, P.A., Beilina, A., Queralt-Martín, M., Rosencrans, W., Cookson, M.R., Bezrukov, S.M., Rostovtseva, T.K., 2020. Molecular mechanism of olesoxime-mediated neuroprotection through targeting α -synuclein interaction with mitochondrial VDAC. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 3611–3626. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03386-w>

Roy, S.S., Ehrlich, A.M., Craigen, W.J., Hajnóczky, G., 2009. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* 10, 1341–1347. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.219>

Runke, G., Maier, E., O’Neil, J.D., Benz, R., Court, D.A., 2000. Functional characterization of the conserved “GLK” motif in mitochondrial porin from *Neurospora crassa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 563–570. <https://doi.org/10.1023/a:1005618510502>

Ryan, J., Letai, A., 2013. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods San Diego Calif* 61, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.006>

Ryan, J., Montero, J., Rocco, J., Letai, A., 2016. iBH3: simple, fixable BH3 profiling to determine apoptotic priming in primary tissue by flow cytometry. *Biol. Chem.* 397, 671–678. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0107>

Ryan, J.A., Brunelle, J.K., Letai, A., 2010. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12895–12900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914878107>

Saenz, D.T., Fiskus, W., Qian, Y., Manshour, T., Rajapakshe, K., Raina, K., Coleman, K.G., Crew, A.P., Shen, A., Mill, C.P., Sun, B., Qiu, P., Kadia, T.M., Pemmaraju, N., DiNardo, C., Kim, M.-S., Nowak, A.J., Coarfa, C., Crews, C.M., Verstovsek, S., Bhalla, K.N., 2017. Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor

- (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary (s) AML cells. *Leukemia* 31, 1951–1961. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.393>
- Sakamoto, K.M., 2010. Protacs for treatment of cancer. *Pediatr. Res.* 67, 505–508. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d35017>
- Sakamoto, K.M., 2005. Chimeric molecules to target proteins for ubiquitination and degradation. *Methods Enzymol.* 399, 833–847. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)99054-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)99054-X)
- Sakuragi, N., Salah-eldin, A., Watari, H., Itoh, T., Inoue, S., Moriuchi, T., Fujimoto, S., 2002. Bax, Bcl-2, and p53 expression in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 86, 288–296. <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6742>
- Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., García-Sáez, A.J., 2016. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J.* 35, 389–401. <https://doi.org/10.15252/embj.201593384>
- Sampson, M.J., Decker, W.K., Beaudet, A.L., Ruitenbeek, W., Armstrong, D., Hicks, M.J., Craigen, W.J., 2001. Immobile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J. Biol. Chem.* 276, 39206–39212. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104724200>
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., Craigen, W.J., 1996a. Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* 33, 283–288. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0193>
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., Davison, D.B., Craigen, W.J., 1996b. A novel mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel gene localizes to chromosome 8. *Genomics* 36, 192–196. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0445>
- Sampson, M.J., Ross, L., Decker, W.K., Craigen, W.J., 1998. A novel isoform of the mitochondrial outer membrane protein VDAC3 via alternative splicing of a 3-base exon. Functional characteristics and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 273, 30482–30486. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30482>
- Sancho, M., Leiva, D., Lucendo, E., Orzáez, M., 2022. Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *Febs J.* 289, 6209–6234. <https://doi.org/10.1111/febs.16136>
- Sander, P., Feng, M., Schweitzer, M.K., Wilting, F., Gutenthaler, S.M., Arduino, D.M., Fischbach, S., Dreizehnter, L., Moretti, A., Gudermann, T., Perocchi, F., Schredelseker, J., 2021a. Approved drugs ezetimibe and disulfiram enhance mitochondrial Ca²⁺ uptake and suppress cardiac arrhythmogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 178, 4518–4532. <https://doi.org/10.1111/bph.15630>
- Sander, P., Gudermann, T., Schredelseker, J., 2021b. A Calcium Guard in the Outer Membrane: Is VDAC a Regulated Gatekeeper of Mitochondrial Calcium Uptake? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 946. <https://doi.org/10.3390/ijms22020946>
- Sarosiek, K.A., Chonghaile, T.N., Letai, A., 2013. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* 23, 10.1016/j.tcb.2013.08.003. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.08.003>
- Sastry, P.S., Rao, K.S., 2000. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74, 1–20.

<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740001.x>

Satoh, A.O., Fujioka, Y., Kashiwagi, S., Yoshida, A., Fujioka, M., Sasajima, H., Nanbo, A., Amano, M., Ohba, Y., 2023. Interaction between PI3K and the VDAC2 channel tethers Ras-PI3K-positive endosomes to mitochondria and promotes endosome maturation. *Cell Rep.* 42. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112229>

Schavgoulidze, A., Perrot, A., Cazaubiel, T., Leleu, X., Montes, L., Jacquet, C., Belhadj, K., Brechignac, S., Frenzel, L., Chalopin, T., Rey, P., Schiano de Collella, J.-M., Dib, M., Caillot, D., Macro, M., Fontan, J., Buisson, L., Pavageau, L., Roussel, M., Manier, S., Mohty, M., Martinet, L., Avet-Loiseau, H., Corre, J., 2023a. Prognostic impact of translocation t(14;16) in multiple myeloma according to the presence of additional genetic lesions. *Blood Cancer J.* 13, 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00933-4>

Schavgoulidze, A., Talbot, A., Perrot, A., Cazaubiel, T., Leleu, X., Manier, S., Buisson, L., Mahéo, S., Do Souto Ferreira, L., Pavageau, L., Hulin, C., Marolleau, J.-P., Voillat, L., Belhadj, K., Divoux, M., Slama, B., Brechignac, S., Macro, M., Stoppa, A.-M., Sanhes, L., Orsini-Piocelle, F., Fontan, J., Chretien, M.-L., Demarquette, H., Mohty, M., Avet-Loiseau, H., Corre, J., 2023b. Biallelic deletion of 1p32 defines ultra-high-risk myeloma, but monoallelic del(1p32) remains a strong prognostic factor. *Blood* 141, 1308–1315. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017863>

Schein, S.J., Colombini, M., Finkelstein, A., 1976. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J. Membr. Biol.* 30, 99–120. <https://doi.org/10.1007/BF01869662>

Schmidt, T.M., Fonseca, R., Usmani, S.Z., 2021. Chromosome 1q21 abnormalities in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 11, 83. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00474-8>

Schredelseker, J., Paz, A., López, C.J., Altenbach, C., Leung, C.S., Drexler, M.K., Chen, J.-N., Hubbell, W.L., Abramson, J., 2014. High resolution structure and double electron-electron resonance of the zebrafish voltage-dependent anion channel 2 reveal an oligomeric population. *J. Biol. Chem.* 289, 12566–12577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497438>

Schulman, J.J., Szczesniak, L.M., Bunker, E.N., Nelson, H.A., Roe, M.W., Wagner, L.E., Yule, D.I., Wojcikiewicz, R.J.H., 2019. Bok regulates mitochondrial fusion and morphology. *Cell Death Differ.* 26, 2682–2694. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0327-4>

Schulman, J.J., Wright, F.A., Han, X., Zluhan, E.J., Szczesniak, L.M., Wojcikiewicz, R.J.H., 2016. The Stability and Expression Level of Bok Are Governed by Binding to Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *J. Biol. Chem.* 291, 11820–11828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711242>

Schweitzer, M.K., Wilting, F., Sedej, S., Dreizehnter, L., Dupper, N.J., Tian, Q., Moretti, A., My, I., Kwon, O., Priori, S.G., Laugwitz, K.-L., Storch, U., Lipp, P., Breit, A., Mederos Y Schnitzler, M., Gudermann, T., Schredelseker, J., 2017. Suppression of Arrhythmia by Enhancing Mitochondrial Ca²⁺ Uptake in Catecholaminergic Ventricular Tachycardia Models. *JACC Basic Transl. Sci.* 2, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.06.008>

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139. <https://doi.org/10.1126/science.1081208>

Seifert, M., Scholtysik, R., Küppers, R., 2019. Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1956, 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8_1

Seiller, C., Maiga, S., Touzeau, C., Bellanger, C., Kervoëlen, C., Descamps, G., Maillet, L., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Gomez-Bougie, P., Amiot, M., 2020. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis.* 11, 316. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2505-1>

Sejic, N., George, L.C., Tierney, R.J., Chang, C., Kondrashova, O., MacKinnon, R.N., Lan, P., Bell, A.I., Lessene, G., Long, H.M., Strasser, A., Shannon-Lowe, C., Kelly, G.L., 2020. BCL-XL inhibition by BH3-mimetic drugs induces apoptosis in models of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. *Blood Adv.* 4, 4775–4787. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002446>

Sekar, G., Ojoawo, A., Moldoveanu, T., 2022. Protein-protein and protein-lipid interactions of pore-forming BCL-2 family proteins in apoptosis initiation. *Biochem. Soc. Trans.* 50, 1091–1103. <https://doi.org/10.1042/BST20220323>

Sessler, T., Healy, S., Samali, A., Szegezdi, E., 2013. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol. Ther.* 140, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.009>

Setoguchi, K., Otera, H., Mihara, K., 2006. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* 25, 5635–5647. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601438>

Shah, J.J., Stadtmauer, E.A., Abonour, R., Cohen, A.D., Bensinger, W.I., Gasparetto, C., Kaufman, J.L., Lentzsch, S., Vogl, D.T., Gomes, C.L., Pascucci, N., Smith, D.D., Orlowski, R.Z., Durie, B.G.M., 2015. Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone for relapsed or refractory myeloma. *Blood* 126, 2284–2290. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-643320>

Shalaby, R., Diwan, A., Flores-Romero, H., Hertlein, V., Garcia-Saez, A.J., 2023. Visualization of BOK pores independent of BAX and BAK reveals a similar mechanism with differing regulation. *Cell Death Differ.* 30, 731–741. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01078-w>

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D.W., 2013. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008714. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>

Shankar, T.S., Ramadurai, D.K.A., Steinhorst, K., Sommakia, S., Badolia, R., Thodou Krokidi, A., Calder, D., Navankasattusas, S., Sander, P., Kwon, O.S., Aravamudhan, A., Ling, J., Dendorfer, A., Xie, C., Kwon, O., Cheng, E.H.Y., Whitehead, K.J., Gudermann, T., Richardson, R.S., Sachse, F.B., Schredelseker, J., Spitzer, K.W., Chaudhuri, D., Drakos, S.G., 2021. Cardiac-specific deletion of voltage dependent anion channel 2 leads to dilated cardiomyopathy by altering calcium homeostasis. *Nat. Commun.* 12, 4583. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24869-0>

Shaughnessy, J., 2005. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27 Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* 10, 117–126. <https://doi.org/10.1080/10245330512331390140>

Shaughnessy, J., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Bergsagel, P.L., Kuehl, M., 2001. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 98, 217–223. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.1.217>

Shevade, A., Strogolova, V., Orlova, M., Yeo, C.T., Kuchin, S., 2018. Mitochondrial Voltage-

Dependent Anion Channel Protein Por1 Positively Regulates the Nuclear Localization of *Saccharomyces cerevisiae* AMP-Activated Protein Kinase. *mSphere* 3, e00482-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00482-17>

Shimizu, H., Schredelseker, J., Huang, J., Lu, K., Naghdi, S., Lu, F., Franklin, S., Fiji, H.D., Wang, K., Zhu, H., Tian, C., Lin, B., Nakano, H., Ehrlich, A., Nakai, J., Stieg, A.Z., Gimzewski, J.K., Nakano, A., Goldhaber, J.I., Vondriska, T.M., Hajnóczy, G., Kwon, O., Chen, J.-N., 2015. Mitochondrial Ca²⁺ uptake by the voltage-dependent anion channel 2 regulates cardiac rhythmicity. *eLife* 4, e04801. <https://doi.org/10.7554/eLife.04801>

Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487. <https://doi.org/10.1038/20959>

Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., 2012. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion* 12, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.04.001>

Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., Arbel, N., 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* 31, 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>

Shoshan-Barmatz, V., Krelin, Y., Chen, Q., 2017. VDAC1 as a Player in Mitochondria-Mediated Apoptosis and Target for Modulating Apoptosis. *Curr. Med. Chem.* 24, 4435–4446. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170616105200>

Shoshan-Barmatz, V., Shteinifer-Kuzmine, A., Verma, A., 2020. VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules* 10, 1485. <https://doi.org/10.3390/biom10111485>

Shou, Y., Martelli, M.L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L.A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I.R., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., 2000. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 228–233.

Shuvo, S.R., Ferens, F.G., Court, D.A., 2016. The N-terminus of VDAC: Structure, mutational analysis, and a potential role in regulating barrel shape. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 1350–1361. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.017>

Siegel, D.S., Dimopoulos, M.A., Ludwig, H., Facon, T., Goldschmidt, H., Jakubowiak, A., San-Miguel, J., Obreja, M., Blaedel, J., Stewart, A.K., 2018. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 36, 728–734. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.5032>

Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., Zeddis, J., Barlogie, B., 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341, 1565–1571. <https://doi.org/10.1056/NEJM199911183412102>

Sinicropo, F.A., Rego, R.L., Okumura, K., Foster, N.R., O'Connell, M.J., Sargent, D.J., Windschitl, H.E., 2008. Prognostic impact of bim, puma, and noxa expression in human colon carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 5810–5818. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5202>

Sionov, R.V., Vlahopoulos, S.A., Granot, Z., 2015. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* 6, 23058–23134.

- Sive, J., Cuthill, K., Hunter, H., Kazmi, M., Pratt, G., Smith, D., Haematology, B.S. of, 2021. Guidelines on the diagnosis, investigation and initial treatment of myeloma: a British Society for Haematology/UK Myeloma Forum Guideline. *Br. J. Haematol.* 193, 245–268. <https://doi.org/10.1111/bjh.17410>
- Slomp, A., Moesbergen, L.M., Gong, J., Cuenca, M., von dem Borne, P.A., Sonneveld, P., Huang, D.C.S., Minnema, M.C., Peperzak, V., 2019. Multiple myeloma with 1q21 amplification is highly sensitive to MCL-1 targeting. *Blood Adv.* 3, 4202–4214. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000702>
- Smaligo, A.J., Vardhineedi, S., Kwon, O., 2018. Carvone-Derived P-Stereogenic Phosphines: Design, Synthesis, and Use in Allene-Imine [3 + 2] Annulation. *ACS Catal.* 8, 5188–5192. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01081>
- Sonneveld, P., Dimopoulos, M.A., Boccadoro, M., Quach, H., Ho, P.J., Beksac, M., Hulin, C., Antonioli, E., Leleu, X., Mangiacavalli, S., Perrot, A., Cavo, M., Belotti, A., Broijl, A., Gay, F., Mina, R., Nijhof, I.S., van de Donk, N.W.C.J., Katodritou, E., Schjesvold, F., Sureda Balari, A., Rosiñol, L., Delforge, M., Roeloffzen, W., Silzle, T., Vangsted, A., Einsele, H., Spencer, A., Hajek, R., Jurczyszyn, A., Lonergan, S., Ahmadi, T., Liu, Y., Wang, J., Vieyra, D., van Brummelen, E.M.J., Vanquickenberghe, V., Sitthi-Amorn, A., de Boer, C.J., Carson, R., Rodriguez-Otero, P., Bladé, J., Moreau, P., PERSEUS Trial Investigators, 2024. Daratumumab, Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 390, 301–313. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2312054>
- Spinelli, J.B., Haigis, M.C., 2018. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 20, 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Stevens, M., Oltean, S., 2019. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. *Front. Genet.* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00804>
- Stewart, A.K., Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., Hájek, R., Rosiñol, L., Siegel, D.S., Mihaylov, G.G., Goranova-Marinova, V., Rajnics, P., Suvorov, A., Niesvizky, R., Jakubowiak, A.J., San-Miguel, J.F., Ludwig, H., Wang, M., Maisnar, V., Minarik, J., Bensinger, W.I., Mateos, M.-V., Ben-Yehuda, D., Kukreti, V., Zojwalla, N., Tonda, M.E., Yang, X., Xing, B., Moreau, P., Palumbo, A., ASPIRE Investigators, 2015. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 372, 142–152. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411321>
- Strasser, A., 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 189–200. <https://doi.org/10.1038/nri1568>
- Strasser, A., Vaux, D.L., 2020. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Mol. Cell* 78, 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>
- Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00167-7)
- Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M., 2005. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24, 1348–1358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208300>
- Tait, S.W.G., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.

<https://doi.org/10.1038/nrm2952>

Tan, W., Colombini, M., 2007. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2510–2515. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.002>

Tessoulin, B., Moreau-Aubry, A., Descamps, G., Gomez-Bougie, P., Maïga, S., Gaignard, A., Chiron, D., Ménoret, E., Le Gouill, S., Moreau, P., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., 2018. Whole-exon sequencing of human myeloma cell lines shows mutations related to myeloma patients at relapse with major hits in the DNA regulation and repair pathways. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 11, 137. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0679-0>

Thol, F., Ganser, A., 2020. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.* 21, 66. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00765-5>

Thomas, L.R., Stillman, D.J., Thorburn, A., 2002. Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen. *J. Biol. Chem.* 277, 34343–34348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204169200>

Tiedemann, R., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R., Santana-Davila, R., Price-Troska, T., Van Wier, S., Chng, W., Ketterling, R., Gertz, M., Henderson, K., Greipp, P., Dispenzieri, A., Lacy, M., Rajkumar, S., Bergsagel, P., Stewart, A., Fonseca, R., 2008. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 22, 1044–1052. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.4>

Tiedemann, R.E., Zhu, Y.X., Schmidt, J., Shi, C.X., Sereduk, C., Yin, H., Mousses, S., Stewart, A.K., 2012. Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome. *Cancer Res.* 72, 757–768. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2781>

Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J.D., Souers, A.J., Maïga, S., Béné, M.C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2014. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* 28, 210–212. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.216>

Touzeau, C., Ryan, J., Guerriero, J.L., Moreau, P., Chonghaile, T.N., Gouill, S.L., Richardson, P., Anderson, K., Amiot, M., Letai, A., 2016. BH3-profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in Multiple Myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia* 30, 761–764. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.184>

Triphan, X., Menzel, V.A., Petrunkina, A.M., Cassará, M.C., Wemheuer, W., Hinsch, K.-D., Hinsch, E., 2008. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch.* 455, 677–686. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0316-1>

Tron, A.E., Belmonte, M.A., Adam, A., Aquila, B.M., Boise, L.H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K.J., Gangl, E., Gibbons, F.D., Gregory, G.P., Hargreaves, D., Hendricks, J.A., Johannes, J.W., Johnstone, R.W., Kazmirski, S.L., Kettle, J.G., Lamb, M.L., Matulis, S.M., Nooka, A.K., Packer, M.J., Peng, B., Rawlins, P.B., Robbins, D.W., Schuller, A.G., Su, N., Yang, W., Ye, Q., Zheng, X., Secrist, J.P., Clark, E.A., Wilson, D.M., Fawell, S.E., Hird, A.W., 2018. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 9, 5341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>

Trudel, S., Stewart, A.K., Li, Z., Shu, Y., Liang, S.-B., Trieu, Y., Reece, D., Paterson, J., Wang, D., Wen, X.-Y., 2007. The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 621–629. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1526>

- Tsujimoto, Y., Croce, C.M., 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5214–5218.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097–1099. <https://doi.org/10.1126/science.6093263>
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 7, 1174–1181. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400780>
- Tuazon, S.A., Holmberg, L.A., Nadeem, O., Richardson, P.G., 2021. A clinical perspective on plasma cell leukemia; current status and future directions. *Blood Cancer J.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00414-6>
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.-P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., Abramson, J., 2008. The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17742–17747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105>
- Uren, R.T., Iyer, S., Kluck, R.M., 2017. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372, 20160218. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0218>
- van de Donk, N.W.C.J., Lokhorst, H.M., Anderson, K.C., Richardson, P.G., 2012. How I treat plasma cell leukemia. *Blood* 120, 2376–2389. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-408682>
- van Delft, M.F., Chappaz, S., Khakham, Y., Bui, C.T., Debrincat, M.A., Lowes, K.N., Brouwer, J.M., Grohmann, C., Sharp, P.P., Dagley, L.F., Li, L., McArthur, K., Luo, M.-X., Chin, H.S., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Segal, D., Duflocq, S., Lessene, R., Bernard, S., Peilleron, L., Nguyen, T., Miles, C., Wan, S.S., Lane, R.M., Wardak, A., Lackovic, K., Colman, P.M., Sandow, J.J., Webb, A.I., Czabotar, P.E., Dewson, G., Watson, K.G., Huang, D.C.S., Lessene, G., Kile, B.T., 2019. A small molecule interacts with VDAC2 to block mouse BAK-driven apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* 15, 1057–1066. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0365-8>
- Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottleib, E., Hill, R.B., Thompson, C.B., Colombini, M., 2001. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 276, 19414–19419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101590200>
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80065-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80065-m)
- Vercellino, I., Sazanov, L.A., 2022. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 141–161. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00009-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00009-x)
- Villinger, S., Giller, K., Bayrhuber, M., Lange, A., Griesinger, C., Becker, S., Zweckstetter, M., 2014. Nucleotide interactions of the human voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* 289, 13397–13406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524173>

von Karstedt, S., Montinaro, A., Walczak, H., 2017. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 352–366. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>

Wajant, H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>

Walker, B.A., Leone, P.E., Chiecchio, L., Dickens, N.J., Jenner, M.W., Boyd, K.D., Johnson, D.C., Gonzalez, D., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Konn, Z.J., Stockley, D.M., Gregory, W.M., Davies, F.E., Ross, F.M., Morgan, G.J., 2010. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116, e56–e65. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-279596>

Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P., Ashby, T.C., Bauer, M., Davies, F., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti, M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A.K., Goldschmidt, H., Raab, M.S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G.H., Anderson, K.C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A., Morgan, G., 2019. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 33, 159–170. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0196-8>

Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P., Ashby, T.C., Bauer, M., Davies, F.E., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti, M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A.K., Goldschmidt, H., Raab, M.S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G.H., Anderson, K.C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A., Morgan, G.J., 2018. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 132, 587–597. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-840132>

Walter, F., D'Orsi, B., Jagannathan, A., Dussmann, H., Prehn, J.H.M., 2022. BOK controls ER proteostasis and physiological ER stress responses in neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 915065. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.915065>

Walther, D.M., Rapaport, D., 2009. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.04.013>

Wang, C., Youle, R.J., 2009. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 95–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>

Wang, G., Diepstraten, S.T., Herold, M.J., 2022. Last but not least: BFL-1 as an emerging target for anti-cancer therapies. *Biochem. Soc. Trans.* 50, 1119–1128. <https://doi.org/10.1042/BST20220153>

Wang, H., Guo, M., Wei, H., Chen, Y., 2021. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 14, 67. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01079-1>

Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C., 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339–343. <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.339>

Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1996. BID: a novel BH3

domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10, 2859–2869. <https://doi.org/10.1101/gad.10.22.2859>

Weeber, E.J., Levy, M., Sampson, M.J., Anflous, K., Armstrong, D.L., Brown, S.E., Sweatt, J.D., Craigen, W.J., 2002. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* 277, 18891–18897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201649200>

Wei, A.H., Roberts, A.W., Spencer, A., Rosenberg, A.S., Siegel, D., Walter, R.B., Caenepeel, S., Hughes, P., Mclver, Z., Mezzi, K., Morrow, P.K., Stein, A., 2020. Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood Rev.* 44, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100672>

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14, 2060–2071.

Weiler, M., Bähr, O., Hohlweg, U., Naumann, U., Rieger, J., Huang, H., Tabatabai, G., Krell, H.W., Ohgaki, H., Weller, M., Wick, W., 2006. BCL-xL: time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 13, 1156–1169. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401786>

Westphal, Dana, Dewson, G., Menard, M., Frederick, P., Iyer, S., Bartolo, R., Gibson, L., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Adams, J.M., Kluck, R.M., 2014. Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4076-4085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415142111>

Westphal, D, Kluck, R.M., Dewson, G., 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ.* 21, 196–205. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.139>

Willis, S.N., Adams, J.M., 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.10.001>

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.1304105>

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859. <https://doi.org/10.1126/science.1133289>

Wilson, J.W., Nostro, M.C., Balzi, M., Faraoni, P., Cianchi, F., Becciolini, A., Potten, C.S., 2000. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 82, 178–185. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0897>

Wilson-Annan, J., O'Reilly, L.A., Crawford, S.A., Hausmann, G., Beaumont, J.G., Parma, L.P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M.G., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2003. Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J. Cell Biol.* 162, 877–888. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302144>

Wilting, F., Kopp, R., Gurnev, P.A., Schedel, A., Dupper, N.J., Kwon, O., Nicke, A., Gudermann, T., Schredelseker, J., 2020. The antiarrhythmic compound efsevin directly modulates voltage-dependent anion channel 2 by binding to its inner wall and enhancing mitochondrial Ca²⁺

uptake. *Br. J. Pharmacol.* 177, 2947–2958. <https://doi.org/10.1111/bph.15022>

Winter, G.E., Buckley, D.L., Paulk, J., Roberts, J.M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., Bradner, J.E., 2015. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* 348, 1376–1381. <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>

Wojtczak, L., 1979. [Nobel Prize winner Peter Mitchell. The chemiosmotic theory]. *Postepy Biochem.* 25, 247–250.

Xie, W., Zhang, L., Jiao, H., Guan, L., Zha, J., Li, X., Wu, M., Wang, Z., Han, J., You, H., 2015. Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA. *Autophagy* 11, 1623–1635. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1075688>

Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., Smith, R., Lessnick, S.L., Sahasrabudhe, S., Stockwell, B.R., 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447, 864–868. <https://doi.org/10.1038/nature05859>

Yamagata, H., Shimizu, S., Nishida, Y., Watanabe, Y., Craigen, W.J., Tsujimoto, Y., 2009. Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax. *Oncogene* 28, 3563–3572. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.213>

Yamamoto, L., Derebail, S., Aktas-Samur, A., Hideshima, T., Chyra, Z., Chakraborty, C., Yao, Y., Gramegna, D., Morelli, E., Samur, M.K., Deng, J., Zhai, Y., Gulla, A., Fulciniti, M., Anderson, K.C., Munshi, N.C., 2021. Dual BCL-2/BCL-XL Inhibitor Pelcitoclax (APG-1252) Overcomes Intrinsic and Acquired Resistance to Venetoclax in Multiple Myeloma Cells. *Blood* 138, 2655. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-149530>

Yang, G., Zhou, D., Li, J., Wang, W., Zhong, W., Fan, W., Yu, M., Cheng, H., 2019. VDAC1 is regulated by BRD4 and contributes to JQ1 resistance in breast cancer. *Oncol. Lett.* 18, 2340–2347. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10534>

Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., Fan, J., 2015. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* 2, 12. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>

Yang, Y., Luo, M., Zhang, K., Zhang, J., Gao, T., Connell, D.O., Yao, F., Mu, C., Cai, B., Shang, Y., Chen, W., 2020. Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma. *Nat. Commun.* 11, 433. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14324-x>

Yarychkivska, O., Sharmin, R., Elkhailil, A., Ghose, P., 2024. Apoptosis and beyond: A new era for programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin. Cell Dev. Biol., C. elegans as a model for health and disease* 154, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.02.003>

Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>

Young, M.J., Bay, D.C., Hausner, G., Court, D.A., 2007. The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evol. Biol.* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-31>

Yuan, J., Ofengeim, D., 2024. A guide to cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 25, 379–395. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00689-6>

Yuan, Z., Dewson, G., Czabotar, P.E., Birkinshaw, R.W., 2021. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 49, 2787–2795. <https://doi.org/10.1042/BST20210753>

Yuan, Z., van Delft, M.F., Li, M.X., Sumardy, F., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Lessene, G.,

- Khakam, Y., Jin, R., He, S., Smith, N.A., Birkinshaw, R.W., Czabotar, P.E., Dewson, G., 2024. Key residues in the VDAC2-BAK complex can be targeted to modulate apoptosis. *PLoS Biol.* 22, e3002617. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002617>
- Zaid, H., Abu-Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I., Shoshan-Barmatz, V., 2005. The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 12, 751–760. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401599>
- Zantl, N., Weirich, G., Zall, H., Seiffert, B.M., Fischer, S.F., Kirschnek, S., Hartmann, C., Fritsch, R.M., Gillissen, B., Daniel, P.T., Häcker, G., 2007. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* 26, 7038–7048. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210510>
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108, 2020–2028. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-013458>
- Zhang, D.W., Colombini, M., 1990. Group IIIA-metal hydroxides indirectly neutralize the voltage sensor of the voltage-dependent mitochondrial channel, VDAC, by interacting with a dynamic binding site. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 127–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90089-7)
- Zhang, D.W., Colombini, M., 1989. Inhibition by aluminum hydroxide of the voltage-dependent closure of the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim. Biophys. Acta* 991, 68–78. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90030-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90030-5)
- Zhang, Q., Song, G., Yao, L., Liu, Y., Liu, M., Li, S., Tang, H., 2018. miR-3928v is induced by HBx via NF- κ B/EGR1 and contributes to hepatocellular carcinoma malignancy by down-regulating VDAC3. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 37, 14. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0681-y>
- Zhou, K., Yao, Y.-L., He, Z.-C., Chen, C., Zhang, X.-N., Yang, K.-D., Liu, Y.-Q., Liu, Q., Fu, W.-J., Chen, Y.-P., Niu, Q., Ma, Q.-H., Zhou, R., Yao, X.-H., Zhang, X., Cui, Y.-H., Bian, X.-W., Shi, Y., Ping, Y.-F., 2018. VDAC2 interacts with PFKF to regulate glucose metabolism and phenotypic reprogramming of glioma stem cells. *Cell Death Dis.* 9, 988. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1015-x>
- Zhou, P., Bogacki, R., McReynolds, L., Howley, P.M., 2000. Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Mol. Cell* 6, 751–756. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00074-5)
- Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., Liang, X., 2017. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses* 9, 316. <https://doi.org/10.3390/v9110316>
- Zhu, Y.X., Shi, C.-X., Bruins, L.A., Jedlowski, P., Wang, X., Kortüm, K.M., Luo, M., Ahmann, J.M., Braggio, E., Stewart, A.K., 2017. Loss of FAM46C promotes cell survival in myeloma. *Cancer Res.* 77, 4317–4327. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3011>
- Zhu, Z., Zhou, X., Du, H., Cloer, E.W., Zhang, J., Mei, L., Wang, Y., Tan, X., Hepperla, A.J., Simon, J.M., Cook, J.G., Major, M.B., Dotti, G., Liu, P., 2022. STING Suppresses Mitochondrial VDAC2 to Govern RCC Growth Independent of Innate Immunity. *Adv. Sci.* 10, 2203718. <https://doi.org/10.1002/advs.202203718>
- Zinghirino, F., Pappalardo, X.G., Messina, A., Guarino, F., De Pinto, V., 2020. Is the Secret of

VDAC Isoforms in Their Gene Regulation? Characterization of Human VDAC Genes Expression Profile, Promoter Activity, and Transcriptional Regulators. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7388. <https://doi.org/10.3390/ijms21197388>

Zinghirino, F., Pappalardo, X.G., Messina, A., Nicosia, G., De Pinto, V., Guarino, F., 2021. VDAC Genes Expression and Regulation in Mammals. *Front. Physiol.* 12.

Zizi, M., Byrd, C., Boxus, R., Colombini, M., 1998. The voltage-gating process of the voltage-dependent anion channel is sensitive to ion flow. *Biophys. J.* 75, 704–713. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77560-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77560-5)

Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E., Colombini, M., 1994. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J. Biol. Chem.* 269, 1614–1616.

Zou, L., Linck, V., Zhai, Y.-J., Galarza-Paez, L., Li, L., Yue, Q., Al-Khalili, O., Bao, H.-F., Ma, H.-P., Thai, T.L., Jiao, J., Eaton, D.C., 2018. Knockout of mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3 increases reactive oxygen species (ROS) levels and alters renal sodium transport. *J. Biol. Chem.* 293, 1666–1675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798645>

Titre : Rôle du canal mitochondrial VDAC2 dans la régulation des protéines effectrices de l'apoptose BAK et BAX dans le Myélome Multiple

Mots clés : Myélome Multiple, VDAC2, apoptose, BAK, Leucémies à plasmocytes, BCLXL

Résumé : Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne rare où des plasmocytes tumoraux envahissent la moelle osseuse. Malgré les avancées thérapeutiques, les patients rechutent, notamment par échappement à l'apoptose. Ce travail vise à comprendre le mécanisme de mort cellulaire mis en place par VDAC2, qui appartient à la famille des canaux mitochondriaux voltage-dépendants avec VDAC1 et VDAC3. Les 3 VDACs sont exprimés de manière hétérogène dans le MM. Une faible expression de VDAC2 est associée à une survie globale défavorable dans 764 échantillons d'une cohorte de MM. De plus, l'expression de VDAC2 et de BAK est corrélée au niveau ARN et protéique. VDAC2 est crucial pour la stabilité protéique et la fonction de BAK, mais pas pour celle de BAX. Nous avons démontré que l'extinction de VDAC2 par CRISPR/Cas9 dans 2 lignées cellulaires de MM entraîne la dégradation de BAK par les voies du protéasome et du lysosome, ce qui abolit le priming mitochondrial.

Inversement, l'inhibition transitoire de VDAC2, tout en maintenant les niveaux de protéine BAK, a augmenté le priming mitochondrial, a induit l'activation de BAK et a renforcé la mort cellulaire induite par des BH3-mimétiques ciblant MCL-1 (S63845) ou ciblant BCL-2 (venétoclax) dans les cellules de MM. L'utilisation de l'Efsevin, un modulateur de VDAC2, synergise avec le S63845 et le venétoclax dans les lignées et des échantillons primaires, représentant une cible thérapeutique potentielle.

Enfin, la Leucémie à Plasmocytes secondaire (sPCL) est une forme rare de MM présentant peu d'options thérapeutiques. Nous avons démontré l'efficacité du DT2216, PROTAC ciblant la protéine BCL-XL sans induire de thrombocytopénie, dans des HMCLs et échantillons primaires dépendants de BCL-XL, qui active les effecteurs BAK et BAX et permet le relargage de cytochrome c, ce qui déclenche l'apoptose.

Title : Role of the mitochondrial channel VDAC2 in the regulation of apoptosis effector proteins BAK and BAX in Multiple Myeloma

Keywords : Multiple Myeloma, VDAC2, apoptosis, BAK, Plasma Cell Leukemia, BCLXL

Abstract : Multiple Myeloma (MM) is a rare malignant hematological disorder where tumor plasma cells invade the bone marrow. Despite therapeutic advancements, patients experience relapses, particularly due to escape from apoptosis. This work aims to understand the mechanism of cell death mediated by VDAC2, which belongs to the family of voltage-dependent mitochondrial channels along with VDAC1 and VDAC3. The three VDACs are expressed heterogeneously in MM. Low expression of VDAC2 is associated with unfavorable overall survival in 764 samples from an MM cohort. Furthermore, the expression of VDAC2 and BAK is correlated at both RNA and protein levels. VDAC2 is crucial for protein stability and BAK function, but not for BAX. We demonstrated that the knockout of VDAC2 using CRISPR/Cas9 in two MM cell lines leads to the degradation of BAK via proteasomal and lysosomal pathways, abolishing mitochondrial priming.

Conversely, transient inhibition of VDAC2, while maintaining BAK protein levels, increased mitochondrial priming, induced BAK activation, and enhanced cell death triggered by BH3 mimetics targeting MCL-1 (S63845) or BCL-2 (venetoclax) in MM cells. The use of Efsevin, a VDAC2 modulator, synergizes with S63845 and venetoclax in cell lines and primary samples, representing a potential therapeutic target.

Lastly, secondary Plasma Cell Leukemia (sPCL) is a rare form of MM with limited treatment options. We have demonstrated the efficacy of DT2216, a PROTAC targeting BCL-XL protein without inducing thrombocytopenia, in BCL-XL-dependent HMCLs and primary samples, which activates BAK and BAX effectors and triggers apoptosis.