



HAL
open science

Etude de l'implication de mécanismes épigénétiques dans la physiopathologie du myélome multiple et dans la différenciation plasmocytaire normale

Laurie Herviou

► To cite this version:

Laurie Herviou. Etude de l'implication de mécanismes épigénétiques dans la physiopathologie du myélome multiple et dans la différenciation plasmocytaire normale. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT019 . tel-02401492

HAL Id: tel-02401492

<https://theses.hal.science/tel-02401492>

Submitted on 10 Dec 2019

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie du Cancer - Épigénétique

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche UMR9002 CNRS-UM – Institut de Génétique Humaine

Étude de l'implication de mécanismes épigénétiques dans la physiopathologie du myélome multiple et dans la différenciation plasmocytaire normale

Présentée par Laurie HERVIOU

Le 13 septembre 2018

Sous la direction de Jérôme MOREAUX

Devant le jury composé de

Jérôme MOREAUX, MCF, Institut de Génétique Humaine

Laurent DELPY, DR, Centre de Biologie et Recherche en Santé

Mary CALLANAN, PU-PH, Institut pour l'avancée des biosciences

Anne-Marie MARTINEZ, PU, Institut de Génétique Humaine

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapportrice

Présidente et

Examinatrice



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma sincère reconnaissance et mes remerciements à mon directeur de thèse Jérôme Moreaux pour sa patience, son soutien, sa confiance et ses encouragements. Jérôme, ta positivité constante, ta gentillesse et ton entrain m'ont beaucoup aidé à voir plus grand et à apaiser mes éternelles angoisses. Cela a été un réel plaisir de travailler et d'échanger avec toi.

Je tiens, de manière générale, à remercier toute l'équipe de Jérôme : elle est constituée de personnes formidables et brillantes. L'ambiance tout au long de ma thèse était tout ce que je pouvais espérer.

Un grand merci notamment à mes collègues de bureau qui m'ont supportée et soutenue pendant ces 4 ans. Ouissem, comme je te l'ai dit, tu es le rayon de soleil du labo : ton humour, ton rire et tes larmes de joies, tes encouragements notamment pour le sport, la correction de mes mails, nos échanges de maman/marraine « gaga » sur les bébés d'amour, ta rigueur, ta bonne humeur, tes petites et grandes attentions et ton soutien m'ont énormément touchée et ont fait de mon séjour dans le labo une période inoubliable que j'appréhende à quitter. Tu es une très belle personne, et je suis ravie d'avoir partagé le fameux bureau « étudiant »/cafét avec toi pendant ces 4 ans.

Elena, Elenita, mama bear, I miss you so much since you left for your new life in Boston. Thank you so much for your kindness, you always had sweet and nice words to say, making my days better everytime. You really are an inspiring person, always had great advice and were of great support to me: I am sincerely thankful for your friendship during the couple of years I spend with you in the lab. See you in the US maybe.

Merci à toi aussi Matthieu, mon voisin de bureau, co-utilisateur de l'unique ventilateur et protecteur de la plante. J'ai beaucoup apprécié ton humour pince-sans-rire, tes anecdotes hilarantes sur le zoo, ta répartie sans faille, tes blagues toujours bien placées ainsi que ta gentillesse et ta générosité. Merci pour les conseils/débats/inputs sur les séries (non je ne suis pas addicte...eh oui, ce sont mes vrais amis), l'initiation à la lecture de comics, les formations Star Wars et DC comics vs Marvel (j'ai un peu tout oublié), ton avis toujours mesuré et les nombreuses discussions enrichissantes que l'on a partagées.

Hugues, je te mets dans le groupe des collègues de bureau : vu toutes tes pauses café, c'est tout comme si c'était le tien aussi (hahaha). Blague à part, il m'a fallu du temps pour m'en rendre compte (« mais qui est ce grand dadais de sang noble qui n'arrête pas de m'embêter ? »), mais tu es vraiment une personne formidable. Je suis vraiment reconnaissante pour tous les conseils avisés que tu as pu me donner, ton humour décalé qui m'a souvent déridée (ton duo avec Matthieu mériterait d'être mis en scène) et tes nombreuses boutades provoquant mon fameux regard (mon seuil de résistance a augmenté grâce à toi, je t'en remercie).

Elvira, quel bonheur de t'avoir rencontrée et d'avoir travaillé avec toi. Il nous en a fallu du temps avant de commencer à discuter, entre notre timidité et mon côté sauvage avéré. Mais une fois la frontière franchie (non pas la frontière espagnole), une amitié est née, remplie de discussions interminables sur nos passions et nos doutes partagés, ainsi que de sorties extra-lab toujours agréables. Ta gentillesse, ton soutien et tes conseils ont énormément compté pour moi pendant ces quelques années, et je t'en remercie sincèrement.

Je remercie également Coraline qui a passé un peu de temps avec nous : merci pour ton joli rire que l'on reconnaît de loin et qui nous met de bonne humeur, pour les discussions que l'on a pu avoir à la sortie du labo et pour la sonnerie de la hotte pendant 1 min.

Merci également aux personnes de passage, mais qui m'ont beaucoup appris, chacun à leur manière : Paul, Mélanie et Pauline (deux jeunes femmes déterminées et brillantes qui iront loin), Moukbel (hum), Fiona, Gaëlle... et surtout mon ex-voisin Sylvain le Dr Lamouuure (poulet) pour les repas et les commérages, pour sa gentillesse, son humilité, son honnêteté et sa générosité.

Je remercie ensuite l'équipe STI avec qui j'ai partagé le laboratoire. De manière générale, merci pour votre aide technique, pour les cellules de patients et pour vos conseils. Stéphanie, je pense bien que tu es l'une des premières personnes avec qui j'ai parlé dans le labo (la localisation du premier échange reste entre nous) : tu as un vrai don pour mettre les personnes à l'aise, et je t'en remercie. Toute ma gratitude pour ta gentillesse, ta générosité sans limite, tes précieux conseils boulot/perso/déco/gâteaux, les papotages dans le couloir pendant les temps d'incubation (un peu rallongé des fois), ton soutien moral pendant les coups durs et ton écoute. Merci aussi pour la correction de mon manuscrit. Tu es une personne merveilleuse et il n'y a aucun doute que je ne serais pas arrivée aussi loin si tu n'avais pas été là. Un grand et immense MERCI donc.

Merci Nicolas pour ta gentillesse et ta grande patience, pour avoir partagé les bons plans de Montpellier, pour les discussions randonnée/escalade/voyage/jazz, pour tes conseils de cytométrie, pour les sessions guitare à la plage, ainsi que pour ta sérénité contagieuse.

Je tiens également à remercier Guilhem, pour ta passion, pour tes conseils pro et perso, ainsi que pour ton coaching et ton écoute dans les moments difficiles. Guilhem, tu es l'un des piliers majeurs du laboratoire, ton envie et ta capacité à partager ton savoir sur la science tout comme sur la vie sont des qualités que j'ai énormément appréciées et qui ont été essentielles à l'aboutissement de ma thèse. Merci beaucoup.

Tous mes remerciements au reste de la Research Team : Alboukadel et Veronika pour leurs conseils en bioinformatique, Michel, Angélique et Julie. Michel, merci de m'avoir transmis tes connaissances sur la différenciation plasmocytaire, pour la gestion du labo et pour toutes les discussions intéressantes à la cantine ou pendant la pause café, sur les oiseaux, la nature, le vin... Bonne retraite à toi ! Je remercie également Angélique pour les soirées (poker et autres), la fête à la Calmette, pour tes conseils et ton soutien, pour ta gentillesse et ton sourire. Je suis ravie d'avoir passé ces 4 ans avec toi. Encore toutes mes Félicitations pour le petit Lorenzo !! Je remercie aussi Julie pour ta gentillesse et tous tes précieux conseils.

Je tiens également à faire part de ma reconnaissance à l'équipe de Philippe Pasero, qui nous ont accueillis à bras ouverts : Yea-Lih, Flavie, Romain, Alexy, Axel, Mélanie, Maria, Antoine..... Merci à Philippe pour sa gentillesse et ses conseils, sans lesquels je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Tous mes remerciements à Giacomo Cavalli pour sa collaboration sur nos projets. I would like to thank Satish Sati who mentored me for ChIP-seq and HiC : your patience, your teaching skills, your availability every time I needed your help and your advice taught me a lot during these 4 years. It was a real pleasure collaborating with you.

Je tiens à remercier tout particulièrement Anne-Marie Martinez. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Anne-Marie, ta passion pour la science et ta détermination sont une source d'inspiration pour moi depuis que je t'ai eue en cours pour la première fois il y a 6 ans. Merci pour ton soutien et tes conseils. La science a besoin de plus de personnes comme toi et de cette capacité à transmettre le savoir avec autant d'entrain et de passion.

Merci également à Amélie Sarrazin pour tous tes conseils.

Tous mes remerciements aux membres de mon comité de thèse Eric Julien, Jean-Christophe Andrau et Anne-Marie Martinez pour leur soutien et leurs précieux conseils. Merci également à Mary Callanan et Laurent Delpy qui ont gentiment accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes sincères remerciements aux organismes ayant financé ma thèse : le Labex EpiGenMed et la Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies (FFRMG).

De manière plus personnelle, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes amis qui m'ont soutenue, conseillée, épaulée et divertie pendant ces 4 ans. Je n'ai pas assez de mots (et de place) pour vous exprimer toute la reconnaissance que vous méritez. Vous avez toujours trouvé les mots et toujours été présents à mes côtés, et j'ai conscience d'avoir une chance inouïe de vous avoir dans ma vie. Merci donc à Fanny et Dylan (on les a bien vécus et survécus ces 4 ans de thèse), Anaïs, Antoine, Lorinda, Émilie (vive WhatsApp) et Solène.

Last but not least, je voudrais remercier ma sœur Marie, mes parents et mes grands-parents pour leur écoute, leurs nombreux conseils (très bons mais pas toujours appliqués...) et leur immense soutien. Un des plus merveilleux moments de ces 4 ans fût la naissance de mon filleul Gaspard, mon plus grand bonheur et ma plus grande fierté. Un si petit bout plein de vie qui m'a aidée, sans s'en rendre compte, à apprendre à relativiser et à vivre pleinement le moment présent : merci Marie et Aurélien pour ce beau petit être que vous avez accueilli dans ce monde.

J'ai également une pensée pour les personnes proches de mon cœur que nous avons perdues trop tôt : Frédéric, Valérie, Laurent, Gérard, Thérèse, Christian... Vous êtes la source de ma détermination et mon engagement dans la recherche : pour vous, nous trouverons !

Table des matières

| | |
|--|------------|
| ABRÉVIATIONS..... | 7 |
| INTRODUCTION | 9 |
| I. L'ÉPIGÉNÉTIQUE | 11 |
| A. <i>Définition.....</i> | 11 |
| B. <i>Les microARNs.....</i> | 12 |
| C. <i>La méthylation de l'ADN</i> | 13 |
| D. <i>Conformation nucléaire 3D.....</i> | 15 |
| E. <i>Les PTMs des histones.....</i> | 17 |
| 1) Généralités..... | 17 |
| 2) La lysine méthyltransférase SETD8..... | 20 |
| (a) SETD8 et H4K20me1 au cours du cycle cellulaire..... | 21 |
| (b) Rôle de SETD8 dans la régulation de la transcription | 22 |
| (c) Rôle de SETD8 dans le cancer..... | 23 |
| 3) La lysine méthyltransférase EZH2..... | 24 |
| (a) EZH2 d'un point de vue mécanistique | 25 |
| (b) EZH2, développement et différenciation..... | 29 |
| (c) EZH2 dans les cancers | 31 |
| (d) EZH2 comme cible thérapeutique dans différents types de cancers..... | 32 |
| II. LA DIFFÉRENTIATION PLASMOCYTAIRE NORMALE..... | 34 |
| A. <i>Généralités.....</i> | 34 |
| B. <i>Rôles des différents mécanismes épigénétiques dans la régulation de la PCD.....</i> | 43 |
| 1) Rôle des miARN dans la PCD..... | 44 |
| 2) Variation du profil de méthylation de l'ADN au cours de la PCD..... | 46 |
| 3) Rôle de l'architecture nucléaire 3D dans la PCD..... | 47 |
| 4) Rôle des modifications d'histones dans la régulation de la PCD | 51 |
| 5) Rôle d'EZH2 dans la formation des GCs et la PCD | 52 |
| III. MYÉLOME MULTIPLE | 55 |
| A. <i>Épidémiologie.....</i> | 55 |
| B. <i>L'origine de la myélomagenèse.....</i> | 56 |
| C. <i>Caractérisation moléculaire du MM.....</i> | 57 |
| 1) Les anomalies chromosomiques récurrentes | 58 |
| 2) Les mutations secondaires | 59 |
| 3) La classification moléculaire | 61 |
| 4) Hétérogénéité intra-clonale et évolution du MM | 61 |
| 5) Les dérégulations épigénétiques | 63 |
| (a) Altération du profil de méthylation de l'ADN dans le MM | 63 |
| (b) Dérégulations de l'expression de miARNs dans le MM | 64 |
| (c) Modification de l'organisation 3D de la chromatine dans le MM..... | 65 |
| (d) Variation globale des modifications d'histones dans le MM | 66 |
| (e) Rôle d'EZH2 dans le MM | 67 |
| D. <i>Interactions avec le microenvironnement.....</i> | 71 |
| E. <i>Notre modèle d'étude : les lignées cellulaires de MM</i> | 71 |
| F. <i>Traitement du MM.....</i> | 72 |
| 1) Agents thérapeutiques conventionnels et résistances..... | 72 |
| 2) Prise en charge des patients et stratégies thérapeutiques | 76 |
| 3) Nouvelles approches thérapeutiques, validées ou en essais cliniques..... | 78 |
| (a) Immunothérapie et anticorps monoclonaux | 78 |
| (b) Thérapies ciblées | 81 |
| (c) Molécules ciblant des enzymes épigénétiques ou Epi-drogues..... | 82 |
| Les inhibiteurs de protéines à bromodomains en clinique dans le MM | 82 |
| Les inhibiteurs d'histone déacétylases en clinique dans le MM | 83 |
| Les inhibiteurs de DNA méthyltransférases en clinique dans le MM..... | 83 |
| Les inhibiteurs d'EZH2 en préclinique et clinique dans le MM | 84 |
| REVUES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 89 |
| I. REVUE 1 : ROLE OF EZH2 IN NORMAL HEMATOPOIESIS AND HEMATOLOGIC MALIGNANCIES | 91 |
| II. REVUE 2 : RÔLE D'EZH2 COMME BIOMARQUEUR DANS LE TRAITEMENT PERSONNALISÉ DU MYÉLOME MULTIPLE | 107 |

| | |
|---|------------|
| RÉSULTATS | 125 |
| I. ARTICLE 1 : EZH2 IS OVEREXPRESSED IN TRANSITIONAL PREPLASMA BLASTS AND IS INVOLVED IN HUMAN PLASMA CELL DIFFERENTIATION | 127 |
| II. PRC2 TARGETING IS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR EZ-SCORE DEFINED HIGH-RISK MULTIPLE MYELOMA PATIENTS AND OVERCOME RESISTANCE TO IMiDS | 173 |
| DISCUSSION | 229 |
| CONCLUSIONS | 247 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 251 |
| ANNEXES | 271 |
| I. ARTICLE : PREDICTION OF MULTIPLE MYELOMA CELLS SENSITIVITY TO DNMTi/HDACi COMBINED EPIGENETIC TARGETED TREATMENT | 273 |
| II. BREVET : METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA | 287 |
| RÉSUMÉ..... | 331 |
| ABSTRACT | 332 |

Abréviations

A

ADN : Acide DesoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ARNlnc : ARN long non-codant
Ac : Anticorps
Ag : Antigène
ATAC-seq : Assay for Transposase-Accessible Chromatin suivi de séquençage haut débit
ASCT : Transplantation de cellules souches autologues
ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADCP : Antibody-dependent cellular phagocytosis
ADC : Anticorps couplés à des drogues

B

BETi : inhibiteur de protéines à bromodomaine BET

C

5mC : 5-méthylcytosine
5hmC : 5-hydroxyméthylcytidine
CNV : variations de nombre de copies
CSR : commutation isotypique
ChIP-seq : immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage haut débit
CDC : complément-dépendent cytotoxicity
CAR : récepteur antigénique chimérique
CAM-DR : résistance aux drogues par contact cellulaire

D

DNAme : méthylation de l'ADN
DNMT : ADN méthyltransférase
DNMTi : inhibition de DNMT

E

EZH2i : inhibiteur d'EZH2

G

GC : centre germinatif

H

HMT : histone méthyltransférase
HDM : histone déméthylase
HDAC : histone deacétylase
HAT : histone acétyltransférase
HDACi : inhibiteur de HDAC
HMCL : lignée humaine de myélome

I

IC50 : concentration inhibitrice médiane
Ig : immunoglobuline
IMiD : agent immunomodulateur
ICL : interstrand crosslink

K

KMT : lysine méthyltransférase

L

LAD : lamina-associated chromatin domains
LLPC : plasmocyte à longue durée de vie

M

miARN : microARN
MHC : complexe majeur d'histocompatibilité
MO : moelle osseuse
MM : myélome multiple
MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MMC : cellule de myélome
mAb : anticorps monoclonal
MBC : lymphocyte B mémoire

N

NADs : nucleolus-associated chromatin domains
NGS : séquençage de nouvelle génération

P

PTM : modification post-traductionnelle
PC : plasmocyte
PB : plasmablaste
prePB : préplasmablaste
PCD : différenciation plasmocytaire
PCL : leucémie plasmocytaire

R

RE : réticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygen species

S

SHM : hypermutation somatique
SMM : smoldering myeloma

T

TAD : topologically-associated domains
TF : facteur de transcription
TSS : transcription start site

U

UPR : unfolded protein response

Introduction

I. L'épigénétique

A. Définition

« Comment un seul ovule fertilisé peut-il générer un organisme complexe composé de cellules de phénotypes différents ? »

Il s'agit là d'une des premières questions à l'origine de l'étude des changements d'expression génique héréditaires, via la mitose et/ou la méiose, ne modifiant pas la séquence d'ADN : l'épigénétique. L'épigénétique est un champ de recherche très vaste et malgré l'ample évolution de ce domaine depuis plus de 50 ans, il existe encore quelques consensus à propos de ses aspects fondamentaux, incluant la délimitation conceptuelle de ce qui est considéré ou pas comme étant de l'épigénétique¹⁻³.

Au cours du développement et de la différenciation cellulaire, les mécanismes épigénétiques participent dans un premier temps à l'établissement d'un nouvel état cellulaire, puis au maintien de cet état permettant de stabiliser l'identité cellulaire. Ces processus sont nécessaires au fonctionnement normal des organismes multicellulaires. Les modifications épigénétiques régulent également l'expression de gènes en fonction des conditions environnementales. Il s'agit d'un phénomène conférant à l'organisme la plasticité nécessaire pour s'adapter à son environnement et la capacité à induire des phénotypes alternatifs à partir d'un même génotype⁴.

Au cours de la vie d'un organisme, les cellules somatiques comme germinales peuvent développer des dérégulations épigénétiques et peuvent transmettre ces changements à leur progéniture. Des changements et altérations de l'épigénome peuvent apparaître au cours du temps, sous l'influence de facteurs internes, externes et/ou stochastiques, et peuvent être responsables de l'apparition de nombreuses pathologies. Les dérégulations de l'épigénome sont des mécanismes importants participant au développement et à la progression tumorale. Ces anomalies épigénétiques peuvent être réversibles, par opposition aux mutations se développant en parallèle dans le génome de la tumeur, et peuvent donc constituer d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Les fonctions du génome sont inexorablement liées à l'épigénome. La régulation épigénétique impacte l'état transcriptionnel, la compaction locale ou globale de la chromatine, et le partitionnement du matériel épigénétique pendant les réponses aux dommages de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Au niveau moléculaire, l'épigénétique est basée sur

différents mécanismes incluant la méthylation de l'ADN (DNAm), les microARNs (miARNs), les modifications post-traductionnelles (PTMs) d'histones, les variants d'histones et la topologie nucléaire globale^{1,2}.

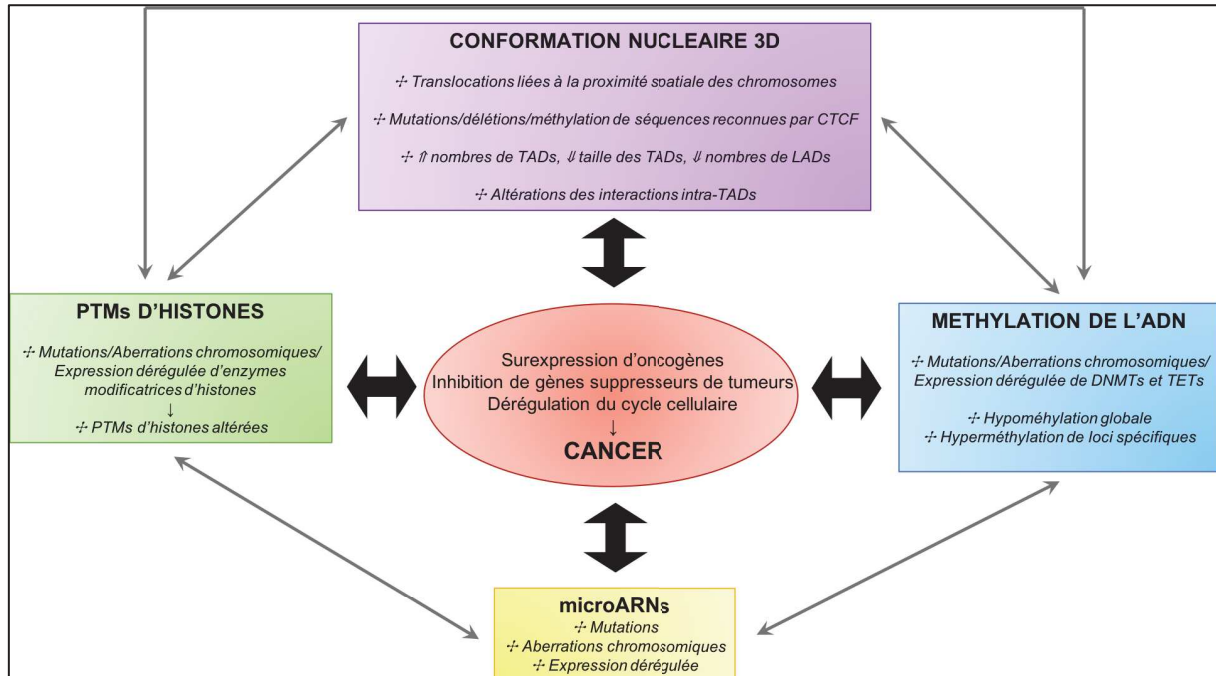


Figure 1 : Schéma résumé du rôle et des dérégulations de différents mécanismes épigénétiques dans le cancer - Les différents mécanismes épigénétiques mentionnés peuvent s'inter-réguler.

B. Les microARNs

Les microARNs sont des ARNs non-codants de 18-24 nucléotides capables de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en se fixant, en collaboration avec le complexe RISC, sur la région 3'UTR de leur ARN messagers (ARNm) cibles. Cette interaction conduit à la diminution de la traduction ou la dégradation de l'ARNm. Leur potentiel de régulation est vaste : plus de 60% des gènes codant pour des protéines ont été prédits comme pouvant être des cibles de miARNs. Ces derniers constituent un mécanisme épigénétique redondant, d'une part du fait que chaque miARN peut avoir plusieurs ARNm cibles, mais également que chaque ARNm peut être ciblé par différents miARNs⁵. Bien que les miARNs soient des facteurs héréditaires à travers la mitose et la méiose, capables de réguler l'expression des gènes sans changer la séquence d'ADN, leur classification en tant que facteurs épigénétiques est encore débattue³.

Les miARNs jouent un rôle important dans différents processus cellulaires, dont la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la capacité d'invasion, et des fonctions spécifiques à certains tissus telles que les réponses immunitaires, les sécrétions hormonales ou l'angiogenèse. Tous ces processus sont impliqués dans le développement et l'évolution de cancers⁶ (Figure 1). L'expression de différents miARNs est dérégulée dans la plupart des cancers à travers différents mécanismes, dont des défauts de la machinerie de biogénèse des miARN, l'amplification/délétion de régions contenant des miARNs, ou un contrôle transcriptionnel aberrant⁷. Les miARNs peuvent également être dérégulés par une méthylation anormale de l'ADN ou par des altérations des PTMs des histones régulant leur transcription⁸. D'autre part, plusieurs miARNs, les épi-miARNs, sont capables de réguler différents acteurs épigénétiques (PRC1, PRC2, DNMTs, HDACs...) et sont souvent dérégulés dans les cancers⁹. De plus, il a été montré que certains miARNs pouvaient être présents dans le noyau, dans lequel ils régulent l'expression de gènes via leur fixation sur certains promoteurs, entraînant le recrutement d'acteurs de la transcription⁹.

C. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le processus épigénétique le plus largement étudié. D'un point de vue biochimique, cette marque épigénétique est caractérisée par l'addition covalente d'un groupement méthyle (CH₃) sur le carbone 5 des cytosines pour former la 5-méthylcytosine (5mC), principalement dans un contexte de dinucléotides CpG. La méthylation de l'ADN est catalysée par une famille d'enzymes appelées ADN méthyltransférases (DNMTs). DNMT3A et DNMT3B, dites ADN méthyltransférases « de novo », sont capables de méthyler de l'ADN précédemment non-modifié. DNMT1 fonctionne au cours de la réplication de l'ADN afin de copier le profil de méthylation du brin d'ADN parental sur le brin nouvellement synthétisé : il s'agit de l'ADN méthyltransférase dite « de maintenance ». Ces DNMTs, impliquées dans l'embryogénèse, voient leur expression significativement diminuée dans les cellules différenciées, suggérant que le profil de méthylation de l'ADN des cellules post-mitotiques est stable.

La déméthylation de l'ADN peut être un processus passif lié à la prolifération des cellules¹⁰, ou un processus actif. La déméthylation active est médiée par les enzymes de la famille TET, capables d'oxyder les cytosines méthylées pour former notamment des résidus de 5-hydroxyméthylcytidine (5hmC), qui sont ensuite remplacés par des cytosines non-méthylées

via des mécanismes de réparation de l'ADN¹¹. Par ailleurs, l'enzyme AID, essentielle au processus d'hypermutation somatique (SHM) dans les cellules B du centre germinatif (GC), pourrait être une nouvelle candidate pour la déméthylation active de l'ADN. La déamination des 5mC entraînerait la formation de mésappariements T>G, induisant le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN, et ainsi la correction de la thymine en cytosine non-méthylée^{12,13}.

La méthylation de l'ADN est notamment impliquée dans l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X ou encore la suppression d'éléments transposables. Elle est aussi associée à la répression des gènes lorsqu'elle est située sur des régions régulatrices, empêchant ainsi la fixation de facteurs de transcription ou favorisant le recrutement de complexes corépresseurs de la transcription au niveau des promoteurs des gènes cibles. Par ailleurs, il a été suggéré que la méthylation des corps de gènes pouvait promouvoir la transcription¹⁴. Cependant, des études récentes du méthylome de l'ADN et du transcriptome ont révélé que leur association est plus nuancée que ce qui avait été observé précédemment. La méthylation de l'ADN peut en effet avoir de multiples rôles en fonction du contexte, notamment la présence d'autres modifications épigénétiques¹⁵.

L'hydroxyméthylation de l'ADN, longtemps considérée comme étant un état transitoire, est présente de manière stable sur certains promoteurs, au niveau de corps de gènes activement transcrits et de régions régulatrices actives ou en état de pause. Le rôle de la 5hmC dans la régulation de la transcription des gènes reste cependant élitif. Il a été notamment suggéré qu'il était dépendant du type cellulaire et du contexte chromatinien¹⁶.

Ces deux modifications des cytosines sont dérégulées dans de nombreux cancers (Figure 1). En effet, l'oncogénèse est associée à une hypométhylation globale de l'ADN, une diminution globale du taux de 5hmC, ainsi qu'une hyperméthylation localisée de certains loci^{15,16}. Bien que ces aberrations du profil de méthylation ne soient pas toujours associées à l'expression des gènes, il a été montré que cette marque épigénétique pouvait être utilisée comme biomarqueurs pour le diagnostic, l'établissement du pronostic et le suivi de réponse aux traitements des patients atteints de cancers¹⁷. Par ailleurs, une surexpression, des mutations ou des délétions des DNMTs ont été détectées dans différents cancers¹⁸. Des protéines TET sont également mutées, anormalement transloquées ou sous-exprimées dans de nombreux cancers¹⁹. De plus, l'utilisation de molécules inhibant les DNMTs sur plusieurs modèles de cancer a montré une réelle efficacité sur la prolifération et la survie des cellules tumorales, notamment via la réactivation de suppresseur de tumeur. La méthylation de l'ADN constitue

donc une cible thérapeutique potentielle dans les cancers. Des essais cliniques sont actuellement en cours dans différentes hémopathies et tumeurs solides¹⁷.

D. Conformation nucléaire 3D

L'ADN des cellules de mammifères est organisé en chromosomes, qui sont eux-mêmes repliés et conditionnés via différents mécanismes et qui occupent des positions spécifiques dans le noyau. Ces territoires chromosomiques créent des contacts inter-chromosomiques, ainsi qu'une interaction avec différents compartiments nucléaires, tels que le nucléole ou l'enveloppe nucléaire. Dans la plupart des cellules, la périphérie du noyau est associée à de l'hétérochromatine, alors que l'euchromatine est plus souvent localisée au centre du noyau.

L'interaction de la chromatine avec la lamine B, protéine située au niveau de la surface interne de l'enveloppe nucléaire, forment les LADs (lamina-associated chromatin domains). Ces régions sont enrichies en H3K27me₃, séquences réprimées par le complexe Polycomb, et en H3K9me₃, séquences d'hétérochromatine. Ainsi, malgré leur faible densité, les gènes présents dans les LADs ne sont pas exprimés, suggérant qu'une localisation au niveau de la périphérie nucléaire entraînerait une répression de l'expression des gènes. Les LADs dit facultatifs (fLADs) varient en fonction des types cellulaires, alors que les LADs dit constitutifs (cLADs), riches en A-T, sont maintenus entre différents types cellulaires et sont hautement conservés entre espèces. Les NADs, séquences d'ADN associés au nucléole (nucleolus-associated chromatin domains) sont enrichies en séquences répétées, en séquences riches en A-T et en régions pauvres en gènes²⁰.

Les multiples niveaux de repliement de l'ADN génèrent de nombreux contacts entre différentes régions génomiques. Ces contacts sont influencés par la proximité des séquences d'ADN les unes avec les autres, par le repliement architectural local et les contacts chromatiniens de longue distance, et par les protéines s'associant directement ou indirectement avec l'ADN, telles que les protéines CTCF ou cohésine.

A l'échelle en dessous de la mégabase, les chromosomes forment des domaines topologiques, appelés les TADs (topologically-associating domains). La formation de ces domaines corrèle avec plusieurs caractéristiques génomiques telles que les modifications d'histones, une expression similaire de gènes en contact, l'association avec la lamine, et le timing de réplication de l'ADN. Les TADs semblent généralement conservés entre types cellulaires et

entre organismes. En revanche, les interactions à l'intérieur des TADs, les subTADs, peuvent varier en fonction du type cellulaire ou pendant les mécanismes de différenciation^{21,22}. Les TADs sont limités par des frontières, régions enrichies en protéine CTCF, en marques d'histones activatrices (H3K4me3 et H3K36me3), en transcrits naissants, en gènes de ménages, et en éléments répétés. Les interactions longue distance entre les TADs forment 6 compartiments distinguables grâce leur densité en gènes, le niveau d'expression de ces derniers, la présence de marques chromatiniennes (modifications d'histones), leur localisation dans le noyau (notamment NADs ou LADs), la composition des séquences d'ADN et à leur timing de réplication. La différenciation cellulaire est souvent associée à un changement de compartiment, actif vers inactif, ou réciproquement. Le fait que les changements de profil de transcription et de marques chromatiniennes soient la cause ou la conséquence des variations de l'architecture du génome reste néanmoins une question à investiguer.

La formation de boucles chromatiniennes entre deux segments distants d'ADN représente, à une échelle inférieure, un mécanisme de régulation génique important finement régulé. Les interactions promoteurs-enhancer permettent le rapprochement physique d'une région régulatrice linéairement distante du promoteur du gène à activer. Il existe également des associations spatiales entre les promoteurs de plusieurs gènes de même statut (réprimés ou activés), formant les clusters de gènes. Il a été montré que les promoteurs de ces clusters agissent probablement en synergie et favoriseraient l'efficacité de la transcription. Des interactions entre le promoteur d'un gène et son site de terminaison de la transcription ont également été décrites, favorisant la directionnalité de la synthèse de l'ARN. Plusieurs études ont montré que ces différents mécanismes participent, ou sont indispensables, à la régulation de l'expression de gènes ou encore à la réplication de l'ADN. Ils sont donc essentiels à la différenciation et au maintien de l'identité cellulaire, qui eux-mêmes modulent l'organisation des contacts entre régions chromosomiques^{21,23}.

Des perturbations de l'organisation du génome, à toutes les échelles, ont été observées dans différentes pathologies, notamment dans les cancers (Figure 1). Au niveau des territoires chromosomiques, la proximité spatiale des chromosomes influence directement la probabilité de translocations entre des loci génomiques spécifiques. La perturbation des frontières des TADs et des subTADs à cause de mutations, délétions ou d'une méthylation aberrante des sites de fixation de CTCF est associée à l'activation pathologique de gènes via la formation de boucles ectopiques avec un enhancer²⁴. Une diminution du nombre de LADs, associée à l'hypométhylation de l'ADN au niveau de ces régions, a été décrite dans les cancers²⁵. Les cellules cancéreuses sont également caractérisées par une augmentation du nombre de

frontières de TADs, entraînant une diminution de la taille des TADs. De façon intéressante, une grande proportion de nouvelles frontières de TADs dans les cancers apparaît au niveau de régions présentant des variations de nombre de copies (CNVs). Les changements de structure sont également accompagnés par de nouvelles interactions chromatiniennes à l'intérieur des TADs, enrichis au niveau de régions régulatrices comme les enhanceurs, les promoteurs, les insulateurs, et sont associés à une altération de l'expression des gènes^{26,27}.

E. Les PTMs des histones

1) Généralités

Le premier niveau de compaction de l'ADN est caractérisé par l'enroulement de l'hélice d'ADN autour d'un octamère d'histone : c'est ce qui forme le nucléosome, et à une plus grande échelle, la chromatine. Il existe 5 classes d'histones : les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment le cœur de l'octamère, alors que l'histone HP1 est l'histone « de liaison » permettant de stabiliser le nucléosome. Chaque classe d'histones (sauf H4) comprends plusieurs sous types, dont le profil d'expression dépend de la réplication ou du contexte cellulaire. Les histones exprimées dans les cellules proliférantes sont qualifiées de « canoniques ». Les autres sous-types, appelés les « variants d'histones », sont plus amplement exprimés dans les cellules différenciées par rapport aux cellules proliférantes²⁸ et jouent un rôle crucial dans la régulation de la ségrégation des chromosomes, de la transcription, de la réparation de l'ADN et bien d'autres processus^{29,30}.

Les acides aminés de la queue N-terminale des histones peuvent être modifiés au niveau post-traductionnel grâce à différents processus, tels que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation ou encore la SUMOylation³¹. Ces modifications chimiques sur différents acides aminés sont catalysées par de nombreuses enzymes, incluant les histones méthyltransférases (HMTs) et déméthylases (HDMs), les histones acétyltransférases (HATs) et déacétylases (HDACs), etc. (Figure 2). Un nombre croissant d'études mettent en évidence qu'une grande majorité des enzymes capables de modifier les histones sont également capables de modifier des protéines non-histones, régulant ainsi leur activité ou leur stabilité³². Les PTMs d'histones sont héritées au cours de la phase de réplication du cycle cellulaire, et peuvent être éditées en cas de différenciation cellulaire ou en réponse à diverses perturbations.

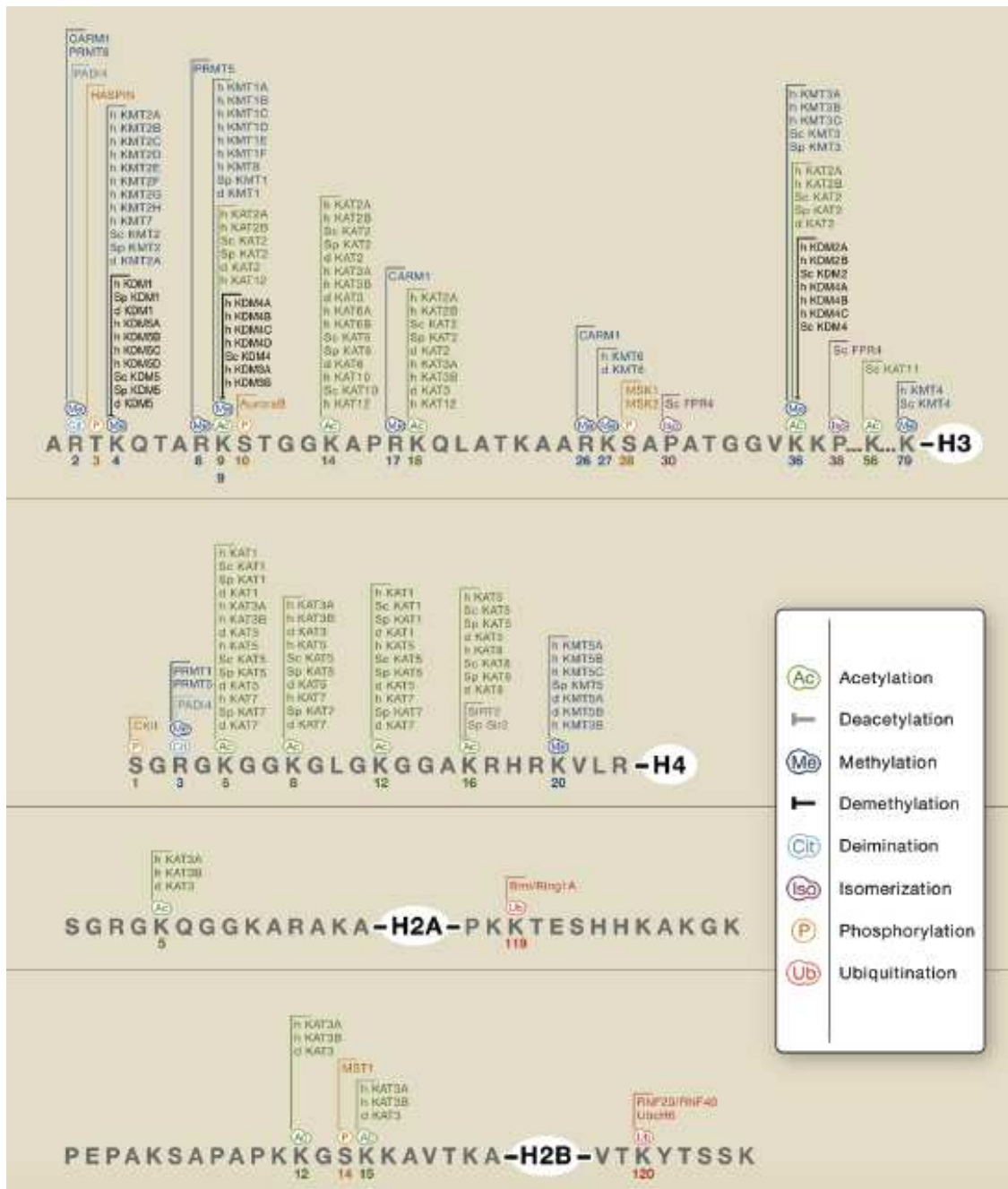


Figure 2 : Liste des modifications post-traductionnelles de différents acides aminés des différentes histones, ainsi que les enzymes associées, issus du Snapshot de la revue Cell « Histone-Modifying Enzymes », par T. Kouzarides³³.

La combinaison de différentes PTMs d'histones forme un « code histone » déterminant la structure et la fonction de région particulière de la chromatine³⁴. Au niveau de la nomenclature, la classe d'histone est précisée en premier, puis le nom et la position du résidu affectés et enfin la modification : si la lysine 9 de l'histone H3 est triméthylés, la nomenclature sera H3K9me3. Les marques histones affectent le statut biochimique de la chromatine, et donc son degré de compaction et la structure 3D du génome dans le noyau en

phase répliquative, en mitose et en interphase³⁵. Par ailleurs, elles représentent également un socle reconnu par les protéines dites « lectrices » au niveau de régions régulatrices, recrutant elles-mêmes différents acteurs régulant la transcription des gènes, la réplication de l'ADN³⁶ ou encore la réponse aux dommages à l'ADN. De ce fait, les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle important dans le statut prolifératif des cellules, leur adaptabilité face à des perturbations externes, mais également dans les processus de différenciation et le maintien de l'identité cellulaire.

La collaboration d'un consortium international a permis de générer des profils de multiples modifications d'histones sur le génome entier, ayant des fonctions distinctes (H3K4me3 pour les promoteurs, H3K4me1 pour les enhancers, H3K27ac les régions régulatrices actives, H3K36me3 pour les régions transcrites, H3K27me3 pour la répression médiée par Polycomb et H3K9me3 pour l'hétérochromatine). L'acétylation et la déacétylation des lysines des histones entraînent respectivement l'activation (décompaction) et la répression (compaction) de la région chromatinienne affectée. Les lysines acétylées au niveau d'enhancers peuvent être reconnues par des protéines à bromo-domaines BET, recrutant elles-mêmes d'autres protéines régulant la transcription.

Le rôle de la méthylation des histones est moins évident, et dépend notamment du résidu méthylé ainsi que du contexte cellulaire. Le rôle de différentes classes d'histone lysine méthyltransférases (KMTs) ainsi que les modifications d'histones qu'elles catalysent est présenté dans la Figure 3. Les différentes fonctions des KMTs EZH2 et SETD8 (ou PR-Set7) seront abordées par la suite.


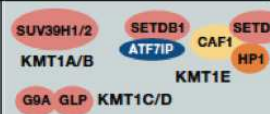
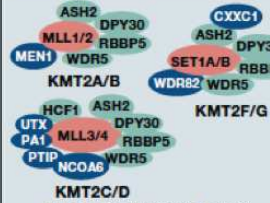



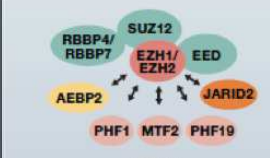
| Methylase | Substrate | Mammals  | Biochemical/ biological properties |
|-----------|-----------|---|--|
| KMT1 | H3K9 |  | Heterochromatin formation/silencing |
| KMT2 | H3K4 |  | Active transcription; homeotic gene expression; nuclear hormone receptor signaling |
| KMT3 | H3K36 |  | Active transcription |
| KMT4 | H3K79 |  | Active transcription; cell-cycle regulation; Wnt signaling |
| KMT5 | H4K20 |  | Transcriptional repression; DNA damage response |
| KMT6 | H3K27 |  | Polycomb silencing; X chromosome inactivation; cell fate determination |

Figure 3 : Tableau présentant différentes lysines méthyltransferases et la nature et les propriétés biologiques de leur substrat, issu du SnapShot de la revue Cell « Histone Lysine Methylase Complexes », par M. Mohan, H.M. Herz et A. Shilatifard³⁷.

Une expression aberrante ou des mutations/aberrations chromosomiques affectant les enzymes modifiant les histones et les variants d'histones^{30,38} ont été rapportées dans de nombreux cancers (Figure 1). Ces altérations affectent différents processus dont la régulation du cycle cellulaire et de la transcription d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs³⁹. L'utilisation de drogues épigénétiques, ou épi-drogues, ciblant différentes PTMs d'histones ou leur reconnaissance, tels que les inhibiteurs d'HDACs (HDACi), de KMTs, de KDMs, ou de protéines à bromo-domaines BET (BETi), représente une réelle stratégie thérapeutique, actuellement à l'essai sur de nombreux cancers⁴⁰⁻⁴².

2) La lysine méthyltransferase SETD8

La protéine SETD8 (ou PR-Set7) a été décrite, dans un premier temps, comme étant une histone méthyltransférase capable de mono-métyler la lysine 4 de l'histone H4 (H4K20me1). Depuis, d'autres protéines cibles non-histones ont été décrites, telles que p53, Numb, PCNA,... Via la méthylation de ses différents substrats, SETD8 intervient dans la régulation de plusieurs processus tels que le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la transcription, la réponse aux dommages à l'ADN, l'induction de l'apoptose, le métabolisme et la sénescence (Figure 4).

(a) SETD8 et H4K20me1 au cours du cycle cellulaire

L'abondance de la protéine SETD8 et de H4K20me1 fluctue au cours du cycle cellulaire, et participe à la régulation de ses différentes phases. En effet, alors que SETD8 n'est pas détectable de la fin de mitose (M), le niveau protéique de SETD8 augmente en fin de phase S et atteint son maximum en phase G₂^{43,44}. Ces variations peuvent être expliquées par le rôle important de SETD8 dans la réplication de l'ADN, notamment la sélection et l'activation de certaines origines de réplication (en particulier tardives) via la méthylation de H4K20. En effet, SETD8 mono-métyle H4K20 en fin de phase M, au niveau de certaines origines de réplication⁴³. Dès la fin de la mitose et le commencement de la phase G₁, SETD8 est dégradée via les E3 ubiquitin ligase APC^{Cdt1}, SCF^{F⁺-TRCP} et SCF^{Skp2}⁴⁴⁻⁴⁷. La dégradation de SETD8 favorise l'acétylation de H4^{44,48} et une relaxation de la chromatine compatible avec le passage en phase S⁴⁹.

Pendant la phase S, la protéine PCNA, indispensable à la synthèse de l'ADN et à la réponse aux dommages à l'ADN, est recrutée pour permettre la réplication. SETD8 est alors principalement dégradée par l'E3 ubiquitin ligase CRL4^{Cdt2}^{44,45,47,50-53}. De façon intéressante, SETD8 est capable de stabiliser PCNA via la méthylation de la lysine K248, régulant ainsi la réplication de l'ADN. En effet, l'absence de méthylation induit un retard de maturation des fragments d'Okazaki, un ralentissement de la réplication et l'induction de dommages à l'ADN⁵⁴. Plusieurs études montrent ainsi l'importance d'une régulation fine de l'abondance de SETD8 pendant le cycle cellulaire afin d'éviter la re-réplication de l'ADN. Une étude montre quant à elle que la mono-méthylation de H4K20 par SETD8 est un événement critique pour la maintenance de l'intégrité génomique des domaines à réplication tardive⁵⁵.

SETD8 pourrait également avoir un rôle dans la compaction de la chromatine. En effet, l'absence de SETD8 corrèle avec une augmentation d'aberrations au niveau des chromosomes mitotiques et une diminution de leur compaction⁵⁶. Ces observations pourraient

être liées aux protéines L3MBTL1 ou condensine II capables de reconnaître H4K20me1, et qui sont impliquées dans la compaction de la chromatine⁴⁶.

Aussi, l'absence de dégradation de SETD8 par PCNA aboutit à une compaction anormale de la chromatine et à un phénotype de re-réplication (comme avec les autres facteurs de licensing comme CDT1). Ceci conduit à l'apparition de dommages à l'ADN et donc à l'induction des checkpoints de réponse aux cassures de l'ADN. Il est également possible d'observer la répression de la transcription de gènes cibles d'E2F1, ainsi que des gènes codant pour des histones provoquant une décompaction de la chromatine. Alors que le phénotype de compaction et re-réplication sont liés à H4K20me1, la régulation de l'expression des gènes par SETD8 pourrait, quant à elle, dépendre de la méthylation de H4K20 et/ou d'autres substrats.

Ces effets conduisent à un arrêt du cycle en phase G1, l'induction de checkpoint G2/M, l'induction de l'apoptose et la dérégulation de l'expression de gènes^{50-53,56-59}.

(b) Rôle de SETD8 dans la régulation de la transcription

SETD8 peut avoir une fonction activatrice ou répressive de la transcription en fonction des gènes qu'elle régule, des voies de signalisation impliquées, ainsi que de ses partenaires et modifications post-traductionnelles⁶⁰⁻⁶⁴. De ce fait, SETD8 intervient dans différentes voies de signalisation, notamment dans la régulation de la fonction de p53. SETD8 est en effet capable de mono-métyler la lysine 382 de p53 (p53K382me1), réprimant ainsi son rôle de suppresseur de tumeur (arrêt du cycle cellulaire + apoptose)⁶⁵. Les gènes cibles de p53 sont notamment réprimés par p53K382me1, en complexe avec le facteur de transcription L3MBTL1 et en synergie avec H4K20me1⁶⁶. SETD8 et H4K20me1 semblent également aider au recrutement de L3MBTL1 au niveau de ses gènes cibles tels que c-MYC ou la cycline E, permettant ainsi leur répression⁶⁷. L'expression de SETD8, et donc la méthylation de p53K382, sont inhibées en réponse aux dommages à l'ADN, permettant ainsi à p53 d'assurer sa fonction de suppresseur de tumeur via l'activation de ses gènes cibles⁶⁶.

La méthylation de la protéine Numb par SETD8 inhibe son interaction avec p53, et donc son effet protecteur vis-à-vis de l'ubiquitylation et la dégradation du suppresseur de tumeur⁶⁸. Cette piste est cependant sujette à débat et nécessite plus ample investigation⁶⁹. En accord avec ces résultats, la délétion de SETD8 durant la différenciation épidermale, provoque une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose dépendante de p53⁷⁰. Une étude plus récente présente l'importance du rôle de SETD8 dans la régulation de la voie p53 dans le neuroblastome, proposant son inhibition comme stratégie thérapeutique dans cette

pathologie. Veschi et al. montrent en effet que l'inhibition de SETD8 active la voie p53 en diminuant le niveau de p53K382me1, induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses⁷¹. L'effet pro-apoptotique de l'inhibition de SETD8 est dépendante de p53 dans le neuroblastome : les cellules dans lesquelles TP53 est délétée ou mutée résistent à la mort cellulaire induite par la perte de SETD8. Ce résultat est pour le moins surprenant du fait des autres rôles indépendant de p53 décrits pour SETD8, notamment dans la régulation de la compaction de la chromatine ou la réplication. Plusieurs études ont également montré l'implication de SETD8 dans la régulation de gènes impliqués dans des processus dérégulés dans les cellules cancéreuses tels que la senescence⁷²⁻⁷⁴, le métabolisme cellulaire⁷⁵, ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse^{76,77}, et ce, de manière indépendante à l'activité de p53. Ainsi, l'inhibition de SETD8 représente-t-elle un intérêt thérapeutique dans d'autres cancers ? Dans ce contexte, son effet est-il toujours dépendant du statut mutationnel de TP53 ?

(c) Rôle de SETD8 dans le cancer

La surexpression de SETD8 dans différents cancers ainsi que ses rôles multiples décrits ultérieurement font de cette protéine un acteur important dans la tumorigénèse et la survie des cellules tumorales⁵⁴. Le rôle des interactions de SETD8 avec de nombreuses autres protéines⁷⁴ reste à être étudié afin de mieux comprendre l'étendue de l'effet de la surexpression de SETD8 dans un contexte tumoral. Néanmoins, l'inhibition de SETD8 induit, de manière dépendante et/ou indépendante, des dommages à l'ADN, un retard de la réplication, un arrêt du cycle, l'apoptose, la senescence et/ou une dérégulation du métabolisme cellulaire. SETD8 représente donc une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de cancers. Le développement d'inhibiteurs de SETD8 ayant une activité cellulaire est une étape clé qui nous permettra d'élucider les divers rôles de SETD8 et de cibler la méthyltransférase de manière spécifique dans le cadre de traitements anti-cancéreux.

Malgré ce besoin, peu d'inhibiteurs de SETD8 efficaces et spécifiques ont été synthétisés⁷⁸. En 2013, Andersen et al. ont isolé le premier inhibiteur spécifique de SETD8, l'acide nahuic A, un composé naturel produit par une bactérie marine. La molécule agit de manière compétitive avec le cofacteur de l'enzyme (SAM) et non-compétitive avec son substrat. Ce composé ne présente aucune activité sur 10 autres méthyltransférases, et semble inhiber SETD8 *in vitro* et *in vivo*, en affectant la prolifération de plusieurs lignées cellulaires issues de différents cancers⁷⁸. Toutefois, ce composé est difficilement purifiable et son IC50 élevée ne permet pas une utilisation comme agent thérapeutique.

En 2014, Jin et al. ont identifié un composé chimique UNC-0379 (dérivé de la quinazoline), agissant comme inhibiteur compétitif avec le substrat de SETD8, et non-compétitif avec son cofacteur. L'UNC-0379 agit de manière sélective envers SETD8, ne présentant aucune activité envers 15 autres méthyltransférases⁷⁸⁻⁸⁰. A ce jour, une seule étude montre l'efficacité de cet inhibiteur sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses de neuroblastome⁷¹. La même année, Luo et al. ont identifié trois inhibiteurs de SETD8 : NCD663284, BVT948 et ryuidine (SPS8I1-3). Ces inhibiteurs ont montré une activité cellulaire en inhibant H4K20me1 et en imitant les effets sur le cycle cellulaire induit par l'inhibition de SETD8 via un ARN interférent. Cependant, de par leur capacité à affecter l'activité d'autres méthyltransférases, la spécificité de ces inhibiteurs envers SETD8 reste limitée^{78,81}.

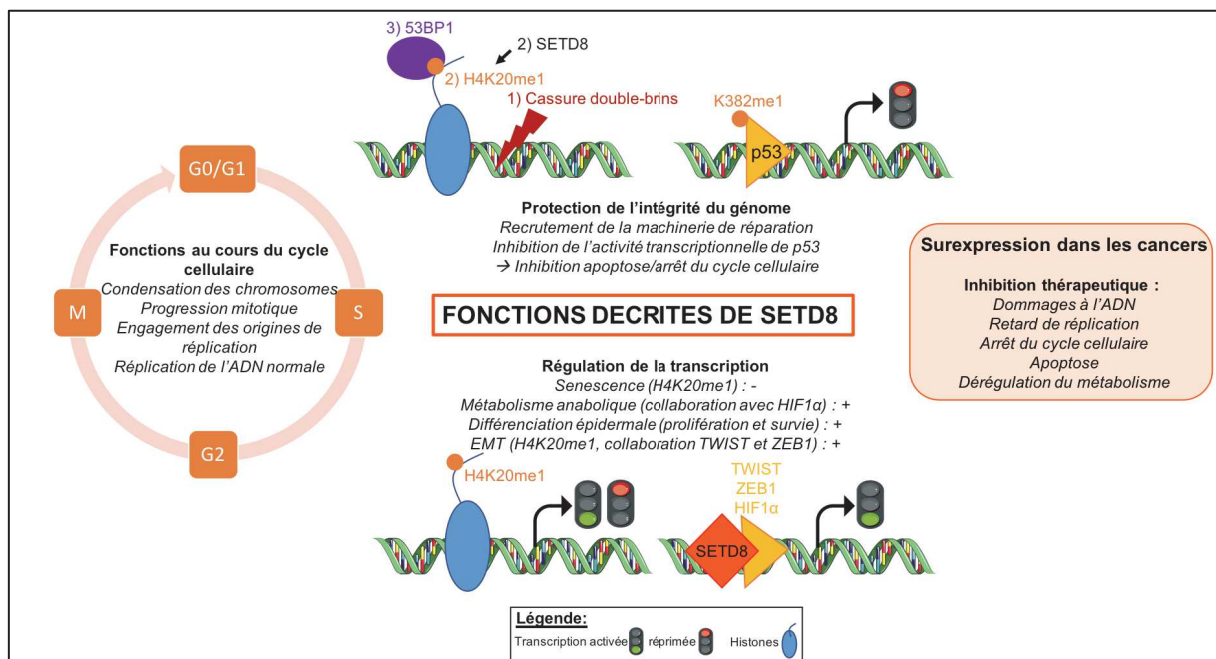


Figure 4 : Schéma résumé des rôles de SETD8 dans les cellules normales et son implication dans les cancers – La lysine méthyltransférase SETD8 est impliquée dans la régulation de différents mécanismes et processus physiologiques : le cycle cellulaire, la protection de l'intégrité du génome et la régulation de la transcription. SETD8 étant surexprimée dans certains cancers, son inhibition entraîne un arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort par apoptose, et ainsi constitue une stratégie thérapeutique intéressante.

3) [La lysine méthyltransférase EZH2](#)

(a) *EZH2 d'un point de vue mécanistique*

Les protéines du groupe Polycomb forment deux complexes multi-protéiques principaux, le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), présent sous forme canonique et non-canonique, et le complexe PRC2. Les complexes PRC1 partagent des protéines centrales : les protéines RING1 (RING1A et RING1B), capables d'ubiquitinyler H2AK119, et une des six protéines PCGF. Le complexe PRC2 est composé de 3 protéines centrales : EED, SUZ12 ainsi que l'une des deux histones méthyltransférases, EZH2 ou EZH1. Ces trois composés sont indispensables pour l'activité méthyltransférase de PRC2. L'association de différentes protéines, dites accessoires, avec ces protéines centrales module l'activité enzymatique et le ciblage du complexe (Figure 5)⁸²⁻⁸⁵.

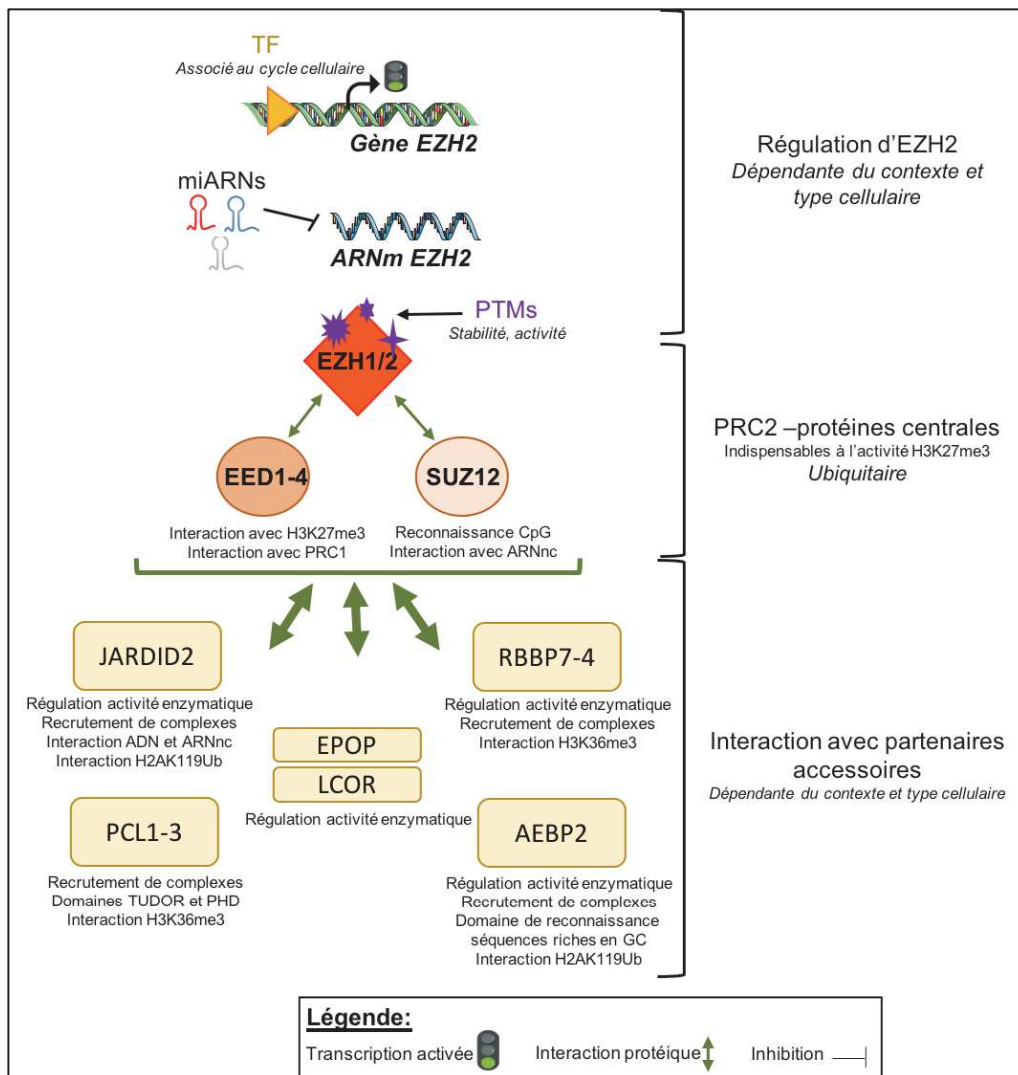


Figure 5 : Régulation et partenaires d'EZH2 - Alors que l'expression d'EZH2 peut être régulée de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, la stabilité et l'activité de l'enzyme peuvent être modulées via diverses modifications post-traductionnelles. EZH2, EED et SUZ12 sont les protéines centrales du complexe PRC2, et interagissent avec des protéines « accessoires » conférant au complexe des propriétés complémentaires.

L'enzyme EZH2 est capable de mono, di et trimétyler la lysine 27 de l'histone H3 ainsi que des protéines non histones afin d'en moduler leur activité (Figure 7).

Chez les mammifères, PRC2 et H3K27me3 sont recrutés au niveau de domaines étendus de plus de 100kb, tel que les loci *Hox*, et au niveau de domaines plus restreints de quelques kilobases. H3K27me3 est enrichi autour du TSS (transcription start site) des promoteurs, bien qu'avec une plus faible intensité au niveau du TSS lui-même. La marque histone H3K27me3 est également retrouvée sur des régions intergéniques, et est enrichie au niveau des régions sub-téломériques et des séquences répétées⁸²⁻⁸⁶. La trimétylation de H3K27 permet la répression des régions enrichies. H3K27me2 est présent sur environ 70% des histones H3 totaux, et est localisé sur toutes les régions d'euchromatine, excepté les corps de gènes activement transcrits (marqués par H3K36me3), les enhancers actifs (H3K27ac) et les gènes réprimés par H3K27me3. Il a été suggéré que H3K27me2 constituerait une couverture répressive ou configuration par défaut de H3K27, ayant un rôle protecteur contre l'acétylation aspécifique de H3K27 et ainsi contre l'activation déféctueuse d'enhancers et de promoteurs aspécifique du type cellulaire concerné^{82,83,87,88}. H3K27me, tout comme H3K36me3, est présent au niveau des régions intragéniques des gènes activement transcrits et est associé à une transcription active⁸⁹.

Le complexe PRC2 est capable de réguler la structure de la chromatine sur plusieurs niveaux : le génome linéaire en modifiant les histones, la compaction locale de la chromatine, la formation de boucles d'interaction entre régions régulatrices et d'interactions longues distances, et de l'organisation des TADs dans le noyau. Par ailleurs, les contacts 3D entre les domaines enrichis en H3K27me3 permettent eux eux-mêmes une stabilisation de l'état répressif des régions concernées^{90,91}.

Le processus de maintien de l'état chromatinien à travers les cycles cellulaires est couplé à la réplication de l'ADN. En effet, au cours de la phase S, H3K27 reste méthylé sur le nucléosome parental et permet le recrutement de PRC2, qui méthylera à son tour le nucléosome recruté sur la nouvelle hélice d'ADN synthétisé^{82-85,92,93}.

Aucune séquence-motif, reconnue par les complexes Polycomb, n'a été décrite à ce jour chez les mammifères. De nombreuses études ont montrées que PRC2 et H3K27me3 sont particulièrement présents au niveau d'îlots CpG non méthylés^{94,95} et de régions riches en GC. En revanche, le mécanisme de recrutement de PRC2 au niveau de ses cibles est sujet à débat, et plusieurs études suggèrent que ce complexe pourrait être recruté via différents processus. Le premier modèle décrit, dit hiérarchique, propose l'enchaînement successif des évènements

suivants : 1) recrutement de PRC2 au niveau d'une séquence cible, 2) triméthylation de H3K27 par EZH2 plaçant la chromatine dans un état répressif, 3) reconnaissance de H3K27me3 par les protéines CBX du complexe PRC1, et 4) ubiquitylation de H2AK119 par les protéines RING entraînant ainsi une plus ample compaction de la région ciblée. Une étude récente a montré que le recrutement direct de SUZ12 sur des îlots CpG permettrait une triméthylation *de novo* de H3K27 par EZH2⁹⁶. La protéine EED permet également le recrutement de PRC2 au niveau de H3K27me3 permettant ainsi l'auto-propagation de la marque répressive sur de longues régions chromatiniennes (Figure 6)^{82,83,87,88}.

Un autre modèle mettant en jeu le complexe PRC1 non-canonique a été plus récemment décrit. L'ubiquitylation de H2AK119, induite par le complexe ncPRC1, est reconnue par les protéines accessoires de PRC2, AEBP2 et JARID2. Cette interaction permet ainsi le recrutement de PRC2 et la triméthylation de H3K27^{97,98}. Les deux complexes sont également capables d'interagir ensemble, permettant leur fixation sur des gènes cibles communs. Le recrutement de PRC2 au niveau de locus spécifiques peut également être régulé par la présence d'autres PTMs d'histones (H3K36me3 ou H3K9me3), de facteurs de transcription ou encore de long ARN non-codants (ARNlnc) tels que Xist ou HOTAIR⁸²⁻⁸⁶. PRC2 est également capable d'interagir avec l'ARN de manière aspécifique, c'est-à-dire indépendamment de leur séquence. Au niveau des gènes réprimés, la fixation de PRC2 sur des transcrits d'ARN abortifs pourrait permettre le maintien des complexes Polycomb et stabiliser la répression transcriptionnelle en cas d'initiation aberrante de la transcription⁹⁹. Par ailleurs, les transcrits naissant, produits à partir de gènes actifs, pourraient interagir avec PRC2 et constituer un leurre bloquant les interactions entre PRC2 et la chromatine. Ce mécanisme pourrait ainsi protéger les gènes transcrits de l'activité répressive des complexes Polycomb. Lorsqu'un signal déclenche le recrutement de facteurs répresseurs, la transcription serait alors inhibée et PRC2 pourrait ainsi intervenir et réprimer de manière plus stable l'expression du gène en question. Ce modèle suggère que la fonction principale de PRC2 serait de maintenir, et non d'initier, la répression de la transcription (Figure 6)^{85,100}.

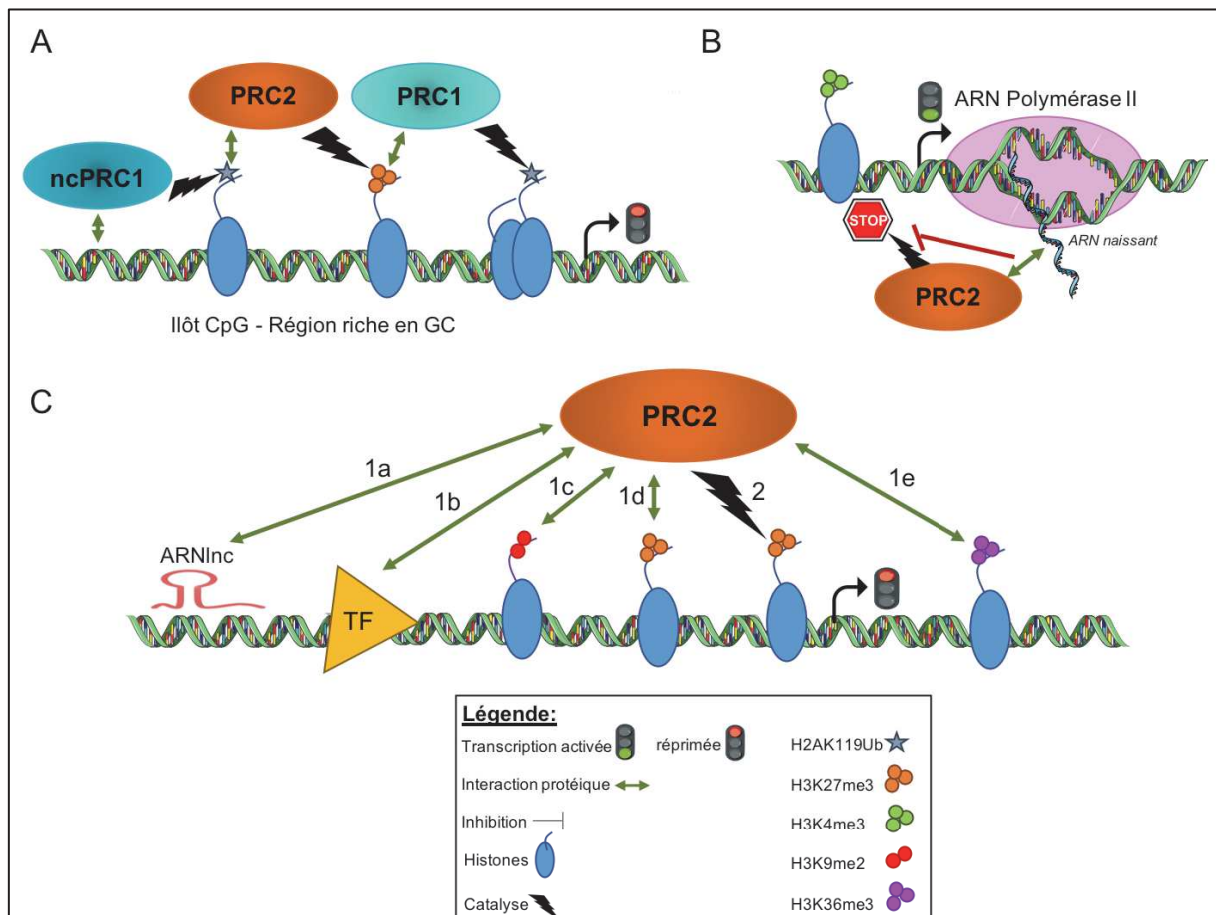


Figure 6 : Mécanismes de recrutements de PRC2 au niveau de la chromatine – A- Collaboration entre PRC1 et PRC2 pour la répression de l'expression génique. B- Interaction de PRC2 avec les ARNs naissants pour une inhibition d'une répression génique aberrante. C- Recrutement de PRC2 au niveau de la chromatine via des ARNInc (1a), des facteurs de transcriptions (TF, 1b) ou des modifications d'histones (H3K9me2 = 1c, H3K27me3 = 1d, H3K36me3 = 1e) pour permettre la répression génique via H3K27me3 (2).

EZH2 est également capable de méthylater des protéines non-histones dans le cytosol, tels que les facteurs de transcription GATA4 ou ROR α , et promeut ainsi la répression de leurs gènes cibles¹⁰¹⁻¹⁰³. Des études récentes ont mis en évidence un rôle transactivateur de EZH2 sur la transcription de certains gènes, indépendamment de PRC2. Via son activité méthyltransférase, EZH2 est en effet capable d'activer des cibles non-histones (telles que le récepteur aux androgènes AR ou STAT3) ou d'interagir directement avec d'autres facteurs de transcription (tels que NF- κ B ou E2F1) permettant ainsi l'activation de leur gènes cibles¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ (Figure 7).

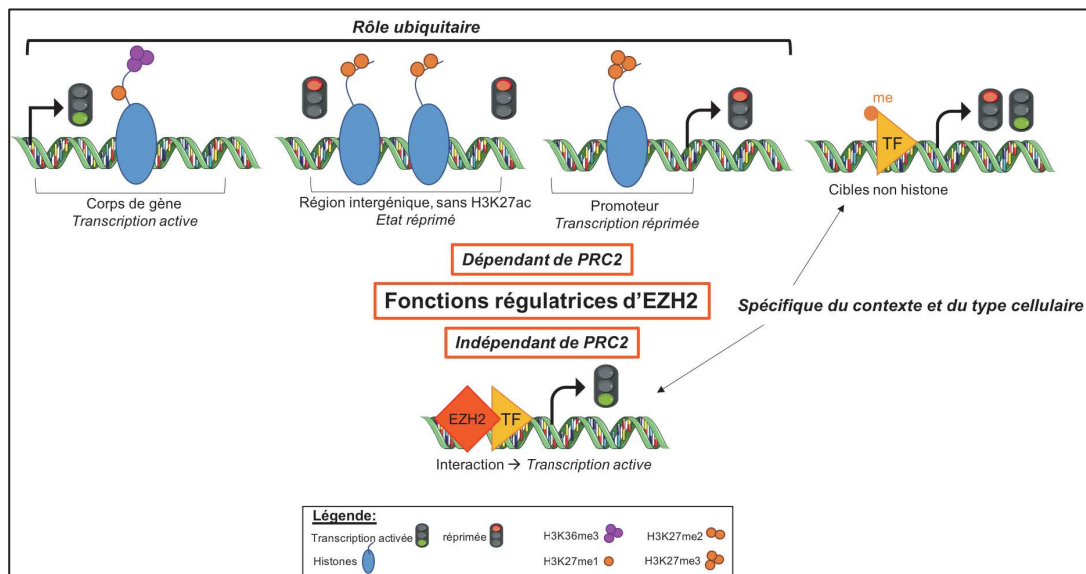


Figure 7 : Différentes fonction régulatrice d'EZH2 – EZH2 mono, di et tri méthyle la lysine 27 de l'histone H3. H3K27me est retrouvé dans les corps de gènes transcriptionnellement actifs, H3K27me2 est retrouvé au niveau de régions intergéniques et induit un état réprimé de la chromatine, et H3K27me3 est principalement retrouvé au niveau des promoteurs de gènes dont la marque réprime l'expression. Ces différents rôles sont présents dans toutes les cellules. En fonction du contexte cellulaire, EZH2 est également capable de méthyle des cibles non-histones, notamment des facteurs de transcription, afin d'en modifier leur activité transcriptionnelle. EZH2, en association avec divers facteurs de transcription peut participer à l'activation de la transcription de certains gènes cibles.

L'expression d'EZH2 est régulée par différents mécanismes, variables en fonction du type et du contexte cellulaire. De nombreux facteurs de transcriptions (tels que c-Myc, E2F, HIF-1 α ou encore NF- κ B) ont été mis en évidence comme étant capables de se fixer sur le promoteur d'EZH2 afin de réguler son expression. L'expression d'EZH2 peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel par des miARNs, tels que miR-26a, miR-101 ou encore miR-32^{82,108,109}. Pour finir, la stabilité et l'activité d'EZH2 peuvent être modulées au niveau post-traductionnel, grâce à différentes modifications, comme la phosphorylation, l'ubiquitylation ou encore la palmitoylation¹¹⁰ (Figure 5).

(b) EZH2, développement et différenciation

EZH2 joue un rôle primordial dans le développement. En effet, la délétion d'EZH2 chez la souris est létale au stade de gastrulation de l'embryon¹¹¹. Dans les cellules souches embryonnaires et adultes, de nombreuses régions sont enrichies en marques histones H3K27me3 (répressive) et H3K4me3 (activatrice). Cette bivalence indique un état de « pause », et confère un statut actif ou réprimé aux promoteurs de gènes impliqués dans le déterminisme cellulaire et le développement, en fonction des stimuli développementaux. Les

régions bivalentes diffèrent en fonction du statut de la cellule. Par exemple, dans les cellules souches pluripotentes, les complexes Polycomb répriment les gènes spécifiques de types cellulaires matures A et B, alors que les gènes nécessaires au maintien de la prolifération et de l'état indifférencié des cellules souches sont continuellement transcrits. Lorsque les cellules souches se différencient, les gènes de pluripotence sont réprimés et les gènes spécifiques de la nouvelle identité cellulaire A sont activés. Les gènes impliqués dans la différenciation en un type cellulaire B alternatif restent réprimés, permettant aux cellules d'acquérir une seule identité cellulaire et de les protéger de la dédifférenciation ou de la transdifférenciation^{82,83,87,88} (Figure 8).

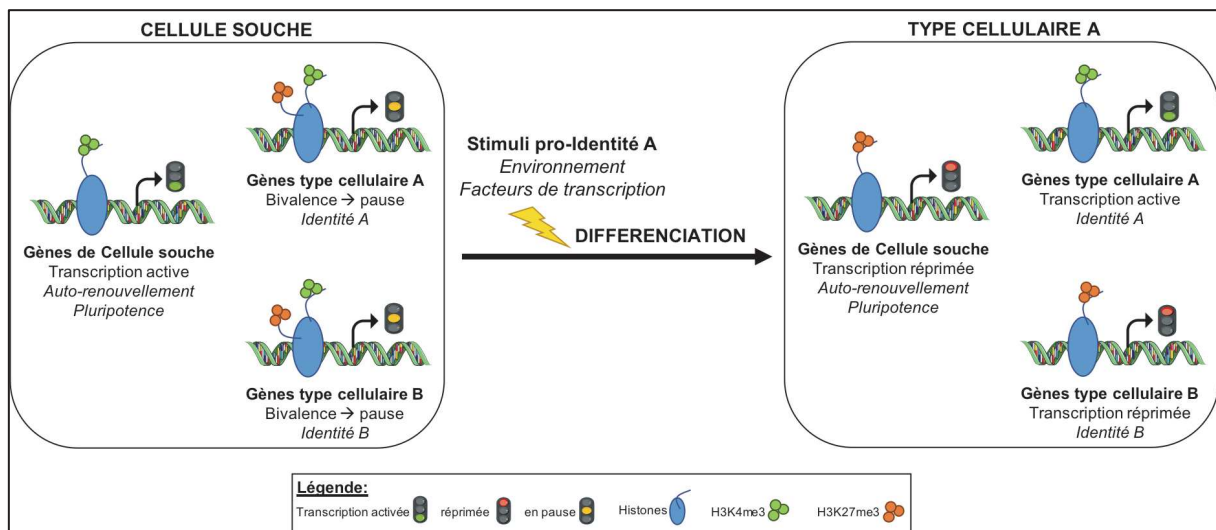


Figure 8 : Rôle de EZH2 dans la régulation des gènes pendant la différenciation des cellules souches – Les gènes spécifiques des types cellulaires A et B sont en état de pause dans les cellules souches (H3K4me3 et H3K27me3). Un stimuli environnemental ou transcriptionnel induit la différenciation en type cellulaire A. Les gènes spécifiques des cellules souches ainsi que les gènes spécifiques du type cellulaire B sont réprimés (H3K27me3) dans les cellules de type A, alors que les gènes spécifiques de type cellulaire A sont exprimés (H3K4me3).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des protéines Polycomb dans l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches plutôt que leur survie, et dans la spécialisation et le maintien du déterminisme cellulaire^{112,113}. EZH2 est ainsi impliqué dans la myogenèse, l'adipogenèse, l'ostéogenèse, la neurogenèse, l'hématopoïèse, la lymphopoïèse, la différenciation épidermale ou encore l'hépatogenèse.

De façon intéressante, seul un sous-ensemble de gènes régulés par EZH2 devient actif dès la perte de fonction de l'enzyme. La régulation de la transcription par les complexes Polycomb est spécifique à chaque type cellulaire et reflète 1) l'expression de régulateurs et

d'effecteurs développementaux, 2) l'expression et le recrutement de partenaires « accessoires »⁸⁷.

La présence d'EZH2 au sein du complexe PRC2 est principalement dépendante de l'état prolifératif des cellules. En effet, plusieurs études ont montré une corrélation entre l'expression d'EZH2 et des marqueurs de prolifération, dans les tissus normaux comme dans les cancers⁸⁷. Les fonctions de cette association sont entre autres 1) le maintien la marque H3K27me3 au cours de la division cellulaire, 2) la modulation de l'état transcriptionnel des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire¹¹⁴, et 3) la régulation directe de la réplication de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire^{115,116}. A l'inverse, l'expression d'EZH1 est anti-corrélée à la prolifération, et est plus élevée dans les cellules différenciées. L'échange entre EZH2 et EZH1 au sein de complexe PRC2 joue un rôle important lors de la transition de cellules proliférantes vers des cellules différenciées. Une étude récente a montré que la perturbation de ce processus pourrait être impliqué dans le développement de lymphomes. Certaines études mettent également en évidence l'effet compensatoire, bien que partiel, de EZH1 dans le cadre de la perte d'expression d'EZH2¹¹⁷⁻¹²⁰.

EZH2 et EZH1 jouent aussi un rôle important dans le processus de senescence cellulaire. Ainsi, en réprimant l'expression de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire (*INK4A/ARF*, *CDKN2A*), EZH2 et EZH1 protègent les cellules souches somatiques et les cellules différenciées de l'entrée en senescence¹²¹⁻¹³⁰. La perte de ces méthyltransférases dans ces types cellulaires entraîne une diminution globale de H3K27me3 associée à un arrêt du cycle cellulaire, puis la sécrétion de facteurs solubles associés à la senescence.

(c) EZH2 dans les cancers

Une surexpression d'EZH2 a été mise en évidence dans de nombreux cancers. Dans les tumeurs solides, la forte expression d'EZH2 est associée à l'agressivité tumorale, le développement métastatique, un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements. Le caractère oncogénique d'EZH2 dépend de son activité méthyltransférase et de sa capacité à réprimer l'expression des gènes. La surexpression d'EZH2 entraîne, en effet, une augmentation du niveau global de H3K27me3 et une répression des gènes impliqués dans la différenciation des cellules souches cancéreuses, tels que p16 et p19, et de gènes suppresseurs de tumeurs. EZH2 est plus fortement exprimé dans les cellules souches cancéreuses et semble également participer au maintien de leur capacité d'auto-renouvellement et de leur caractère tumorigène¹³¹.

Des mutations activatrices d'EZH2 ont été mises en évidence dans différents types de lymphomes. Ces mutations se trouvent sur le domaine catalytique d'EZH2 au niveau de la tyrosine 641 (Y641N, F, S, ou H), l'alanine 677 (A677G) et l'alanine 687 (A687V). D'un point de vue mécanistique, l'enzyme non mutée permet la conversion initiale de H3K27 non-méthylé en H3K27me1/2, alors que le mutant d'EZH2 catalyse de manière aberrante la triméthylation¹³²⁻¹³⁷. Tout comme la surexpression, ce gain de fonction confère aux cellules tumorales un avantage prolifératif et une capacité accrue à former des métastases¹³²⁻¹³⁷.

Par ailleurs, des délétions, des mutations indel, non-sens et faux-sens ou des modifications post-traductionnelles inactivant EZH2 ont été identifiées dans les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, les leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T et les leucémies aiguës myéloïdes. La perte de fonction d'EZH2 dans ces cancers est associée au développement tumoral, et révèle la fonction de suppresseur de tumeur d'EZH2^{132,133,138,139}.

Plusieurs autres mutations d'EZH2 ont été décrites dans des tumeurs solides, mais les conséquences sur la fonction de l'enzyme restent à être décrites¹⁴⁰.

D'autres mutations affectant l'histone H3, d'autres membres des complexes Polycomb, d'autres facteurs reconnaissant ou régulant H3K27me3 ont été mise en évidence dans d'autres cancers, et pourraient altérer l'activité d'EZH2 et la répartition génomique globale de H3K27me3^{82,83,87,88} (Figure 9).

(d) EZH2 comme cible thérapeutique dans différents types de cancers

Du fait de son caractère oncogénique décrit dans plusieurs types de tumeurs, EZH2 représente une cible thérapeutique potentielle. De nombreux inhibiteurs spécifiques d'EZH2 (notamment GSK-926, GSK-343, EPZ-005687, EPZ-6438, EI1, CPI-169, ZLD10A...) ont ainsi été développés et présentent un effet significatif sur la prolifération et la survie des cellules tumorales in vitro¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Des études précliniques sur le modèle murin montrent que ces inhibiteurs améliorent de manière significative le pronostic des souris en induisant une réduction nette de la masse tumorale, sans effets secondaires majeurs^{88,143,145-147}. Plusieurs inhibiteurs d'EZH2 sont actuellement testés dans différents essais cliniques, notamment sur des tumeurs solides et des lymphomes, seuls ou en combinaison avec les traitements conventionnels (Table 1)^{88,143}. Les molécules GSK2816126 et Tazemetostat sont des inhibiteurs compétitifs de EZH2 altérant son interaction avec le cofacteur donneur de groupement méthyl SAM¹⁴⁴, alors que la molécule MAK683 cible l'interaction de l'enzyme avec son partenaire EED¹⁴⁸. Bien qu'ayant obtenu des résultats précliniques prometteurs, le

composé GSK2816126, seul ou en combinaison, présente une faible efficacité chez les patients atteints de lymphomes, de tumeurs solides et de myélome multiple. Face à cet échec, les essais cliniques utilisant cette molécule n'ont pas été poursuivis. Les essais cliniques utilisant les molécules MK683 et CPI-1205 sont actuellement en cours, et aucun résultat n'a été publié à ce jour.

Le Tazemetostat (ou EPZ-6438) est l'inhibiteur d'EZH2 le plus prometteur à l'heure actuelle, étant testé dans de nombreux cancers adultes et pédiatriques dans le cadre d'essais cliniques (>16 essais cliniques).

Les essais cliniques utilisant cette molécule présentent des résultats encourageants dans les lymphomes et les tumeurs rhabdoïdes pédiatriques¹⁴⁹, alors que les effets du Tazemetostat sur les gliomes pédiatriques sont moins convaincants¹⁵⁰. Au cours de la phase 1 de l'essai clinique, 38% des patients présentant un lymphome non-Hodgkinien ont présenté des réponses complètes ou partielles¹⁵¹. Aussi, les tumeurs présentant des mutations activatrices d'EZH2 semblent être plus efficacement affectées que les tumeurs exprimant la protéine sauvage. 58% des patients traités avec la dose de Tazemetostat recommandée pour la phase 2 ont obtenus des réponses significatives. Les effets secondaires les plus communs après traitement avec Tazemetostat sont de faible grade et comprennent des nausées, une thrombocytopénie, une anémie et une neutropénie. L'innocuité de l'utilisation du tazemetostat a donc pu être validée chez les patients atteints de lymphomes ou de tumeurs solides¹⁵¹.

D'après ces résultats, l'inhibition d'EZH2 semblent être une stratégie thérapeutique plus qu'encourageante pour le traitement de nombreux types de cancers caractérisés par une surexpression ou une mutation activatrice d'EZH2. En revanche, l'efficacité de l'inhibiteur reste très hétérogène en fonction des modèles *in vitro* utilisés ou des patients traités, et n'est pas associée au niveau d'expression d'EZH2, ni au type de tumeur. Le développement de biomarqueurs permettant de prédire la réponse au traitement des patients est donc nécessaire afin de proposer un traitement efficace et personnalisé pour chaque patient. Aussi, le Tazemetostat, n'étant pas une molécule cytotoxique aux doses utilisées, permet la reprogrammation du paysage épigénétique aberrant des cellules tumorales, et pourrait sensibiliser les cellules malignes à d'autres types d'agents. L'association d'inhibiteurs d'EZH2 avec des agents de chimiothérapies conventionnels ou ciblés pourrait constituer une approche thérapeutique efficace. Cependant, des études sont nécessaires afin de déterminer quelle serait la meilleure combinaison ayant un rationnel biologique et afin de définir un protocole clinique optimal d'administration des drogues.

Des études récentes sur des cellules de lymphome ont mis en évidence l'apparition de mutations secondaires d'EZH2 (mutant et sauvage), conférant aux cellules tumorales un moyen de résister au traitement par le Tazemetostat, dépendant du domaine catalytique de l'enzyme et de son interaction avec SUZ12 et EED¹⁵². Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'EED pourrait permettre, entre autre, de déjouer ce mécanisme de résistance¹⁴⁸. De plus, EZH1 pourrait conférer aux cellules tumorales un moyen de compenser partiellement l'effet de l'inhibition d'EZH2¹¹⁷. Le traitement de cellules tumorales avec des inhibiteurs spécifiques des deux enzymes (UNC-1999, OR-S1 ou OR-S2) permet, en effet, une amélioration d'efficacité comparativement à l'inhibition d'EZH2 seul¹⁵³⁻¹⁵⁵. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si l'efficacité de cette double inhibition provient d'un effet synergique (les deux enzymes ont des fonctions différentes) ou additifs (les deux enzymes sont complémentaires) (Figure 9).

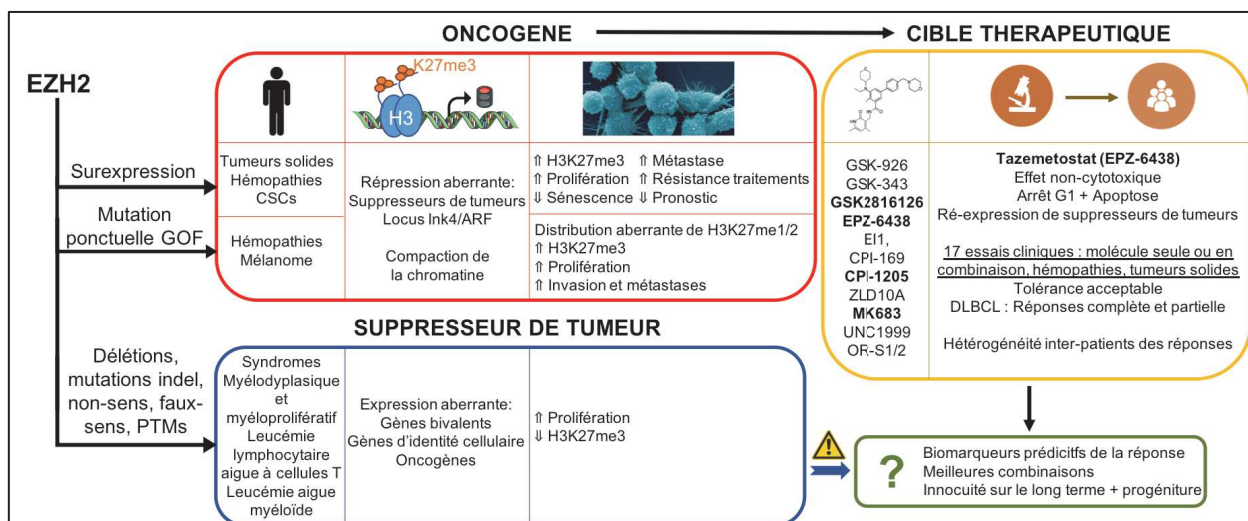


Figure 9 : EZH2 comme cible thérapeutique dans différents types de cancers – EZH2 peut être surexprimé ou muté dans plusieurs types de cancers, lui conférant un rôle d'oncogène ou de supresseur de tumeur en fonction du contexte cellulaire. Son caractère oncogénique a été ciblé de manière thérapeutique grâce à de nombreux inhibiteurs. Les essais cliniques utilisant de Tazemetostat présentent pour l'heure des résultats encourageant, mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser son utilisation chez les patients.

II. La différenciation plasmocytaire normale

A. Généralités

La génération d'anticorps (Ac) spécifiques et de lymphocytes B mémoires est l'une des protections les plus importantes de l'hôte contre des antigènes (Ag) et est la base des stratégies de vaccination. Les Ac, sécrétés par les plasmocytes (PCs) à longue durée de vie (LLPCs) constituent la défense immunitaire humorale principale. Distincte de la réponse primaire d'anticorps, la réponse humorale mémoire est générée de manière plus rapide et avec une plus grande amplitude, et permet la production d'Ac ayant une plus forte affinité pour l'Ag et d'isotypes variables.

Les lymphocytes B immatures sont produits dans la moelle osseuse (MO), puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels ils deviennent matures (cellules B naïves) et rencontrent l'Ag grâce à leur récepteur membranaire, le BCR. Les follicules des ganglions lymphatiques sont notamment un lieu de rencontre avec de nombreux Ag. Après avoir rencontré l'Ag (soluble ou présenté par des cellules présentatrices d'Ag), les lymphocytes B internalisent l'Ag et se déplacent vers la frontière T-B. Via les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de classe II présentant l'Ag, les cellules B interagissent alors avec le récepteur TCR, spécifique de l'Ag des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Ces derniers sécrètent alors des cytokines (IL-21, IL-4, IFN γ) permettant d'induire l'activation des lymphocytes B et ainsi que leur différenciation. Ils expriment également de nombreuses molécules effectrices, telles que CD40L, ICOS et la protéine adaptatrice cytoplasmique SAP, capables de promouvoir l'activation, la différenciation et la survie des cellules B. La molécule CD40L induit notamment la prolifération des lymphocytes B et les protègent de l'apoptose¹⁵⁶.

Une partie des lymphocytes B activés migrent alors vers les cordons médullaires des ganglions lymphatiques afin de se différencier en PCs à courte durée de vie sécrétant très rapidement, pendant l'infection, des Ac de faible affinité pour l'Ag. L'autre partie des lymphocytes B migrent au centre du follicule ganglionnaire et subissent une expansion clonale rapide et massive en tant que centroblastes, résultant en la formation d'un centre germinatif (GC). Dans la zone sombre du GC, ces centroblastes subissent le processus de mutations hypersomatiques (SHM) des régions variables d'Ig et la commutation isotypique par recombinaison homologue (CSR). Ces deux processus sont médiés par la protéine AID, capable de convertir les cytosines en uraciles. Le processus de SHM consiste en l'induction de mutations ponctuelles au niveau des loci des régions variables des immunoglobulines (Ig), altérant ainsi la reconnaissance de l'Ag par l'Ac. Les mutations favorisant l'affinité pour l'Ag seront ensuite sélectionnées, entraînant une augmentation progressive de l'affinité de la réponse humorale. AID est également capable d'initier des cassures double-brin d'ADN dans

les régions codant pour les domaines déterminant la classe d'anticorps des gènes de chaînes lourdes des Ig. Ces cassures entraînent le processus de CSR, une recombinaison permettant d'échanger l'isotype de l'anticorps et ainsi ses propriétés biologiques. Les processus de SHM et de CSR sont vitaux pour une réponse immunitaire humorale spécifique et de forte affinité, dirigée contre un pathogène particulier et capable d'éliminer l'infection¹⁵⁷.

Les centroblastes sont caractérisés par une forte expression de gènes pro-apoptotiques et impliqués dans le cycle cellulaire, et une faible expression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire et de gènes anti-apoptotiques¹⁵⁶. Les centroblastes migrent ensuite dans la zone claire du GC, où ils cessent de proliférer et deviennent des centrocytes. Les centrocytes subissent alors une maturation d'affinité, via la présentation de l'Ac au niveau membranaire, appelé BCR. Les cellules présentant des BCR aspécifiques ou peu spécifiques à l'Ag entrent en apoptose ou redeviennent des centroblastes afin d'affiner leur spécificité face à l'Ag. Les cellules présentant des BCR de haute affinité sont sélectionnées pour une différenciation en lymphocytes B mémoires ou en plasmablastes (PBs)¹⁵⁶. Les PBs, des cellules proliférantes capables de sécréter des Ac, quittent ensuite les organes lymphoïdes secondaires, circulent dans le sang et migrent dans la MO. Ils sont alors exposés à différents facteurs leur permettant de se différencier en PCs à courte durée de vie ou en LLPCs¹⁵⁶. Les LLPCs sont capables de survivre plusieurs années dans la MO (population CD19⁻ CD38^{high} CD138⁺), présentent un transcriptome différent de celui des PCs à courte durée de vie, et sont à l'origine de la présence dans le sérum d'Ac spécifiques d'un pathogène rencontré des années auparavant^{158,159}. Cette population de PCs est un élément nécessaire à la mémoire immunitaire, en assurant la défense de l'organisme sur le long terme face à de nouvelles infections.

Le passage des Ig d'une forme membranaire vers une forme sécrétée caractérise la différenciation terminale des lymphocytes B en PBs. Les PCs expriment des marqueurs de surface uniques, distincts de ceux des lymphocytes B. Plusieurs protéines de surfaces spécifiques des lymphocytes B, telles que des protéines du MHC de classe II, B220, CD19, CD20, CD21 et CD22, sont perdues chez les PCs. Syndecan-1 (CD138), est l'un des marqueurs principaux des PCs et participent notamment à leur survie dans la MO¹⁶⁰. Les PCs expriment également le récepteur à chimiokines CXCR4, capable d'interagir avec leur ligand CXCL2 présent sur les cellules stromales. Cette protéine est importante pour le « homing » des PCs dans la MO ainsi que leur survie¹⁶¹. CD28 est exprimé sur tous les PCs et assure la survie des LLPCs dans la MO en interagissant avec la protéine CD80 des réticulocytes. D'autres cellules (telles que les éosinophiles, les mégacaryocytes et les monocytes¹⁶²) et

chimiokines (telles que APRIL et son récepteur BCMA, IL-6 ou CD93¹⁵⁶) jouent un rôle important dans la survie des cellules sécrétrices d'Ac dans la MO^{156,163} (Figure 10).

Afin de pouvoir assurer leurs fonctions et leur intégrité, les PCs régulent de manière très fine leur métabolisme. Ainsi, pour parvenir à produire une quantité élevée d'Ac, le réticulum endoplasmique (RE) des PCs subit une expansion via un processus nécessitant un stress continu du RE et une activation de la réponse UPR (unfolded protein response). Cela résulte en un ajustement de la synthèse protéique, une augmentation de la capacité du RE à replier les protéines, une augmentation de la dégradation des protéines mal repliées et une augmentation de la biogénèse du RE¹⁶⁴. De façon intéressante, l'autophagie est un mécanisme important pour la fonction de plasmocytes du fait de son rôle dans l'expansion du RE¹⁶⁵. Plusieurs études ont mis en évidence que le RE jouait également un rôle essentiel dans la survie des PCs, et l'entrée en apoptose des PCs à courte durée de vie^{166,167}.

Le repliement des molécules d'Ig ainsi que leur assemblage en structures contenant plusieurs unités sont effectués grâce à la formation de liaisons bisulfide intra et intermoléculaires. Le produit final de cette cascade biochimique étant la génération de peroxyde d'hydrogène, les plasmocytes produisent alors des ROS (reactive oxygen species). Afin de neutraliser ce fort taux de ROS, la PCD est accompagnée par une réponse intracellulaire antioxydante, avec une augmentation de la synthèse de glutathion (GSH), de glutamate et de glycine, étant les antioxydants endogènes majeurs des cellules¹⁶⁵.

La voie de signalisation mTOR, impliquée dans le métabolisme cellulaire, joue également un rôle important dans la différenciation plasmocytaire (PCD). Le complexe mTORC1 est capable de promouvoir un programme anabolique favorisant la synthèse des protéines et des lipides. L'activation de mTORC1 dans les plasmocytes favorise la sécrétion des molécules d'Ig, probablement via la régulation du trafic vésiculaire^{165,168}.

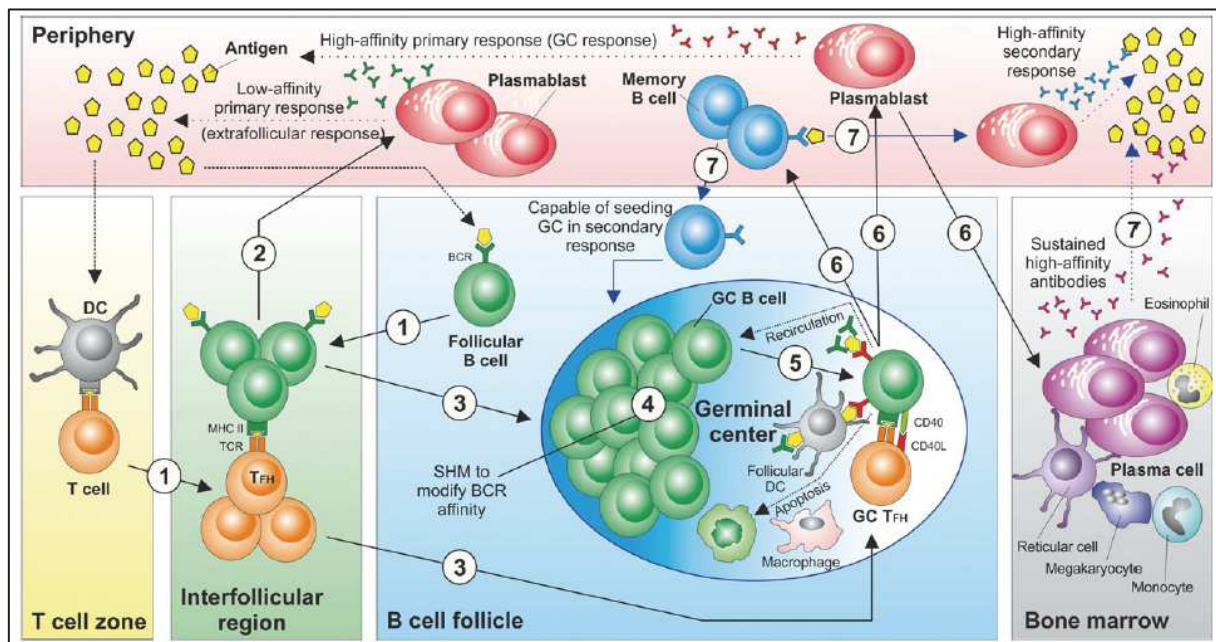


Figure 10 : Schéma représentant la réponse folliculaire des lymphocytes B, extrait de la revue de K.-P. Nera, M. K. Kyläniemi & O. Lassila de 2015¹⁶² - (1) Les lymphocytes B activés migrent vers les foyers interfolliculaires pour recevoir l'aide des lymphocytes T helper pour une plus ample activation, prolifération et différenciation. (2) Certains lymphocytes B activés entreprennent une première ligne de défense en se différenciant directement en plasmablastes sécrétant des Ac de faible affinité pour l'Ag. (3) La communication entre les lymphocytes B et T permet à une population de cellules activées de former des GC. (4) Dans la zone sombre du GC, les centroblastes prolifèrent rapidement et subissent le SHM, afin de modifier leur affinité avec l'Ag. (5) Dans la zone claire, les lymphocytes T_{fh} sélectionnent positivement les lymphocytes B dont le BCR a une forte affinité pour l'Ag. Les lymphocytes B dont le BCR a une faible affinité, meurent par apoptose ou retournent dans la zone sombre pour subir plus de SHM. (6) Différenciation en plasmablastes sécrétant des Ac de haute affinité ou en lymphocyte B mémoire. Une partie des plasmablastes migrent dans la MO pour se différencier en plasmocytes à longue durée de vie (LLPC), maintenu par des signaux de survie induits par des cellules réticulocytaires, éosinophiles, mégacaryocytes et monocytes. (7) Lors d'une infection secondaire, les LLPC assurent la première ligne de défense contre l'Ag en sécrétant des anticorps de forte affinité. Les lymphocytes B mémoires peuvent se différencier directement en plasmablastes ou reformer un GC afin d'augmenter l'affinité de l'Ac envers l'Ag.

La différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoires (MBCs) après passage dans le GC joue un rôle important dans la réponse humorale secondaire, et permet la mise en place des défenses immunitaires plus rapide. Les MBCs sont caractérisés par une longue durée de vie, une forte sensibilité à de faibles doses d'antigènes, une forte et rapide prolifération, et une différenciation rapide en PCs capables de produire des Ac de forte affinité dans la réponse humorale secondaire. Les MBCs expriment le marqueur de surface CD27. Il existe différents types de MBCs, répartis dans différentes localisations dans

l'organisme et jouant des rôles variés. Les MBCs dit « sentinelles » se situent dans divers tissus, positionnés de manière stratégique au niveau des points d'entrée des Ag. Les MBCs à IgA se situent sur les surfaces monocutanée, telles que les cryptes épithéliales des amygdales. Les MBCs à IgG se situent dans les ganglions lymphatiques, et ceux à IgM sont retrouvés dans la MO et dans zone marginale de la rate. En plus de ces cellules sentinelles, une autre classe de MBCs re-circulent dans le sang et la lymphe afin de surveiller la présence d'Ag dans les tissus lymphoïdes secondaires¹⁶⁹.

Après rencontre avec l'Ag, certains MBCs sont capables de reformer des GC pour assurer la SHM permettant l'augmentation de l'affinité de l'Ac, puis de se différencier en PCs¹⁷⁰. Lorsque les MBCs ne forment pas de GC, leur réactivation entraîne leur différenciation rapide en PCs, en passant par deux stades intermédiaires : les pré-plasmablastes (prePBs), cellules hautement proliférantes, puis en cellules immatures sécrétrices d'Ac, les PBs¹⁷¹. Il a été suggéré que les MBCs exprimant les molécules de surface CD80, CD73 et PD-L2 seraient plus à-même de se différencier en PBs sans repasser par l'étape GC¹⁷⁰.

D'un point de vue transcriptionnel, la différenciation des cellules B en PCs est associée à des changements coordonnés et conséquents de leur profil d'expression génique¹⁶⁴, classés en deux catégories principales : la perte de transcrits associés aux cellules B et l'acquisition d'un programme génique de PCs. Ces changements sont guidés par deux groupes de facteurs de transcription (TF) spécifiques de chaque stade et se réprimant entre eux : 1) les TFs de cellules B activées (PAX5, BCL6, BACH2) maintiennent l'identité des cellules B, et 2) les TFs de plasmocytes (IRF4, BLIMP-1, XBP-1) sont requis pour inhiber les gènes identitaires B et activer un programme de cellules sécrétrices d'anticorps^{164,172,173} (Figure 12). Le Tableau 1 ci-dessous présente les fonctions des principaux facteurs de transcription impliqués dans la formation de GC et la PCD.

| Facteur de transcription | Expression | Rôle | Références |
|---------------------------------|---------------------------------|--|---------------------|
| BCL6 | LB du GC | Est essentiel à la formation de GC Facilite le SHM en inhibant la réponse aux dommages à l'ADN et la différenciation Inhibe la PCD | 164,174 |
| c-MYC | LB du GC | Favorise la prolifération des centroblastes, le SHM et l'affinité des Ac | 156 |
| PAX5 | LB | Régule l'identité cellulaire B Inhibe la PCD | 156,164 |
| BACH2 | LB du GC | Régule le SHM et CSR Inhibe la PCD | 164,175 |
| MITF | LB du GC | Favorise le SHM et CSR Inhibe la PCD | |
| OCT2/OBF1 | LB du GC | Sont des freins à une PCD précoce | 164 |
| ID3 | LB | Régule l'activation des LB Régule le CSR | 176 |
| IRF8/PU.1/SpiB ETS1 | LB du GC | Régule la réponse des LBs aux signaux environnementaux Régule la formation du GC et CSR Inhibe la PCD | 156,164,177 |
| BLIMP1 | PC | Induit la PCD Régule la sécrétion des Ig Inhibe la prolifération Inhibe le programme transcriptionnel des LBs Favorise la survie des PCs | 156,172,178,178,179 |
| IRF4 | LB du GC (faible) PC (forte) | Régule la formation du GC et CSR Induit la PCD | 164 |
| XBP1 | PC | Régule les gènes impliqués dans le repliement et la maturation des protéines dans le ER Régule le programme transcriptionnel UPR, et donc la sécrétion d'Ig par les PCs | 156,179 |
| ZBTB20 | LB du GC PC (plus forte) | Favorise la survie des PCs | 156,180 |
| MCL-1 | | Favorise la survie des PCs | 156 |
| c-MYB | PC | Requis pour la migration des PBs dans la MO Contrôle la plasticité des LBs | 156,181 |

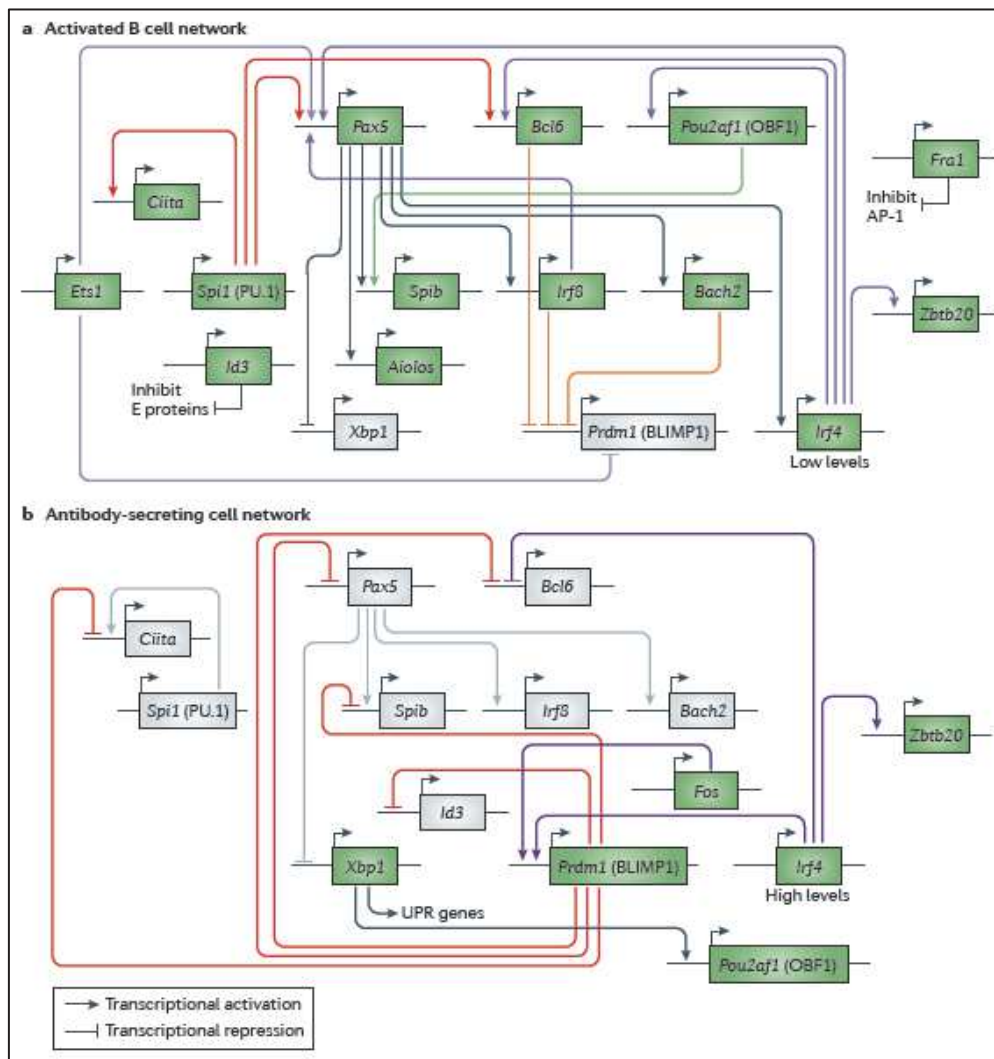


Figure 12 : Schéma représentant le réseau de régulation des facteurs de transcription (TF) impliqués dans la différenciation plasmocytaire, extrait de la revue de S.L. Nutt, P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton and L.M. Corcoran de 2015¹⁶⁴ - Les TF spécifiques des lymphocytes B répriment les TF des plasmocytes dans les lymphocytes B (a), et réciproquement dans les plasmocytes (b). Les gènes inscrits dans des cases grises sont sous exprimés et ceux dans des cases vertes surexprimés.

D'autres facteurs de transcription impliqués dans la formation de GC et la PCD ont été décrits dans la littérature. En effet, les PCs expriment des facteurs régulant leurs fonctions, tels que des TF de type AP-1, NF- κ B, NF-AT et la famille des TFs liant les octamères^{156,182}. La voie de signalisation NF- κ B est largement impliquée dans l'activation, la croissance, la survie et la différenciation des lymphocytes¹⁸³. Le membre de la famille NF- κ B, c-Rel, joue un rôle essentiel dans les centroblastes via la régulation de la croissance cellulaire, alors que RelA est essentiel à la différenciation en PCs^{156,184}. Le TF de la famille AP-1 Fra1 est capable de réprimer la PCD^{185,186}, en inhibant l'expression de *BLIMP1*. La voie de signalisation TGF β joue un rôle dans la régulation de la prolifération, l'apoptose et le CSR¹⁸⁷. La voie de

signalisation p38-MAPK, via le TF MEF2C, participe à la régulation de la prolifération des cellules B activées et ainsi la formation de GC¹⁸⁸. Le facteur de transcription IRF5 régule l'activation et la prolifération de lymphocytes B, la PCD et la sécrétion des IgG¹⁸⁹. Le TF DOCK2 favorise l'induction de la PCD et la production d'IgG¹⁹⁰. Le TF YY1, jouant un rôle dans la différenciation des cellules B, favorisent également la formation de GC¹⁹¹. Grâce à des études transcriptomiques sur les différentes populations de la PCD, notamment dans notre laboratoire (non publié), il est possible d'entrevoir le rôle potentiel de nouveaux TF et voies de signalisation essentiels et nécessaires à chaque étape de la différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps¹⁹². Aussi, bien que le rôle du réseau complexe des TF principaux dans la PCD ait été investigué, les mécanismes de régulation des TF, clés de la PCD, restent peu connus.

De nombreuses et importantes découvertes sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la PCD, en particulier la réponse primaire humorale, ont été faites grâce au modèle animal, notamment murin. Cependant, de plus en plus d'études ont montré que le système immunitaire de la souris pouvait présenter de grandes différences avec le système immunitaire humain. L'étude moléculaire de la PCD ainsi que la biologie des plasmocytes humains en laboratoire est compliquée du fait de la difficulté d'accès aux plasmocytes situés dans la MO. Afin de palier à ce problème, des laboratoires, dont le nôtre, ont mis en place des systèmes de PCD normale *in vitro*, en partant de lymphocytes B naïfs ou de MBCs^{163,171,193-198}. L'utilisation de MBCs permet la génération d'une plus grande quantité de PCs *in vitro* (Figure 13). Ainsi, notre équipe a montré que la génération de PCs peut être mimée en utilisant un système de culture multi-étapes, dans lequel différentes combinaisons de molécules et de cytokines sont séquentiellement ajoutées afin de reproduire la différenciation séquentielle des cellules en place dans les différents organes/tissus *in vivo*. Dans ce modèle de culture, les MBCs se différencient en prePBs (CD20^{low}/- CD38⁻), puis en PBs (CD20⁺ CD38⁺ CD138⁻), et enfin en PCs à courte durée de vie et en LLPCs (CD20⁺ CD38⁺ CD138⁺), capables de survivre et de produire continuellement une grande quantité d'Ig pendant plusieurs mois *in vitro*. Le phénotype des PBs et PCs générés *in vitro* est similaire au phénotype des quelques PBs détectés dans le sang périphérique (2 PBs/mm³)^{163,171,193}. De plus, les événements moléculaires caractérisant la différenciation de cellules B en PCs sont reproduits dans le modèle de différenciation *in vitro*. Dans les prePBs, qui sécrètent peu d'Ig, les TF de PCs (BLIMP1 et XBP1) commencent à être exprimés, alors que BCL6, PAX5 et d'autres TF de cellules B sont progressivement diminués. Ce changement est encore plus prononcé dans les PCs, dans lequel l'expression de PAX5 et BCL6 est inhibée et le ratio

d'ARNm de XBP1 épissé vs non-épissé est augmenté^{163,171,193}. Une analyse transcriptomique a permis de valider ces résultats et de mettre en évidence le programme transcriptionnel et les voies de signalisation spécifiques de chaque population cellulaire de la PCD (Figure 13)¹⁹⁹.

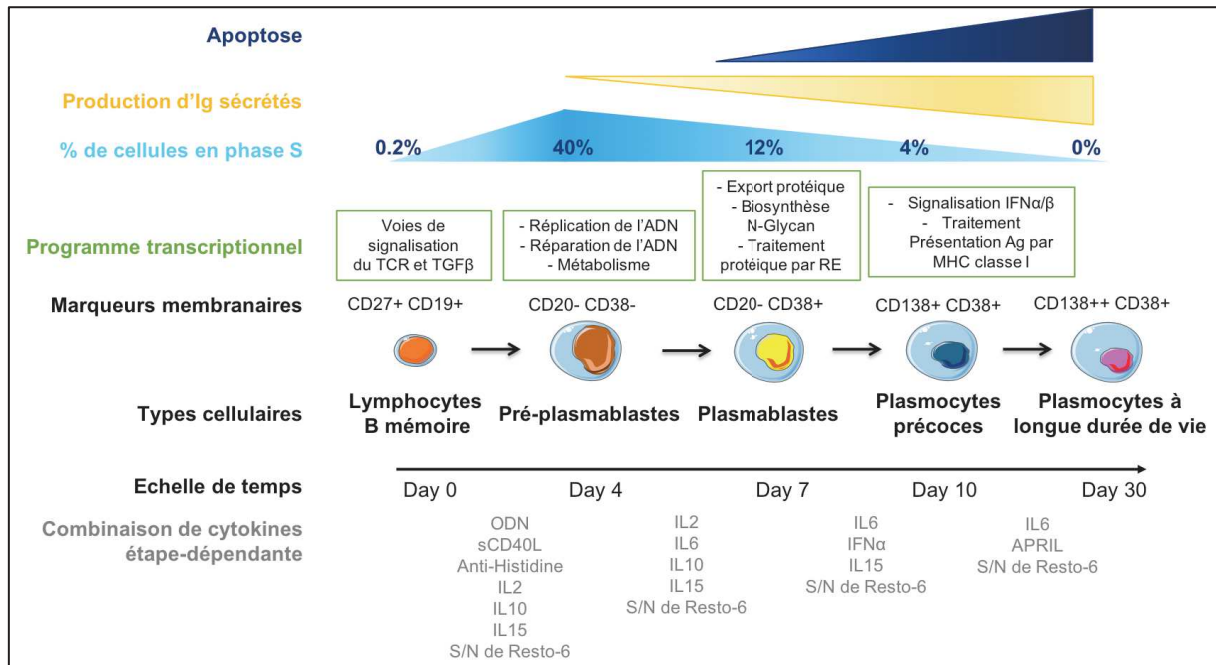


Figure 13 : Schéma du modèle de différenciation *in vitro* du laboratoire - Les lymphocytes B mémoires sont activés *in vitro* pour former des plasmocytes. Chaque type cellulaire du processus est caractérisé par différents marqueurs membranaires, programme transcriptionnel et phénotype. S/N = surnageant ; Resto-6 = cellules stromales de ganglions lymphatiques ; RE = réticulum endoplasmique.

B. Rôles des différents mécanismes épigénétiques dans la régulation de la PCD

La lymphopoïèse des cellules B ainsi que la PCD représentent un excellent modèle pour investiguer la modulation physiologique de l'épigénome pendant la différenciation cellulaire normale. D'une part, les différentes étapes de maturation des cellules B sont caractérisées par des phénotypes et des profils transcriptionnels distincts, et chacune de ces sous-populations peuvent être triées grâce à des marqueurs membranaires spécifiques. D'autre part, les différents stades de maturation présentent différentes caractéristiques cellulaires (proliférante vs quiescente), durée de vie (plasmocytes à courte vs longue durée de vie) et sont influencés par des signaux du microenvironnements distincts. En outre, les dérégulations épigénétiques dans les cellules du système immunitaire influencent, et pourraient être à

l'origine, de l'apparition de différentes pathologies (maladies auto-immunes, maladies impliquant une déficience du système immunitaires, hémopathies...).

Nous nous concentrerons dans cette partie sur l'activation et la différenciation des lymphocytes B en PCs. La nature et la fonction précises des modifications épigénétiques pendant la recombinaison V(D)J, la commutation isotypique et les mutations hyper-somatiques des immunoglobulines ne seront pas abordées dans ce manuscrit.

1) Rôle des miARN dans la PCD

De nombreux miARNs contrôlent et maintiennent le phénotype des lymphocytes B du GC. En effet, plusieurs études chez la souris ont démontré l'importance du rôle des miARNs pendant leur maturation et la PCD. La délétion de DGCR8 ou Dicer, facteurs indispensables pour la répression génique induite par les miARNs, induit une diminution significative du nombre de cellules B dans les GC, de MBCs et de PCs²⁰⁰. Les miARNs jouent un rôle à plusieurs niveaux dans la PCD, affectant de manière synergique l'expression des TFs clés ainsi que les processus biologiques caractérisant les sous-populations cellulaires des différentes étapes de la PCD.

Plusieurs miARNs sont surexprimés dans les cellules B activées du GC et participent au maintien du phénotype prolifératif et immature de ces cellules. Les miR-9, miR-30b, miR-30d, miR-30a, miR-23b, miR-125b²⁰¹ sont capables de cibler BLIMP1, et, de ce fait, d'inhiber la différenciation des cellules en PCs. Le miR-125b régule également l'expression d'IRF4²⁰¹⁻²⁰³. Les miR-30a et miR23b inhibent aussi des facteurs critiques de la différenciation et de la fonction plasmocytaire dans les cellules B du GC (Atg5, Atg12 et Beclin1)²⁰⁰. Le miR-217 régule l'expression de protéines impliquées dans la réparation de cassures double-brins de l'ADN, et favorise ainsi la réaction GC. Le miR-150, dont l'expression chute après stimulation des lymphocytes B, cible le facteur de transcription c-MYB requis pour la migration des PCs dans la MO. Le miR-28 est impliqué dans la régulation de la voie de signalisation du BCR, la prolifération, la survie et le CSR dans les lymphocytes B activés. La délétion du miR-28 dans les lymphocytes B induit une augmentation du nombre de PCs, suggérant un rôle dans la transition entre l'étape de prolifération et l'étape de maturation des cellules²⁰⁴.

Plusieurs miARNs, du fait de leur surexpression dans les stades différenciés, participent à l'inhibition du programme transcriptionnel des lymphocytes B et favorisent la PCD. Les miR-155, miR-361 et miR-181b, réprimés par BCL6 et/ou des HDAC, inhibent

l'expression d'AID, et jouent ainsi un rôle dans le CSR^{201,203,205}. Le miR-155 réprime également l'expression du TF PU.1, induisant ainsi la diminution de l'expression PAX5 et l'initiation d'un programme transcriptionnel plasmocytaire. Le miR-24-3p, régulé par les facteurs de survie de la niche médullaire SDF-1 α et IL-6, cible le facteur pro-apoptotique BIM et, de ce fait, favorise la survie des PCs. Le miR-148a, dont la surexpression accélère la PCD et augmente le nombre de PCs, pourrait mettre fin à la réaction GC en inhibant BACH2 et MITF, et améliorer la survie des PCs en ciblant BIM et PTEN²⁰⁶. Le cluster miR-17-92 contrôle le transfert des PBs et des PCs de l'organe lymphoïde secondaire vers la MO en ciblant le facteur de « homing » S1PR1 (Sphingosine-1-phosphate receptor 1). Ce cluster favorise également la production d'IgG2c par les PCs en ciblant le facteur de transcription IKAROS²⁰⁰.

L'analyse in-silico de l'expression de miARNs dans les différents stades cellulaires du modèle de PCD normale de notre laboratoire met en évidence la dérégulation temporelle de l'expression de 63 miARNs pendant ce processus. Ces miARNs ciblent des gènes principalement impliqués dans le cycle cellulaire, l'activation de la voie MYC, le trafic membranaire, la biogénèse et le bourgeonnement de vésicules de l'appareil de Golgi et la voie de signalisation TGF β . Les miR-148a et miR-34a, surexprimés dans les prePBs, ciblent les TFs BACH2 et FOXP1, jouant un rôle important dans la biologie des cellules B. Les miR-106b, miR-15b et miR-21, exprimés au stade prePB, inhibent des gènes de voies de signalisation TGF β (*TGFBR2*, *SMAD3*, *SMAD7*, *ITCH* and *BMPR2*), et de ce fait, favorise la prolifération, la différenciation et la survie des cellules après activation. Le miR-106b pourrait également réguler l'autophagie, mécanisme indispensable à la production efficace des Ig par les PC, via la régulation des gènes *ATG16L1*, *ULK1* et *ZBTB4*. Le miR-16 est sous-exprimé dans les prePBs par rapport aux MBCs. Il régule des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (*CCND2*, *CCNE1*, *CDK6* et *CDC25A*) et dans la régulation de l'UPR (*HSP90B1*), en accord avec la forte prolifération et la production d'Ig par les prePBs. Cette étude décrit de nombreux miARNs régulant potentiellement les facteurs clés de la PCD, nous permettant ainsi d'appréhender l'importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation fine de l'expression génique impliqués dans l'immunité humorale. En revanche, bien que certaines cibles de ces miARNs ait été validées dans d'autres modèles, il serait intéressant de valider et caractériser biologiquement leur rôle dans la PCD²⁰⁷.

2) Variation du profil de méthylation de l'ADN au cours de la PCD

Des études génomiques ont montré qu'environ 30% du méthylome est modifié au cours de la différenciation des lymphocytes B, affectant plusieurs millions de sites CpG²⁰⁸. Cette reconfiguration massive du méthylome affecte les domaines d'hétérochromatine associés à la matrice nucléaire, les régions réprimées par le complexe Polycomb, les régions de séquences répétées d'ADN ainsi que les enhancers et promoteurs de gènes impliqués dans les différents stades. Une hypométhylation globale ainsi qu'une hyperméthylation de certains sites ont été observées dans les lymphocytes B activés par rapport aux lymphocytes B naïfs. De manière surprenante, la relation directe entre l'expression des gènes et la méthylation de l'ADN a rarement été observée dans les différentes études sur ce sujet. Les sites hyperméthylés se trouvent au niveau d'îlots CpG riches en marque répressive H3K27me3²⁰⁹. La méthyltransférase DNMT1 est surexprimée dans les lymphocytes B du GC et est indispensable à leur développement. Dans ce contexte, une étude a montré que DNMT1 pourrait avoir un rôle dans la réplication de l'ADN, la condensation de la chromatine et la maintenance de la méthylation de l'ADN²¹⁰.

Après activation, les lymphocytes B subissent une expansion clonale et l'hypermutation somatique via AID. Ces deux processus physiologiques, associés à une perte d'expression de DNMT3a²¹¹, pourrait expliquer l'hypométhylation globale des lymphocytes B du GC. La prolifération des cellules pourrait être responsable d'une partie de la déméthylation ayant lieu au niveau des régions de réplication tardives pauvres en CpG comme l'hétérochromatine, des LADs et des domaines de séquences répétées^{209,211}. Les régions hypométhylées sont également enrichies en sites de fixation d'AID, suggérant le potentiel rôle de cette cytidine déaminase dans la déméthylation active de l'ADN^{12,210,212-214}. En effet, AID est capable de catalyser la déamination des 5-méthylcytosine, formant ainsi une thymine. La réparation du mésappariement T:G pourrait ainsi constituer un mécanisme de déméthylation active de l'ADN. Les gènes hypométhylés après déplétion d'AID et dont l'expression est modifiée sont impliqués dans des voies de signalisation importantes dans les lymphocytes B telles que la prolifération, l'engagement vers un phénotype B, l'arrêt de la différenciation ou encore la synthèse d'Ac²¹². La déplétion d'AID n'affecte cependant pas le profil d'expression des gènes ni la prolifération des lymphocytes B activées. L'implication d'AID dans la déméthylation de l'ADN étant sujette à débat, de plus amples études sont nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène^{214,215}. Néanmoins, il est possible que les deux mécanismes de déméthylation proposés agissent en synergie dans les lymphocytes B

activées²¹². Les régions hypométhylées après activation des lymphocytes B sont enrichies en séquences motifs des TFs MYC, BCL11A, RBPJ, EBF, E2A, FOS, PU.1 ou encore NF- κ B²¹². Ces résultats suggèrent que la déméthylation de certains sites pourraient favoriser le recrutement de TFs important dans la PCD au niveau de leurs cibles.

L'engagement des lymphocytes B vers un phénotype plasmocytaire est associé à une augmentation de la déméthylation de l'hétérochromatine dépendante du cycle cellulaire, de l'hyperméthylation des régions réprimées par le complexe Polycomb, et à l'acquisition de 5-hydroxyméthylcytosine au niveau d'enhancers et de gènes impliqués dans l'identité plasmocytaire, tel que *PRDMI*^{216,217}. De façon intéressante, les régions déméthylées dans les PBs et PCs par rapport aux lymphocytes B naïfs sont enrichies en séquences reconnues par les facteurs IRF, POU homeobox domain et bZIPTF, alors que les régions seulement hypométhylées dans les PCs sont associées à des séquences motifs reconnues par les TFs des familles Rel, NF-ATc1 et E2A^{216,218}. De manière surprenante, aucune différence de profil de méthylation n'a été observée entre les MBCs et les PCs, malgré une fonction différente. Dans ce contexte, il est possible que le méthylome constitue une mémoire épigénétique permettant une différenciation plasmocytaire plus rapide après activation des cellules B mémoires²¹⁰.

L'hyperméthylation de l'hétérochromatine et l'hyperméthylation des régions réprimées par le complexe Polycomb affectent de manière plus prononcée les LLPCs. Cette signature de méthylation de l'ADN a précédemment été associée au vieillissement de l'organisme et des cellules, ainsi qu'au développement de cancers²¹⁹⁻²²¹. De façon intéressante, bien que les plasmocytes à courte et longue durée de vie partagent un transcriptome similaire, ces cellules présentent un méthylome différent²⁰⁹. La méthylation de l'ADN pourrait donc être considérée comme une horloge épigénétique associée à l'âge de la cellule et de l'organisme, reflétant ainsi la longévité des PCs^{218,222-224}. Par ailleurs, l'hyperméthylation de l'ADN au niveau de régions réprimées par le complexe Polycomb pourrait aussi être un moyen de réduire la plasticité des cellules différenciées^{225,226}.

3) Rôle de l'architecture nucléaire 3D dans la PCD

Le génome des lymphocytes B subit une réorganisation architecturale massive des gènes transcrits après activation et entrée dans le GC. En effet, les lymphocytes B activés présentent une décompaction nucléaire importante régulée via 3 mécanismes distincts, nécessitant la présence de la protéine MYC et une production d'ATP continue²²⁷. L'acétylation globale après activation des lymphocytes, induit un repositionnement des

chromosomes de la périphérie vers l'intérieur du noyau, échappant ainsi au rôle répresseur de la matrice nucléaire²²⁷. De plus, il est également possible d'observer une diminution prononcée de deux marques épigénétiques de l'hétérochromatine : H3K27me3 et H3K9me3²²⁷. Un second mécanisme repose sur la décompaction des nano-domaines de chromatine en fibres de mono-nucléosomes, assurant un accès aux protéines régulatrices se liant sur l'ADN. Le dernier mécanisme consiste en une diminution des interactions chromatiniennes longue distance^{227,228}, une augmentation des interactions courte distance, de boucles de régulation et de domaines de contacts induits par CTCF, permettant ainsi une facilitation des contacts promoteurs-enhancers²²⁷. CTCF (CCCTC-binding factor) est une protéine architecturale ubiquitaire essentielle au maintien du programme transcriptionnel des lymphocytes B du GC (voie p53, voie du BCR, cycle cellulaire, ...) ainsi qu'à leur fort taux prolifératif, et empêchant leur différenciation prématurée en PCs via la répression de BLIMP1²²⁹. Une autre étude a montré que l'expression coordonnée des gènes dans ce modèle a lieu via différents niveaux de réorganisation de la chromatine : 1) l'augmentation de l'interaction entre promoteurs ; 2) la formation de réseaux d'enhancers caractérisés par la marque H3K27ac et l'interaction avec EP300, PU.1 et SPIB ; 3) la formation de boucle 5' à 3' ; et 4) la fusion de gènes voisins partageant des marques épigénétiques actives. La fusion au niveau 3D des gènes actifs permet un partage de l'information épigénétique et une coordination *de novo* de la transcription des gènes des différents domaines. Par exemple, BCL6, qui réprime les gènes de checkpoint du cycle cellulaire et qui est spécifiquement surexprimé dans les lymphocytes B du GC, est exprimé de manière coordonnée avec les gènes facilitant la prolifération, via la fusion de domaines 3D sur le chromosome 3. Ces différentes couches de réorganisation architecturale sont en accord avec un modèle d'activation cellulaire dynamique et coopératif dans lequel les gènes nécessitant une transcription rapide et efficace, comme les gènes intervenant dans la signalisation du BCR, la prolifération cellulaire et la répression des checkpoints de la réparation de l'ADN, subissent un remodelage structurel induit par des signaux de différenciation dans le GC²²⁸.

Notre laboratoire a récemment mis en évidence un changement de la conformation de la chromatine dans la PCD humaine normale (Figure 14). Nous observons en effet une décompaction de la chromatine du stade MBC au stade prePB, puis une recompaction dans les PCs (Figure 14). Au niveau moléculaire, ces changements sont caractérisés par une diminution des contacts intra-chromosomiques longue distance au stade prePB, suivis de leur rétablissement dans le stade PC (Figure 15). De plus, des corps nucléaires riches en marque d'hétérochromatine H3K9me2 se forment au cours de la PCD (Figure 14). Ces résultats

encourageants semblent en partie confirmer les résultats obtenus dans des modèles murins, validant ainsi l'utilisation de notre modèle in vitro pour une étude plus approfondie du rôle de la conformation de la chromatine dans la PCD humaine normale.

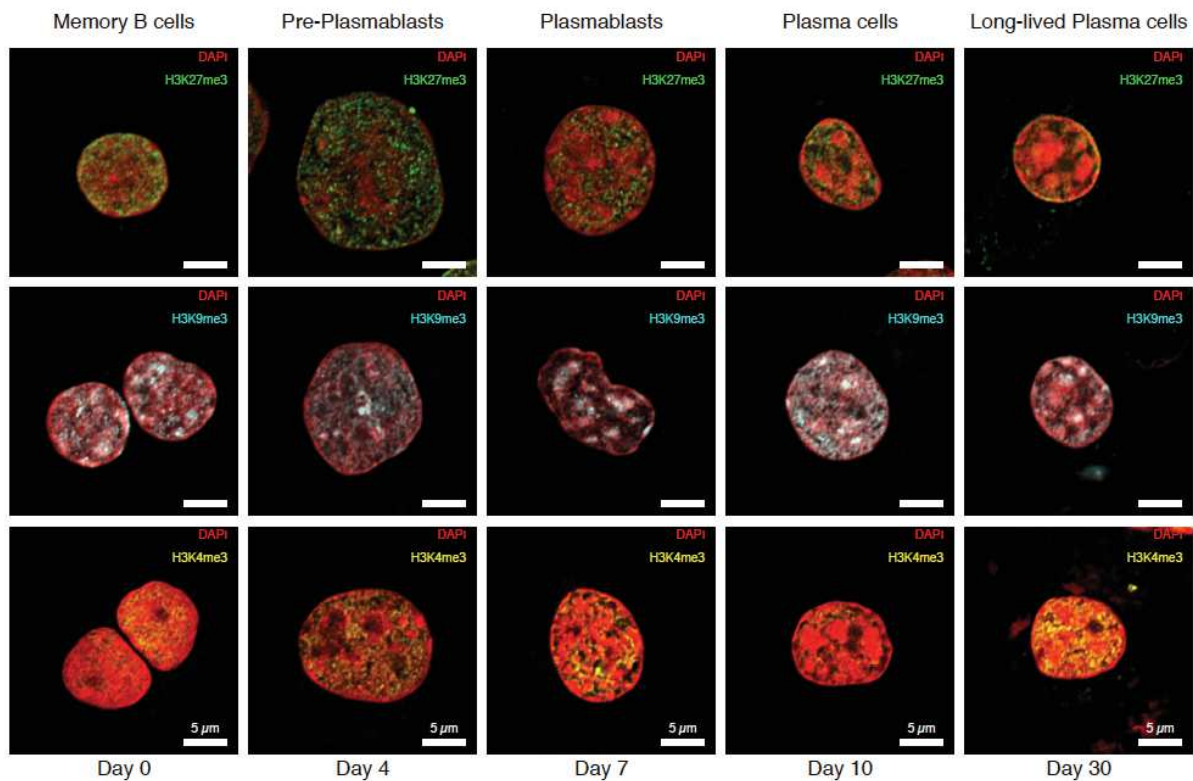


Figure 14 : Modulation de la compaction de la chromatine au cours de la PCD - Noyaux de lymphocytes B mémoires, pré-plasmablastes, plasmablastes et plasmocytes précoces et à longue durée de vie du modèle in vitro de notre laboratoire. Image prises au microscope confocal. DAPI = rouge, H3K27me3 = vert, H3K9me3 = bleu, H3K4me3 = jaune.

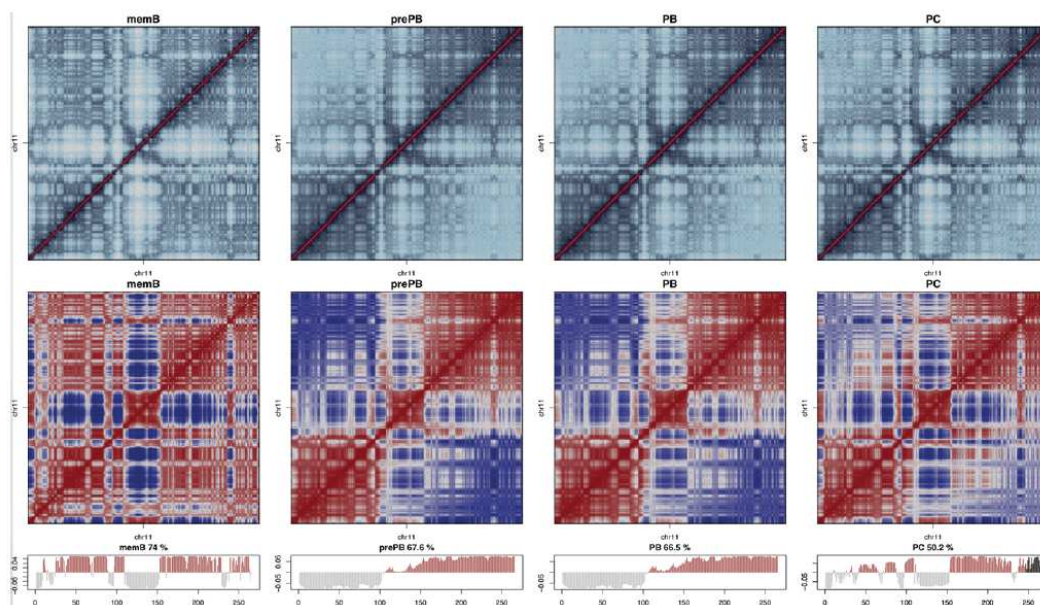


Figure 15 : Cartes de Hi-C du chromosome 11 dans les lymphocytes B mémoires, pré-plasmablastes, plasmablastes et plasmocytes du modèle in vitro de notre laboratoire.

Une étude récente sur le modèle murin a utilisé une approche globale similaire afin de comparer la conformation 3D de la chromatine entre des lymphocytes B naïfs et des PCs²³⁰. L'analyse a tout d'abord mis en évidence que le génome des PCs était enrichi en chromosomes adoptant des structures allongées et en hélice, alors que les chromosomes des lymphocytes B naïfs présentent une structure sphérique. Tout comme nous l'avons observé dans notre modèle, cette étude révèle une diminution du nombre d'interactions longue distance intra-chromosomiques au niveau des grands chromosomes dans les plasmocytes. De plus, la différenciation des lymphocytes B naïfs en PCs est caractérisée par de nombreux échanges entre le compartiment transcriptionnellement permissif vers le compartiment transcriptionnellement répressif, en corrélation avec le niveau d'expression génique de facteurs essentiels à la PCD, comme par exemple le loci *Ebfl*. Aussi, les loci géniques les plus fortement exprimés dans les PCs, c'est-à-dire les loci codant pour les chaînes lourdes et légères d'Ig, sont positionnées de manière prédominante à la périphérie du noyau, dans les lymphocytes B naïfs comme dans les PCs. Cette localisation pourrait favoriser l'export nucléaire et la traduction plus rapide au niveau du RE des ARNm produits. Pour finir, Bortnick et al. ont montré que le génome des PCs était caractérisé par l'apparition de nouvelles interactions inter-chromosomiques. Les auteurs indiquent notamment que la différenciation des PCs est étroitement liée à un enrichissement d'un large spectre d'interactions inter-chromosomiques impliquant *BLIMP1* et des gènes essentiels à la réponse UPR et à l'assemblage du RE. La formation de ces foyers transcriptionnels inter-chromosomiques pourrait expliquer comment des groupes de gènes peuvent être induits de manière simultanée pour orchestrer un programme d'expression génique spécifique des PCs²³⁰.

Une étude récente a utilisé la technique d'ATAC-seq afin d'étudier la compaction de la chromatine à une échelle plus réduite dans un modèle murin de PCD. Cette analyse a mis en évidence un remodelage de l'accessibilité de la chromatine au niveau de régions régulatrices, de manière dépendante à la division cellulaire, au cours de la PCD, corrélant avec l'expression des gènes associés. En début de différenciation, lors des premières divisions de lymphocytes B activées, les gains d'accessibilité sont associés à des gènes impliqués dans la transition endothélio-mésenchymateuse (tels que *Ezh2*, *Thfbr2*), des cascades de signalisation (tels que *Pik3r1*, *Smad4*) et la prolifération cellulaire (tel que *Ccnd1*). Les gains d'accessibilité apparaissant en fin de différenciation sont quant à eux associés à des gènes codant pour des régulateurs de la transcription (tels que *Prdm1*, *Irf4*) et de l'apoptose (tels que *Bcl2*, *Mcl1*). La diminution de l'accessibilité au cours de la PCD est associée à la perte

d'expression de gènes spécifiques des cellules B (tels que *Irf8*, *H2-Aa*) et des régulateurs positifs de la voie de signalisation NF- κ B (tels que *Traf3ip2*, *Rel*). De manière intéressante, les régions différentiellement accessibles sont enrichies en motifs reconnus par des facteurs de transcription ayant une fonction dans la PCD, tels que SPIB, AP-1, IRF, EBF, E2A, PU.1 ou encore NF- κ B²³¹.

4) Rôle des modifications d'histones dans la régulation de la PCD

Les changements conformationnels de la chromatine des cellules B au cours de leur différenciation peuvent être dus à une modification globale du statut de méthylation des histones. En effet, il a été observé que les lymphocytes quiescents présentent une réduction globale de la méthylation des histones au niveau des lysines (H3K9, H3K4, H3K27, H4K20) et des modifications caractérisant l'hétérochromatine constitutive. Après stimulation mitotique, ces marques épigénétiques sont restaurées, le volume du noyau augmente de 4 à 5 fois, la chromatine se décompacte et il est possible d'observer une surexpression et une redistribution de plusieurs protéines modifiant la chromatine, ainsi que les facteurs IKAROS et HP1. Les lymphocytes B quiescents semblent être plus facilement reprogrammables que les cellules proliférantes dans lesquelles le statut de méthylation des histones a été restauré. Ainsi, l'hypométhylation des histones pourrait être un nouvel indicateur de la plasticité épigénétique de populations de cellules quiescentes comme les lymphocytes B matures²³². Cette hypométhylation de l'histone H3 ainsi que la décompaction de la chromatine dans les cellules quiescentes pourrait s'expliquer par l'accumulation du variant d'histone H3.3 ne pouvant être méthylé sur la lysine 27. Le variant H3.3 peut également directement refléter la durée de vie des lymphocytes quiescents^{233,234}. De la même manière, il serait intéressant d'étudier le statut global de la méthylation d'histone au cours de la PCD ainsi que l'accumulation de différents variants d'histones. En effet, ces variations pourraient, à l'image de la méthylation de l'ADN, refléter l'âge biologique des plasmocytes à longue durée de vie. De façon intéressante, le traitement avec des HDACi affecte la prolifération, la survie et la différenciation des lymphocytes B, et inhibe ainsi la production d'anticorps^{201,235,236}. En revanche, la réactivation et la différenciation des MBCs en PCs fonctionnels n'est pas affectée par les HDACi²³⁶.

Plusieurs enzymes modifiant les histones interviennent dans la régulation des gènes impliqués dans la PCD. L'histone H2A deubiquitylase MYSM1 active la transcription de PAX5 dans les cellules B en deubiquitylant H2A, ce qui induit une perte de la marque

répressive H3K27me3, une augmentation des marques activatrices H3K4me3 et H3K9ac et le recrutement du coactivateur transcriptionnel PU.1 au niveau du promoteur du gène. Il est intéressant de noter que le recrutement de MYSM1 et PU.1 au niveau du locus *PAX5* diminue fortement pendant la PCD après activation des lymphocytes B. MYSM1 participe donc à l'inhibition de la PCD et de la production d'Ac²³⁷.

CIITA, un coactivateur transcriptionnel interagissant avec NF- κ B, CREB et RFX et des acétyltransférases telles que CBP, régule l'expression des MHC-II dans les cellules B matures. Au cours de la PCD, il est possible d'observer une perte de l'acétylation de H3K9 associée à une augmentation de sa méthylation, l'absence de recrutement de TFs (SP1, PU.1, CREB, E47) régulant CIITA au niveau de son promoteur, ainsi qu'une déacétylation des histones H3 et H4 dans une région régulatrice distale. Ces modifications épigénétiques entraînent la diminution de l'expression de CIITA et des protéines MHC-II dans les PCs²³⁸. Dans les cellules B du GC, BCL6, en recrutant MTA3 et les HDAC1/2 au sein du complexe répresseur Mi2/NuRD, inhibe l'expression de ses gènes cibles, dont *BLIMP1*. La perte de BCL6 dans les plasmocytes induit une hyperacétylation de promoteur de *BLIMP1*, et donc le maintien de son expression²³⁹⁻²⁴¹. BACH2, en coopération avec HDAC3, inhibe le processus de PCD en réprimant l'expression de *BLIMP1* via la déacétylation de H3K9 sur son promoteur²⁴².

Dans les PCs, les TFs clés des lymphocytes B sont réprimés, notamment via le recrutement d'enzymes capables de modifier les histones. BLIMP1 est capable de réprimer l'expression de gènes caractérisant les lymphocytes B matures (tels que *PAX5*, *CIITA* et *SPIB*) en recrutant notamment les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2, les méthyltransférases G9a et PRMT5, et la déméthylase LSD1²⁴³. La déplétion de LSD1 ou la perturbation de son interaction avec BLIMP1 provoque une diminution de la production d'Ac^{239,244}. BLIMP1 réprime également l'expression de *c-MYC* en induisant la déacétylation de son promoteur via le recrutement de HDAC1/2^{245,246}.

Dans les PCs, PRMT7 réprime l'expression de *BCL6* en méthylant l'arginine 3 de l'histone H4 au niveau de son promoteur. De façon intéressante, une déficience en PRMT7 induit la formation de GC après immunisation, et réprime la PCD²⁴⁷. La surexpression de PRMT1 dans les lymphocytes B activés participe, quant à elle, à la régulation positive de la prolifération, la différenciation et la survie des cellules²⁴⁸.

5) Rôle d'EZH2 dans la formation des GCs et la PCD

Un nombre croissant d'études a mis en évidence le rôle important d'EZH2 dans la formation des GC et dans la PCD.

En effet, *EZH2* est fortement exprimé dans les cellules B du GC, suggérant un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et la division des lymphocytes²⁴⁹⁻²⁵². EZH2 régule, en effet, différents processus dans les cellules B du GC. EZH2 supporte la prolifération, de manière dépendante^{250,251,253} et indépendante²⁴⁹ à la régulation transcriptionnelle des inhibiteurs du cycle cellulaire (CDKN1A, CDKN1B). EZH2 protège également les cellules de l'apoptose induite par les dommages à l'ADN médiés par AID²⁴⁹. Un nombre plus important de domaines bivalents (H3K4me3 et H3K27me3) a été observé dans les cellules B du GC comparativement aux cellules B naïves, confirmant l'état transitionnel de ces cellules. EZH2 réprime ainsi de manière transitoire la différenciation des cellules B en inhibant des gènes clés normalement exprimés dans les PCs (IRF4, BLIMP1). Ces gènes sont notamment impliqués dans la sortie du GC, induits par CD40, IRF4, IL10 et NF-κB, et exprimés dans les PCs²⁵⁰. Une partie des gènes réprimés par EZH2 dans ce contexte sont également des cibles de BCL6²⁴⁹. En effet, il a été démontré que le complexe PRC1 non canonique, via la protéine CBX8, est capable de se fixer sur H3K27me3 des promoteurs bivalents de novo, alors que BCL6 et BCOR sont directement recrutés sur l'ADN et stabilise le complexe PRC1-BCOR. Cette collaboration permet et est nécessaire à la répression transitoire efficace d'une partie des gènes bivalents impliqués dans la PCD (IRF4, BLIMP1, CDKN1A)²⁵⁴.

De façon intéressante, des études ont montré qu'une mutation activatrice d'EZH2 pouvait conduire à une hyperplasie des GC, et pourrait participer à la lymphomagénèse^{249,250,255}. En revanche, l'inhibition chimique de cette enzyme au cours de la PCD favorise la formation de PCs, induit l'expression de gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire et le métabolisme ainsi que l'expression prématurée de *BLIMP1*²³¹. Ces résultats soulignent l'importance de la régulation fine de l'expression de EZH2 pendant le processus de PCD. E2F1 induit de manière directe l'expression d'*EZH2* dans les cellules B du GC. EZH2 est à son tour capable d'activer E2F1 en induisant la phosphorylation de Rb via la répression de l'expression de *CDKN1A*. La régulation de la prolifération par EZH2 pourrait donc aussi se faire de manière indirecte via l'activation d'E2F1²⁵³. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence le rôle important du TF de la famille NF-κB, c-Rel, dans la régulation positive de l'expression d'*EZH2* dans les lymphocytes B activés²⁵⁶.

Une étude récente sur un modèle murin montre le rôle d'EZH2 dans la production et la fonction des PCs. Les auteurs montrent dans un premier temps que les cellules sécrétrices

d'anticorps expriment fortement EZH2. Ce résultat est pour le moins surprenant étant donné qu'EZH2 a été montré comme étant exprimé majoritairement dans des cellules hautement proliférantes, ce qui n'est pas le cas des PCs matures. Par ailleurs, comme observé dans d'autres études, la faible quantité de PCs produits après activation de cellules B déficientes pour EZH2 est en partie liée à la diminution du nombre de division due à la surexpression de gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire (*CDKN1A*). EZH2 est également impliqué dans la répression du programme transcriptionnel de cellules B matures dans les PCs, dont la majorité est aussi réprimée par BLIMP1, tels que les gènes *CIITA*, *BCL6* ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'inflammation médiée par NF- κ B²⁵⁷. EZH2 est par ailleurs responsable de la régulation de gènes impliqués dans la réponse UPR, de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative dans les plasmocytes. Ces mécanismes facilitant la sécrétion des anticorps, EZH2 joue ainsi un rôle majeur dans la fonction primaire des PCs(Figure 16)²⁵⁷.

Mon premier projet a été d'étudier le rôle d'EZH2 dans notre modèle de PCD *in vitro*, via la détermination de ses gènes cibles ainsi que l'étude de l'effet de son inhibition enzymatique sur la différenciation des MBCs en PCs.

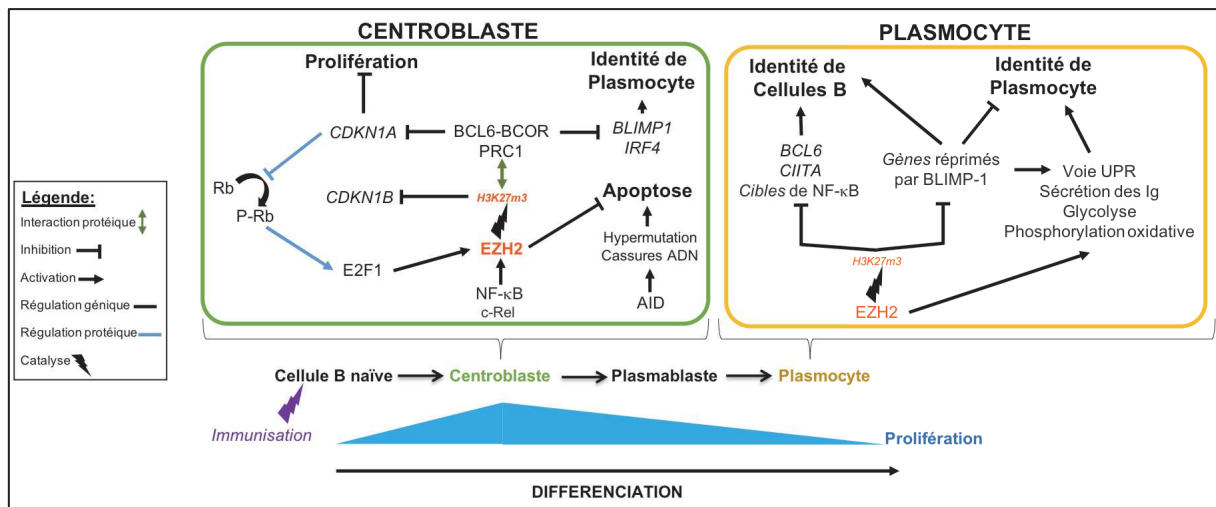


Figure 16 : EZH2 joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules B en plasmocytes – Dans les centroblastes, EZH2 régule la prolifération en inhibant des inhibiteurs du cycle cellulaire, protège les cellules de l'apoptose et réprime l'expression de facteurs de transcription plasmocytaires. Dans les plasmocytes, EZH2 inhibe les facteurs de transcription caractérisant l'identité des cellules B et régule divers mécanismes associés aux cellules sécrétrices d'anticorps.

III. Myélome multiple

A. Épidémiologie

Le myélome multiple (MM), un cancer des plasmocytes différenciés, est la seconde hémopathie la plus fréquente après les lymphomes non-Hodgkinien. Le MM représente 1,7% des néoplasies et 10-13% des hémopathies malignes en 2017. Globalement, l'incidence varie de 0,4 à 6,3 cas pour 100 000 personnes et est plus forte dans les pays développés comme les États-Unis, l'Europe de l'ouest et l'Australie, ce qui est probablement dû à la présence de meilleures techniques de diagnostic et une meilleure connaissance clinique de la maladie. Environ 30 000 nouveaux cas par an sont diagnostiqués aux États-Unis et 15 000 en Europe. L'élément déclencheur de la maladie est, cependant, à ce jour, encore inconnu. Plusieurs facteurs de risques de développement de MM ont été décrits, tels que l'âge, le sexe, le groupe ethnique, les facteurs environnementaux, les facteurs génétiques... L'âge médian au diagnostic est en effet compris entre 63 et 70 ans. L'occurrence de la maladie est beaucoup plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, et deux fois plus élevée au sein de la population afro-américaine par rapport à la population caucasienne américaine. En revanche, l'incidence est moins élevée chez les individus asiatiques et hispaniques (Figure 17). L'origine de cette distribution inégale, selon le sexe et le groupe ethnique, n'est pas connue. Bien que plusieurs études aient proposé l'existence de facteurs de risque environnementaux, le rapport de cause à effet n'a pas été démontré. En outre, le risque de développer une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), forme asymptomatique du MM, pour les membres de la famille proche d'un patient atteint d'un MM est augmenté de deux fois, suggérant l'existence d'un facteur de risque génétique. En effet, plusieurs études sur le génome ont montré que différents loci génétiques, dont des SNPs, étaient associés au risque de développement d'un MM.

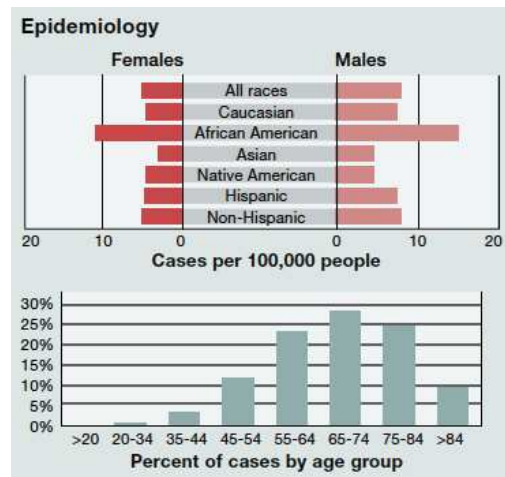


Figure 17 : Épidémiologie du MM issu du SnapShot de la revue Cell « Multiple Myeloma » par E. Braggio, K.M. Kortüm et A.K. Stewart²⁵⁸ – Le premier graphique représente l'incidence du MM en fonction du sexe et de l'ethnicité des patients. Le second graphique met en évidence le pourcentage de MM diagnostiqué en fonction de l'âge des patients.

Les cellules malignes résident principalement dans la moelle osseuse, mais elles peuvent également être retrouvées dans le sang périphérique et des sites extramédullaires, plus tardivement dans la maladie. Chez la majorité des patients, le MM est caractérisé par la sécrétion d'une protéine d'immunoglobuline monoclonale (protéine M), produite anormalement par les plasmocytes. Cependant, chez 15-20% des patients, les cellules de MM sécrètent seulement des chaînes légères monoclonales, et chez moins de 3% des patients, les cellules malignes ne sécrètent pas de protéines monoclonales. Les manifestations cliniques de la maladie, connues sous le nom de signes CRAB, sont associées à la monoclonalité de protéines d'Ig, aux cellules tumorales et aux cytokines sécrétées par ces dernières. Ils incluent l'hypercalcémie, l'insuffisance rénale, l'anémie, et/ou une maladie osseuse avec lésions lytiques ou fractures pathologiques.

B. L'origine de la myélomagenèse

L'oncogenèse du MM suit un modèle multi-étapes caractérisé par l'apparition d'altérations du génome et des modifications du microenvironnement.

L'origine du clone tumoral est une cellule tardive de la différenciation lymphocytaire B. Comme stipulé auparavant, les cellules B du GC sont le siège de la maturation des Ac via la SHM et la CSR. Le plasmocyte tumoral produit des immunoglobulines d'isotype IgG ou IgA, et rarement des IgD ou IgE, il semblerait que le phénomène de CSR ait eu lieu avant le

développement de la maladie. Aussi, l'analyse des séquences des gènes variables des chaînes lourdes et légères d'Ig des plasmocytes tumoraux a montré un taux élevé de mutations tout au long de la maladie. En outre, des translocations chromosomiques et des fusions de gènes aberrantes apparaissent régulièrement dans les lymphocytes B activées du GC. Si ces aberrations impliquent des oncogènes spécifiques, elles confèrent aux plasmocytes un avantage prolifératif, entraînant le développement d'un état pathologique comme décrit ci-après. Ces données mettent en évidence l'origine lymphoïde post-folliculaire des cellules de MM. Par ailleurs, les LLPCs et les MBCs, capables de survivre plusieurs années chez l'être humain, peuvent être sujets à différents types d'agressions environnementales au cours du temps, pouvant potentiellement induire des altérations chromosomiques/génétiques/épigénétiques oncogéniques. Cela pourrait entraîner une différenciation incomplète et anormale des MBCs après réactivation, ou une dédifférenciation des PCs en types cellulaires prolifératifs immatures. L'âge biologique épigénétique de ces types cellulaires pourraient également avoir un lien avec le développement tumoral. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le MM atteint principalement les sujets âgés.

C. Caractérisation moléculaire du MM

Le premier stade de la maladie est la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), pouvant progresser, vers un MM indolent (SMM). Seulement 1% des MGUS progressent vers un MM intramédullaire. Les cas les plus agressifs de MM évoluent en MM extra-médullaire (leucémies à plasmocytes).

Le MM est une maladie hétérogène, tant au niveau moléculaire que clinique, présentant plusieurs altérations génétiques primaires et secondaires (Figure 18). Il existe trois caractéristiques différenciant les anomalies cytogénétiques primaires et secondaires. Premièrement, un clone donné de cellules de MM ne peut pas arborer deux anomalies cytogénétiques primaires en même temps, alors qu'une ou plusieurs anomalies cytogénétiques secondaires peuvent apparaître en même temps que chaque altération cytogénétique primaire. Deuxièmement, les anomalies cytogénétiques primaires apparaissent dès le stade MGUS de la maladie, et sont considérées comme des événements initiateurs entraînant l'établissement de la population clonale dominante. Troisièmement, les anomalies cytogénétiques primaires sont détectables dans la totalité des cellules de la population clonale d'un même échantillon

clinique. Par ailleurs, les anomalies cytogénétiques secondaires peuvent être différentes en fonction du sous-clone observé²⁵⁹.

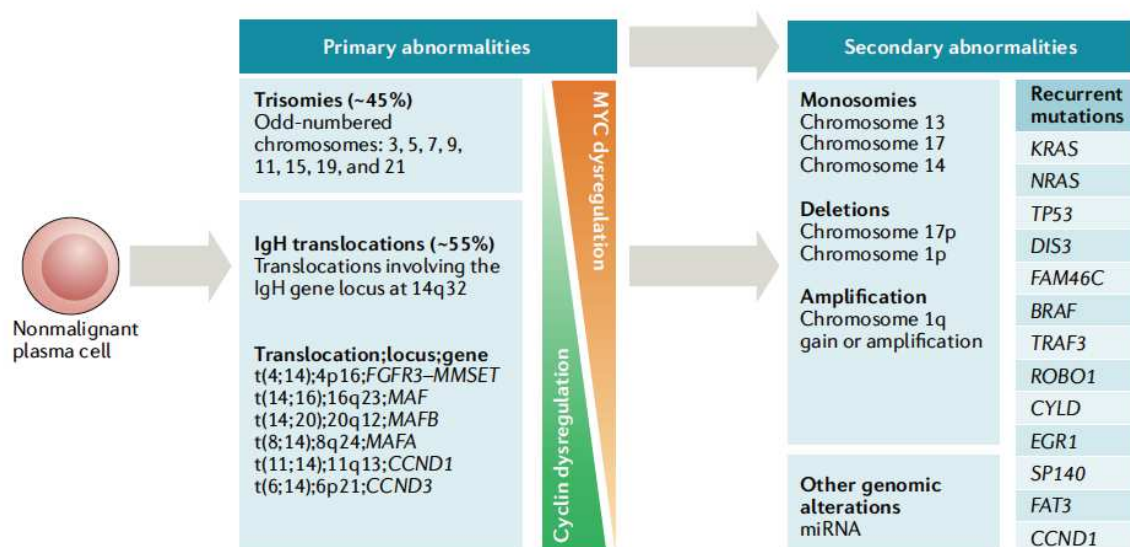


Figure 18 : Schéma issu de la revue de S.K Kumar et S.V. Rajkumar de 2018 dans le journal *Clinical Oncology*²⁵⁹ présentant les aberrations génétiques observées dans le MM – La cellule tumorale de MM est un plasmocyte ayant subi des altérations chromosomiques non chevauchantes ainsi que des aberrations secondaires, telles que des variations du nombre de copie d'un chromosome ou d'un bras de chromosome, ou encore des mutations récurrentes.

1) Les anomalies chromosomiques récurrentes

Les premiers évènements associés aux stades précurseurs, et probablement au développement du myélome, sont les translocations chromosomiques et les aneuploïdies. Les translocations impliquant *IGH* (le gène codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines) et les gènes partenaires récurrents, comme *MMSET* (*NSD2*), *FGFR3* et *CCND1*, représentent une classe importante des évènements primaires identifiés dans les MGUS, SMM et MM. En effet, la fusion de la région régulatrice du gène *IGH* avec d'autres gènes aboutit à l'augmentation de l'expression du gène partenaire. La translocation t(11;14), retrouvée chez 14% des patients, résulte en une surexpression de *CCND1*, et permet ainsi un avantage prolifératif. La translocation t(4;14) est retrouvée chez 11% des patients, et entraîne la surexpression de *MMSET* et souvent de *FGFR3*. D'autres translocations récurrentes impliquant la région *IGH* sont les translocations au niveau des gènes *c-MAF* (t(14;16), 3% des patients), *MAFB* (t(14;20), 1,5% des patients), et *CCND3* (t(6;14), <1% des patients).

L'hyperploïdie est la plus fréquente forme d'aneuploïdie dans le MM. Une étude récente sur 965 patients atteints de MM a mis en évidence que 35% des patients avaient moins de 46 chromosomes (hypoploïdie), 13% avaient 46 chromosomes (pseudoploïdie), 14% avaient 47-50 chromosomes (hyperploïdie) et 38% avaient plus de 50 chromosomes (hyperploïdie importante). L'hyperploïdie est caractérisée par les trisomies simultanées des chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15 et 19 chez les patients atteints de MM. Malgré la fréquente cooccurrence de ces trisomies, les trisomies 3 et 5 ont été rapportées comme étant associées à un bon pronostic, alors que la trisomie 21 est associée à un pronostic péjoratif. En termes de ploïdie, les patients hypodiploïdes présentent un plus mauvais pronostic, suivis par les patients pseudodiploïdes et hyperdiploïdes.

En plus de ces anomalies chromosomiques, de nombreuses altérations du nombre de copies de gènes (CNVs) ont été mises en évidence dans le MM. Ces CNVs comprennent la perte du bras court du chromosome 1 (Del(1p)), le gain du bras long du chromosome 1 (gain(1q)), la délétion du bras long du chromosome 13 (del(13q)) et la perte du bras court du chromosome 17 (del(17p)). La del(17p), associée à la perte du gène *TP53*, et les gains de 1q ont une valeur de mauvais pronostic.

2) Les mutations secondaires

L'apparition de mutations représente l'événement secondaire majeur dans la progression de la maladie et participe au développement et à l'hétérogénéité intra-tumorale. En effet, le séquençage de nouvelle génération (NGS) a mis en évidence la coexistence de sous-clones de plasmocytes tumoraux ne présentant pas exactement les mêmes mutations. Les mutations les plus fréquentes sont les mutations sur *KRAS* (23% des patients), *NRAS* (20%), *FAM46C* (11%), *DIS3* (11%) et *TP53* (8%). Les autres mutations récurrentes mais moins fréquentes touchent les gènes *BRAF*, *TRAF3*, *PRDM1*, *CYLD*, *RB1*, *IRF4*, *EGR1*, *MAX*, *HIST1H1A* et *ACTG1*. Le rôle spécifique de ces mutations dans le MM reste à être défini. De manière intéressante, il a été montré que les mutations récurrentes pouvaient être présentes au diagnostic ou apparaître à la rechute, potentiellement sous l'influence des traitements, conférant un avantage sélectif au clone muté.

En plus des mutations, l'expression de nombreux gènes se trouve dérégulée dans les cellules de MM par rapport aux PCs normaux. Par exemple, l'expression du facteur de transcription *MYC* est dérégulée chez 49% des patients. Ce TF régule des gènes impliqués dans des mécanismes majeurs de la physiopathologie du MM, tels que la régulation du cycle

cellulaire ou encore la glycolyse. Malgré cette hétérogénéité mutationnelle, les protéines affectées sont impliquées dans des voies de signalisation contrôlant la prolifération et la survie des cellules de MM, telle que la voie NF-κB. En effet, les anomalies génétiques de 20% des patients induisent l'activation de la voie NF-κB non-canonique, capable d'augmenter l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques. Un aperçu des voies de signalisation affectées est présenté en Figure 19.

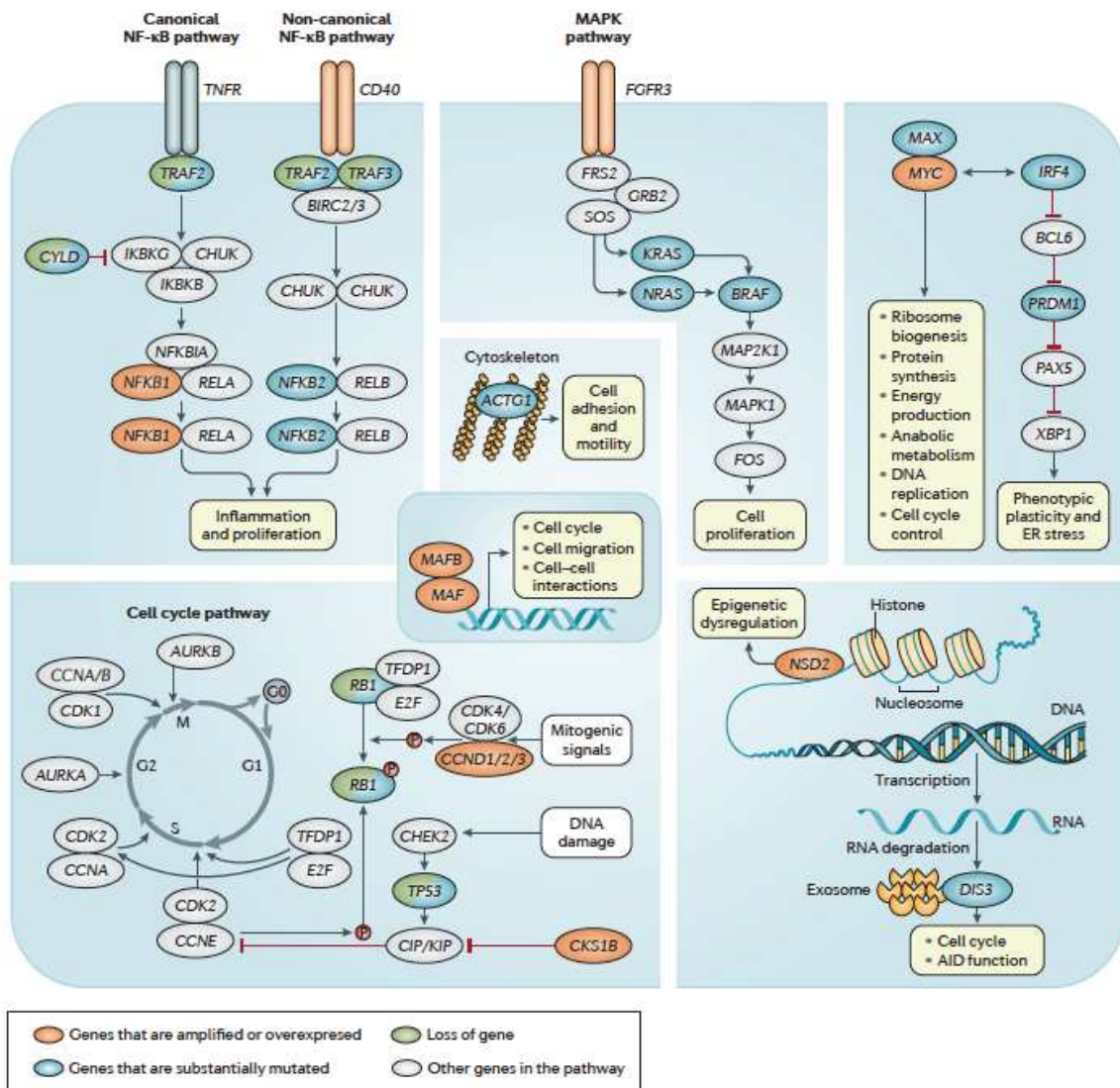


Figure 19 : Schéma issu de la revue de S.K Kumar, V. Rajkumar, R.A. Kyle, M. van Duin, P. Sonneveld, M-V. Mateos, F. Gay et K.C. Anderson de 2017 dans le journal *Disease Primers*, illustrant les voies de signalisation affectées dans le MM²⁶⁰ - L'amplification ou la surexpression, la mutation ou la délétion de différents gènes altèrent différents processus et voies de signalisations essentiels à la survie et la prolifération des cellules de MM, dont les voies NF-κB canoniques et non-canoniques, la voie MAPK, la différenciation plasmocytaire, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'intégrité du cytosquelette, les mécanismes épigénétiques et le métabolisme des ARN.

3) La classification moléculaire

Une analyse des profils d'expression génique a permis de classer les patients en 7 sous-groupes. Certains sous-groupes, comme les MF, MS et HY reflètent les aberrations cytogénétiques fréquentes, comme t(4 ;14) ou t(14 ;20) (avec une surexpression de MAF et MAFB), t(4 ;14) (avec une surexpression de MMSET et souvent FRFR3) et l'hyperdiploïdie (avec une surexpression de TNFSF10 notamment), respectivement. D'autres sous-groupes montrent une expression différentielle d'autres ensembles de gènes, comme la surexpression de gènes associés à la prolifération (sous-groupe PR), la faible expression de gènes impliqués dans la maladie osseuse (sous-groupe LB), une surexpression des cyclines D1 et D3 (sous-groupes CD-1 et CD-2). Les sous-groupes MS, MF et PR sont associés à un mauvais pronostic²⁶¹.

4) Hétérogénéité intra-clonale et évolution du MM

Alors que les patients atteints de MM peuvent être stratifiés grâce aux caractéristiques moléculaires très hétérogènes de leurs cellules tumorales, plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité intra-clonale chez un même patient. En effet, des analyses comparant les anomalies de l'ADN observées au diagnostic et à la rechute ont mis en évidence l'existence de différents sous-clones dès le diagnostic, dont la dominance serait soumise à la pression de sélection liée à l'accessibilité à la niche médullaire et aux traitements²⁶²⁻²⁶⁴. Il existerait en effet différents types d'évolution clonale au cours de la maladie en fonction des patients : aucune variation du génome, évolution linéaire ou évolution par embranchement (Figure 20)²⁶²⁻²⁶⁴. L'hétérogénéité observée est certainement une caractéristique essentielle à l'évolution clonale, la progression de la maladie et la rechute. Le cas d'évolution par embranchement est particulièrement observé chez les patients présentant des caractéristiques cytogénétiques de mauvais pronostic. Différentes études suggèrent que les mutations seraient acquises de manière aléatoires et seraient sélectionnées d'après l'avantage clonale conféré à un temps $t^{265,266}$. En effet, non seulement les sous-clones diffèrent au niveau phénotypique et cytogénétique, mais aussi au niveau de leur chimiorésistance et de leur potentiel clonogénique²⁶⁷. De plus, plusieurs études montrent que les traitements induisent la sélection de sous-clones nouvellement dominants de plasmocytes chimiorésistants ayant un profil génétique et d'expression génique différent par rapport au sous-clone dominant détecté au diagnostic^{268,269}. Une étude a également montré la présence

de différentes sous-populations dans un même clone, présentant les mêmes altérations chromosomiques mais un phénotype différent. Les cellules de MM sont ainsi capables de transiter de manière bidirectionnelle entre des phénotypes matures et immatures, notamment grâce à des mécanismes épigénétiques. Cette capacité à arborer un profil immature leur confère notamment un moyen de résister aux traitements²⁷⁰.

Cette nouvelle complexité de l'évolution tumorale nous permet de mieux comprendre l'apparition inévitable des chimiorésistances dans le MM, et d'imaginer de nouvelles stratégies de diagnostic (capables de détecter et caractériser les différents sous-clones) et thérapeutiques (capables de cibler tous les sous-clones).

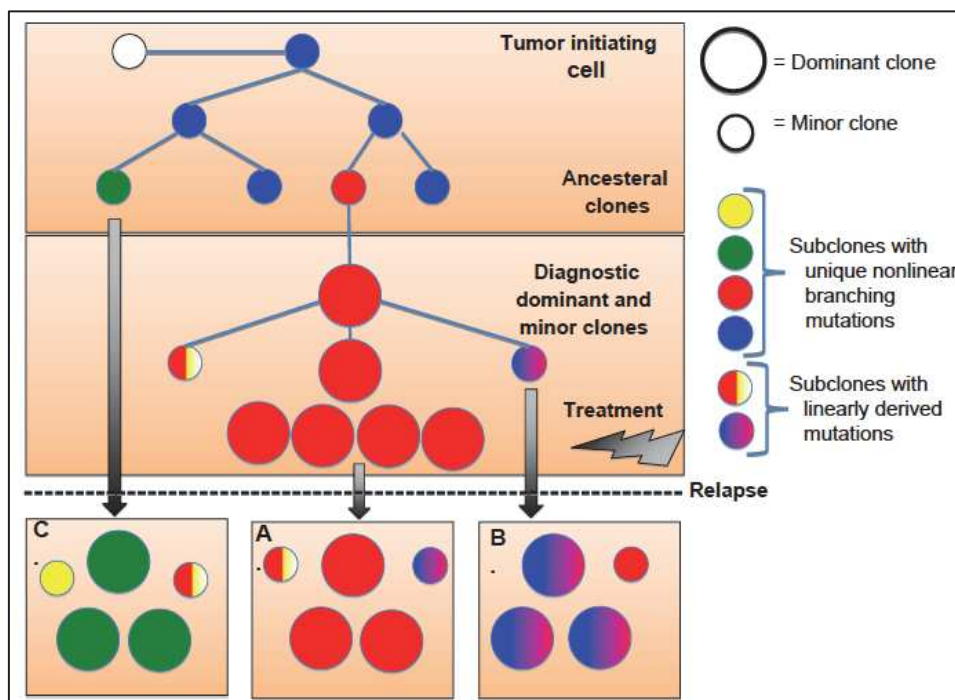


Figure 20 : Schéma, issu de la revue de NJ Bahlis de 2012 dans le journal Blood, illustrant l'architecture de l'évolution clonale dans le MM au diagnostic et à la rechute²⁶⁵ – Au diagnostic, il est possible de détecter une diversité clonale avec une coexistence de sous-clones mineurs et dominants issus d'une cellule ancestrale commune initiatrice de la tumeur. La maladie clonale à la rechute suit l'un des 3 schémas d'évolution : (A) les clones sont identiques à ceux détectés au diagnostic sans acquisition de nouvelles altérations génomiques, (B) les clones évoluent à partir de ceux du diagnostic par acquisition linéaire de mutations, (C) les clones évoluent à partir d'un clone ancestral mineur via l'acquisition de nouvelles mutations génomiques et réarrangements chromosomiques. Le schéma (C) est plus communément observé pour les maladies de haut risque au niveau cytogénétique.

5) Les dérégulations épigénétiques

De nombreuses altérations de mécanismes épigénétiques ont été mis en évidence dans le MM, et sont liés au développement et la progression tumorale ainsi qu'à la résistance aux traitements.

(a) Altération du profil de méthylation de l'ADN dans le MM

L'étude du méthylome dans le MM montre une hypométhylation globale de l'ADN pendant la transition MGUS à MM, une hyperméthylation de suppresseurs de tumeurs au stade MM, et une reméthylation massive pendant la transition MM vers PCL^{271,272}. L'hypométhylation globale corrèle avec la progression de la maladie^{271,273}, un mauvais pronostic²⁷⁴ et la résistance aux traitements conventionnels. L'hypométhylation, retrouvée en particulier au niveau des régions d'hétérochromatine et des domaines associés à la lamine, a une faible corrélation avec l'expression des gènes²⁷⁵. L'hypométhylation de séquences répétées participe à l'instabilité génomique et aux réarrangements chromosomiques dans les cellules de MM²⁷⁶. L'hypométhylation des promoteurs de différents gènes et miARNs participant à la prolifération et à la survie, est corrélée à leur surexpression dans le MM. L'hypométhylation du promoteur du transporteur *ABCG2* induite par la chimiothérapie entraîne une augmentation de l'efflux des drogues dans les cellules de MM²⁷⁷. Plusieurs études ont également mis en évidence une hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et des voies de signalisation clés dans le MM. L'hyperméthylation de promoteur de certains gènes, tels que *p16*, *BCL2* et *E-CAD*, augmente avec la progression de la maladie et est associé à un mauvais pronostic²⁷⁸⁻²⁸¹. De façon intéressante, les régions hyperméthylées se trouvent en dehors des promoteurs riches en CpG, et sont enrichies au niveau des régions régulatrices contenant des séquences motifs de facteurs de transcription spécifiques des cellules B(1-4,11,12)²⁷⁵. Ces régions régulatrices sont progressivement déméthylées au cours de la PCD, ce qui indique qu'elles réacquièrent un état chromatinien de cellules indifférenciées dans le MM. Les mécanismes expliquant ce pattern de méthylation anormal dans le MM sont encore inconnus. La surexpression des enzymes DNMT1 et DNMT3a^{271,272,282}, la perte de TET2 via sa régulation par le miR-22²⁸³, ou encore des mutations dans ces enzymes modifiant la méthylation de l'ADN, telles que TET1/2/3, IDH1/2 et DNMT1/3A/3B²⁸⁴ constituent de potentiels scénarios capables d'expliquer partiellement l'altération des profils de méthylation de l'ADN observée dans le MM. Ces données mettent en évidence le rôle prépondérant de la

méthylation de l'ADN dans la pathogénèse du MM, et suggèrent un intérêt certain du ciblage de ces marques épigénétiques dans le traitement du MM.

(b) Dérégulations de l'expression de miARNs dans le MM

De nombreux miARNs régulent l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose sont dérégulés dans les cellules de MM^{276,285-287}. Les études sur le profil d'expression de miARNs sur les plasmocytes sains, de MGUS et de MM ont révélé des signatures de miARNs distinctes, avec une surexpression de miARNs « oncogéniques », dont miR-18, miR-21, miR-125a-5p, miR-32, miR-92a, miR-99a, miR-181a, miR-181b, miR-221, miR-222 and miR-17-92, miR-106~25, ainsi qu'une diminution de l'expression de miARNs « suppresseurs de tumeurs » tels que miR-29b, miR-125b, miR-199a-5p, miR-15a, miR-16 et miR-370^{276,286,288-291}. Les altérations génomiques, telles que les variations du nombre de copie au niveau de loci de miARNs et les translocation/délétions spécifiques, les altérations épigénétiques, en terme de méthylation de l'ADN et de modifications d'histones, sont impliquées dans la modulation de l'expression de miARN²⁹². Par exemple, les miARNs suppresseurs de tumeur des familles miR-34, miR-194-2-192, miR-203, miR-124-1, miR-152, miR-10b, miR-9-1, miR-155 et miR-23b sont inactivés via une hyperméthylation de leur promoteur²⁷⁶. Certains miARNs, comme le miR-29b, via leur capacité à réguler l'expression d'enzymes épigénétiques, modulent les processus de méthylation de l'ADN ou d'acétylation des histones^{276,293}. Les miARNs peuvent être impliqués dans la résistance au traitement dans le MM²⁸⁵. En effet, le miR-125b, par exemple, en réprimant le suppresseur de tumeur p53, participe à la résistance des cellules de MM à l'apoptose induite par la dexaméthasone²⁹⁴. L'expression des miARNs pourrait donc servir de biomarqueur permettant d'évaluer le pronostic ou la réponse aux traitements des patients atteints de MM.

Un rôle moins étudié des miARNs exprimés par les cellules tumorales, est leur capacité de réguler l'expression de gènes dans des cellules du microenvironnement. En effet, les cellules tumorales sont capables de sécréter des miARNs via des vésicules extracellulaires. Des études récentes ont montré le rôle de ces miARNs dans l'angiogenèse, la modulation de la réponse immunitaire, l'activation des ostéoclastes et la résistance aux drogues. Ces vésicules extracellulaires pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques via l'inhibition de la communication des cellules tumorales avec leur microenvironnement. En outre, les miARNs sécrétés par les cellules tumorales, et présents dans le sérum des patients atteints de MM, pourraient être utilisés comme biomarqueurs. En effet, ceci permettrait de

limiter les ponctions de moelle osseuse, d'établir un suivi plus régulier des patients et améliorerait ainsi leur qualité de vie²⁹⁵.

(c) Modification de l'organisation 3D de la chromatine dans le MM

Des études de microscopie ont mis en évidence un volume nucléaire et une taille de territoires chromosomiques plus importants dans les cellules de MM, comparés aux cellules B^{296,297}. De plus, les cellules de MGUS présentent plus d'espace dépourvu d'ADN par rapport aux cellules de MM²⁹⁷. Cette même étude a établi une corrélation entre la répartition des chromosomes dans le noyau interphasique des lymphocytes, et les translocations observées dans le MM²⁹⁶. Une étude de génomique à plus grande échelle montre que la localisation des cassures d'ADN correspondant aux variations du nombre de copies dans les MM coïncide avec les frontières des TADs. Ainsi, les altérations du génome observées dans le MM pourraient être favorisées par la conformation topologique du noyau dans la cellule saine. Par ailleurs, les cellules de MM présentent un nombre plus important de TAD ainsi qu'une diminution de leur taille. Certaines régions du génome semblent également changer de type de compartiment chromatinien A/B, en association avec une variation de l'expression des gènes²⁹⁸. Ces données comparent la conformation 3D du noyau des cellules tumorales avec des cellules B non activées saines. Il serait, par la suite, intéressant d'établir la carte 3D du noyau de cellules B activées ou de prePB, ainsi que de plasmocytes, et de les comparer avec celle de cellules de MM. Ce type d'étude peut, d'une part, permettre d'expliquer les variations d'expression génique observées dans les cellules de MM, et d'autre part établir un lien entre les altérations génétiques connues dans le MM et l'organisation 3D de la chromatine de leurs potentielles cellules d'origine.

La protéine HP1 joue un rôle important dans l'organisation 3D de la chromatine. Pawlyn et al. ont mis en évidence des mutations dans la famille de gènes HIST1H1B-E codant pour l'histone HP1, chez 6% des patients atteints de MM. Ces mutations faux-sens se situent au niveau du domaine de fixation à l'ADN de HP1 et, de ce fait, pourrait altérer la fonction de la protéine ainsi que son association avec la chromatine. Des mutations ont également été reportées sur les gènes codant pour les protéines histones H2A, H2B, H3 et H4 chez les patients atteints de MM. L'évaluation de l'effet fonctionnel de ces mutations est nécessaire afin de déterminer leurs impacts clinico-biologiques²⁹⁹.

(d) Variation globale des modifications d'histones dans le MM

Des mutations des histones acétylases EP300 et CREBBP ont été décrites chez des patients atteints de MM²⁹⁹, notamment à la rechute. Ces HATs pourraient donc être impliquées dans la résistance aux traitements²⁹⁹. Par ailleurs, les HDACs sont surexprimées dans le MM, et les niveaux élevés des HDACs de classe I ont une valeur de mauvais pronostic dans le MM³⁰⁰. La dérégulation de l'expression de ces enzymes dans le MM est non seulement impliquée dans l'altération des profils d'expression géniques, mais également dans des voies de signalisation régulées par des cibles non-histones des HATs/HDACs, dont la réparation de l'ADN, l'épissage ou encore le cycle cellulaire³⁰¹.

La méthylation de H3K9 semble jouer un rôle important dans le MM. La déméthylase KDM3A (H3K9me1/2) participe à la régulation de la prolifération, de la survie et de l'interaction avec le microenvironnement des cellules du MM³⁰². Par ailleurs, des mutations de la déméthylase KDM3B (H3K9me1/2) ont été observées chez des patients atteints de MM²⁹⁹. Ces enzymes pourraient être impliquées dans la régulation de différents groupes de gènes permettant la croissance des cellules de MM. Il serait nécessaire d'étudier la répartition globale de la méthylation d'H3K9 afin d'affiner notre compréhension du rôle de cette marque dans le MM.

LSD1/KDM1A réprime la transcription des gènes, en déméthylant H3K4. Des mutations non-sens germinales de LSD1 ont été retrouvées chez des familles de patients MM et leurs proches. De plus, des mutations non-sens et faux-sens délétères ont été identifiées chez des patients de MM non apparentés, associées à un enrichissement en gènes cibles de c-MYC et à voies de signalisation importantes dans le MM. De plus, l'expression de LSD1 est moins importante dans les cellules tumorales de MGUS et de MM par rapport aux PCs normaux. De façon intéressante, chez la souris, l'immunisation suivie de l'inhibition de KDM1A induit l'expansion des plasmocytes, une réponse immunitaire secondaire plus importante et une surexpression des gènes cibles de c-MYC, caractéristique retrouvée pendant le développement du MGUS. Ces résultats montrent que la mutation germinale autosomique dominante de LSD1 pourrait prédisposer au développement d'une gammopathie monoclonale chez la souris, et confèrent un aperçu du rôle suppresseur de tumeur de LSD1 pendant la PCD³⁰³.

Les marques de méthylation affectant la lysine 36 de l'histone H3 sont associées à des régions de chromatines transcriptionnellement actives et sont distribuées sur le promoteur (H3K36me1) et le corps (H3K36me2/3) du gène. Les enzymes catalysant H3K36me1/2 sont des enzymes de la famille NSD, dont NSD1, NSD2 (ou MMSET) et NSD3 (ou WHSC1L1).

Les mutations du gène NSD1 sont retrouvées chez les patients de MM à la rechute, suggérant un rôle dans la résistance aux traitements³⁰⁴; alors que des mutations de MMSET et WHSC1L1 sont enrichies dans tous les stades de la maladie^{299,305}. Des mutations de SET2D, enzyme responsable de la tri-méthylation de H3K36, sont retrouvées chez les patients au diagnostic et sont particulièrement enrichies chez les patients à la rechute²⁹⁹. De plus, une mutation activatrice de MMSET, entraînant une augmentation du niveau global de H3K36me2, a été identifiée dans le MM³⁰⁶. MMSET est surexprimé chez environ 15% des patients atteints de MM, en conséquence de la translocation chromosomique t(4;14), communément utilisé comme marqueur de mauvais pronostic. MMSET en catalysant H3K36me3 permet l'activation de l'expression d'oncogènes, et en catalysant H4K20me2/3 et en coopérant des complexes corépresseurs, réprime l'expression du miR-126 ciblant c-MYC³⁰⁷⁻³⁰⁹. MMSET, en régulant l'expression de gènes, participe donc à la prolifération des cellules de MM. MMSET, en catalysant la méthylation de H4K20, favorise le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN, et, de ce fait, joue un rôle important dans la résistance aux agents génotoxiques^{310,311}.

Les dérégulations de la méthylation de H3K27me3 jouent également un rôle important dans la physiopathologie du MM. Une mutation inactivatrice de l'histone déméthylase KDM6A/UTX (H3K27me3) a été observée chez 10% des patients n'arborant pas de translocation t(4;14)^{305,312-314}. La déméthylase UTX peut interagir avec la méthyltransférase KMT2, méthylant H3K4 au niveau des régions régulatrices de gènes, ainsi que des complexes activateurs de la transcription. Des mutations de KMT2 ont été observés chez 5-7% des patients de MM^{299,305}. Les mutations affectant ces complexes activateurs, contrôlant le passage d'un état transcriptionnel réprimé (H3K27me3) et un état actif (méthylation/acétylation H3K4), altèrent certainement le paysage épigénétique des cellules de MM et peuvent être la cause de la répression de gènes spécifiques.

(e) Rôle d'EZH2 dans le MM

Le rôle d'EZH2 dans la physiopathologie du MM a été suggéré il y a plus de 10 ans, et le nombre d'études sur son potentiel oncogène ne cesse d'augmenter. Un regain d'intérêt a été observé pour le ciblage thérapeutique d'EZH2 dans le MM depuis ces 5 dernières années avec l'arrivée d'inhibiteurs spécifiques utilisables en clinique.

EZH2 est significativement surexprimé dans les MM agressifs et les MGUS par rapport aux PCs normaux³¹⁵, en association avec la perte d'expression des gènes cibles de H3K27me3³¹⁶. Une forte expression d'EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans deux cohortes

indépendantes de patients au diagnostic. EZH2 est également plus fortement exprimé chez les patients de mauvais pronostic du sous-groupe PR, son expression étant significativement corrélée avec l'index de prolifération (PI) des cellules tumorales des patients³¹⁷. Aussi, les gènes associés à H3K27me3 uniquement dans les cellules tumorales comparés aux plasmocytes normaux, sont plus fortement réprimés chez les patients de stade plus avancé de la maladie et de mauvais pronostic³¹⁸. Croonquist et al. ont montré que l'expression d'*EZH2* est induite par l'IL6 dans les HMCLs ayant une dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, et est constitutive dans les lignées indépendantes à l'IL6. Aussi, la surexpression ectopique d'*EZH2* favoriserait l'indépendance des cellules de MM aux facteurs de croissances^{319,320}. Une étude montre, quant à elle, qu'*EZH2* est principalement surexprimé dans une sous-population de cellules de MM, caractérisée par leur capacité à exporter le colorant Hoechst, l'expression de CD138, une prolifération active et le potentiel d'induire une tumeur. Le bortezomib semble altérer significativement la prolifération de ces cellules en corrélation avec la diminution du niveau protéique d'*EZH2*³²¹.

EZH2, via son activité méthyltransférase, joue un rôle dans la régulation de la prolifération et la viabilité des cellules de MM. En effet, la déplétion d'*EZH2* par ARN interférence^{319,320} ou l'inhibition de son activité méthyltransférase avec des inhibiteurs chimiques spécifiques (EPZ-6438, UNC1999, GSK343, EPZ005687)^{317,318,322-324} et non spécifiques (Triptolide, DZNep)^{316,325-327} induit une diminution de la prolifération d'un sous-groupe de HMCLs et de MMCs de patients, les cellules s'accumulant en phase G0/G1 avant d'entrer en apoptose via un mécanisme partiellement caspase-dépendant. Cet effet est moindre lorsque *EZH2* est inhibé dans des cellules sanguines mononuclées de donneurs sains ou des cellules stromales de la moelle osseuse³¹⁷. De plus, l'inhibition d'*EZH2* dans des HMCLs, avant ou après xénotransplantation, sur des modèles murins, a permis de mettre en évidence l'effet anti-tumoral du traitement et le caractère oncogénique d'*EZH2* dépendant de son activité méthyltransférase^{319,320,322,324}. Comme décrit précédemment dans d'autres types de tumeurs, la perte globale de H3K27me3 est observée dès 3 jours de traitement, alors que l'effet de l'inhibition d'*EZH2* sur la croissance varie en fonction de l'inhibiteur, de la dose utilisée et de la durée de traitement^{317,318,322,323}. Il est important de noter que les données de certaines études ont été obtenues après utilisation de l'inhibiteur UNC1999, inhibant les enzymes *EZH2* et *EZH1*, et non *EZH2* uniquement. Cet inhibiteur semble avoir un effet à plus court terme sur les MMCs comparativement aux molécules inhibant spécifiquement *EZH2*. Ainsi, alors que l'inhibition d'*EZH1* ou *EZH2* seuls induit un arrêt du cycle cellulaire

et une apoptose tardive, l'inhibition des deux simultanément provoque une mort cellulaire plus rapide³²⁴.

L'analyse des profils d'expression des gènes cibles de l'inhibiteur d'EZH2 montre une variabilité de réponse en fonction des lignées traitées, indépendamment de l'effet sur leur prolifération. Par ailleurs, une majorité des gènes dérégulés est surexprimée, en accord avec le caractère répresseur de H3K27me3³²². EZH2 semble être responsable de la répression directe de gènes suppresseurs de tumeur et impliqués dans la différenciation, via H3K27me3, et dans l'activation indirecte d'oncogènes. En effet, l'équipe d'Helena Jernberg-Wiklund montre qu'un inhibiteur d'EZH2 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques (tels que ID1, ID2, SOX2, SORL1) et réprime l'expression d'oncogènes importants dans le myélome (tels que CD69, JUNB, XBP1, IRF4, BLIMP1 et c-Myc)^{318,323}. Ce même traitement diminue l'expression de miARNs ayant des rôles oncogéniques dans le MM, réprimant des gènes suppresseurs de tumeurs et favorisant l'angiogenèse : les clusters miR-17-92 et miR-106b-25 potentiellement régulés par c-Myc, et les membres de la famille Let7. Les oncogènes sous-exprimés après inhibition d'EZH2 sont, pour la plupart, des cibles de miARNs potentiellement suppresseurs de tumeur dans le MM, surexprimés après traitement par l'inhibiteur d'EZH2 et associés à H3K27me3 et EZH2 dans les HMCLs et les MMCs de patients. En effet, BLIMP1, IRF4 et XBP1 sont des cibles des miR-125a et miR-320c, alors que c-Myc est la cible du miR-494. De façon intéressante, les miR-198, miR-601, miR125a-3p et miR-320c ont été identifiés comme étant également réprimés par la méthylation de l'ADN dans le MM, et réactivés, après traitement, avec des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN^{323,328,329}. La coopération potentielle des deux marques répressives au niveau de suppresseurs de tumeurs pourrait être un moyen d'assurer une pression de sélection permettant une meilleure survie des cellules. Il serait intéressant d'étudier plus amplement ce mécanisme de « double répression », qui pourrait être impliqué dans d'autres cancers³²³. Une étude plus récente montre qu'EZH2 est capable de réprimer l'expression de gènes inhibiteurs du cycle tels que CDKN2B (p15) et CDKN1A (p21), soit via la surexpression de c-MYC ou directement via H3K27me3³¹⁷. Hernando et al., quant à eux, mettent en évidence la répression directe de gènes épithéliaux suppresseurs de tumeurs par EZH2. L'inhibition de l'enzyme résulte en une capacité d'adhésion accrue et un changement morphologique des cellules de MM³²². L'inhibition d'EZH2 pourrait également avoir un intérêt dans la régulation du microenvironnement des cellules de MM et l'amélioration des signes cliniques en lien avec la qualité de vie des patients atteints de MM. En effet, des lésions ostéolytiques caractérisent la maladie chez 80% des patients atteints de MM. Ce phénotype est dû à l'inhibition constante

de la différenciation ostéoblastique par les MMCs. L'absence de différenciation des ostéoblastes semble perdurer même après rémission, c'est-à-dire élimination complète des MMCs. Un article récent a démontré, chez les patients atteints de MM, la répression du gène *RUNX2* par le facteur de transcription *GFI1* en complexe avec *EZH2*, *HDAC1* et *LSD1* qui induirait une inhibition de la différenciation ostéoblastique³³⁰. L'inhibition d'*EZH2* ou de *HDAC1* permet la réexpression de *RUNX2*, et, de ce fait, l'induction de la différenciation normale des ostéoblastes³³⁰. *EZH2* est également impliqué dans la répression d'*IRF8*, un régulateur négatif de l'ostéoclastogénèse. *EZH2* favoriserait donc la différenciation des ostéoclastes³³¹. La surexpression d'*EZH2* dans les cellules du microenvironnement tumoral pourrait donc être impliquée dans le développement des lésions osseuses caractéristiques de la maladie³³¹. L'inhibition d'*EZH2* dans ce contexte pourrait permettre d'inhiber la dégradation tout en favorisant la reconstruction osseuse chez les patients atteints de MM (Figure 21).

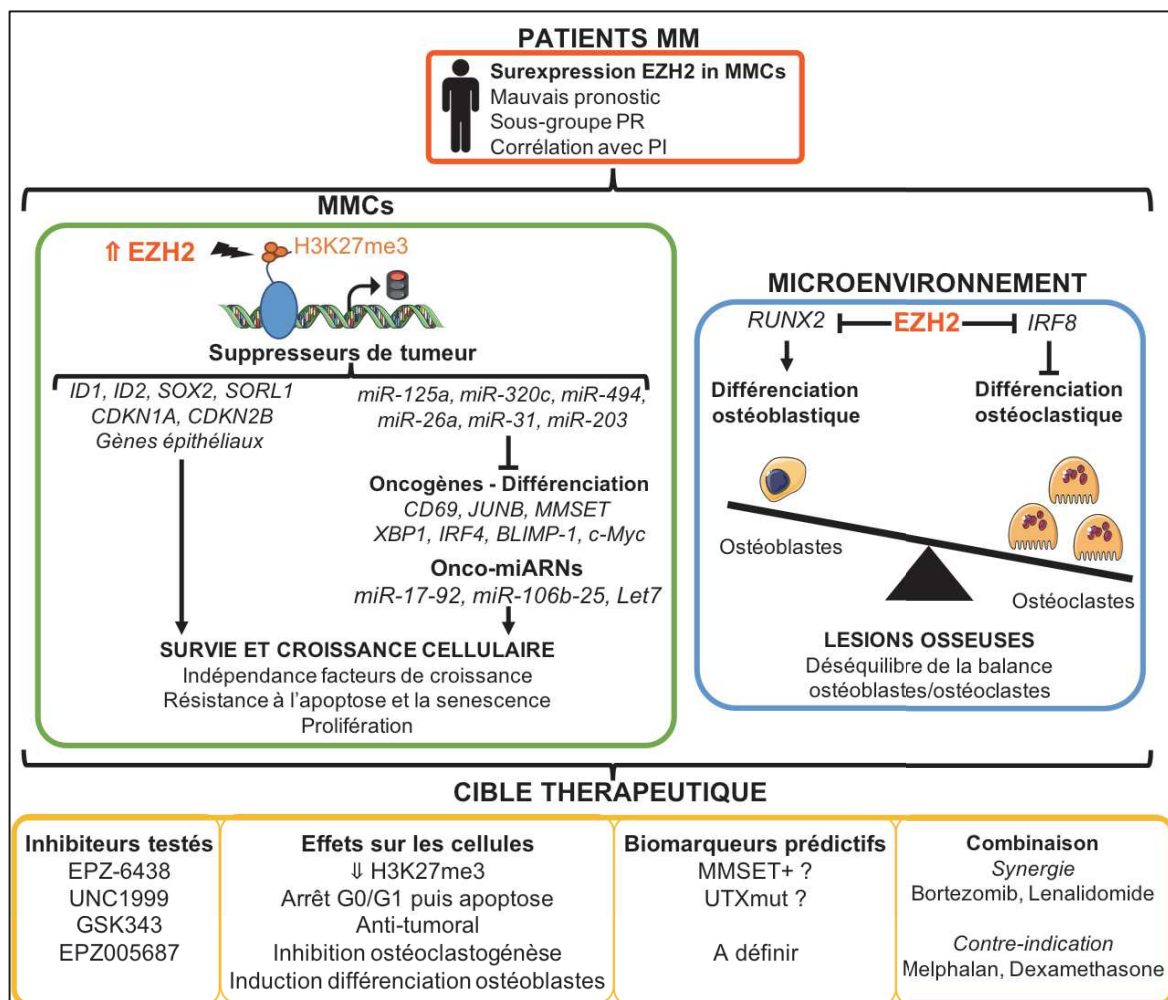


Figure 21 : EZH2 dans le Myélome Multiple – *EZH2* joue un rôle important dans la physiopathologie du MM en régulant la survie et la croissance cellulaire des cellules tumorales, et en modulant la balance ostéoblastes/ostéoclastes. L'inhibition d'*EZH2* représente une stratégie thérapeutique potentielle dans le MM, seul ou en combinaison avec des traitements conventionnels.

D. Interactions avec le microenvironnement

L'interaction entre les cellules tumorales et le microenvironnement médullaire est essentielle pour le développement, le traitement et la progression du MM. Plusieurs types cellulaires composent le microenvironnement : les cellules hématopoïétiques, dont les lymphocytes B, T natural killer et les ostéoclastes (résorption osseuse), ainsi que les cellules non-hématopoïétiques, dont les cellules stromales, les ostéoblastes (formation osseuse) et les cellules endothéliales. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs contribuant à la migration et la prolifération des cellules de MM. L'interaction des cellules de MM avec les cellules stromales, les ostéoclastes et les ostéoblastes participe au développement de lésions osseuses. En effet, ces dernières sont causées par une augmentation de l'activité et du nombre d'ostéoclastes et une diminution de l'activité et du nombre d'ostéoblastes. L'interaction des cellules de MM avec les cellules stromales de la MO est la cause de développement d'un type de résistance à certains traitements, appelé « résistance aux drogues par contacts cellulaires » (CAM-DR). Pour finir, les facteurs produits par le microenvironnement peuvent être associés à l'angiogenèse, dont l'augmentation est liée à un mauvais pronostic²⁶⁰.

E. Notre modèle d'étude : les lignées cellulaires de MM

L'utilisation de lignées cellulaires humaines de MM (HMCLs) permet l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la survie, la prolifération et la résistance au traitement des cellules de MM. De nombreuses lignées de myélome ont pu être développées, notamment dans le laboratoire de Jérôme Moreaux, à partir de cellules primaires de patients. Cependant, ayant été sélectionnées sur la capacité à proliférer *in vitro*, ces HMCLs sont plus proliférantes et agressives que les cellules primaires de patients. Néanmoins, la collection de HMCLs du laboratoire est représentative de l'hétérogénéité interindividuelle de la maladie, via leur profil d'expression et mutationnel²⁵³. Ces HMCLs peuvent donc être utilisées dans le cadre de tests de nouvelles drogues sur la survie et la prolifération des cellules, et de déterminer leur mécanisme d'action. Notre laboratoire a également mis au point un système de culture de cellules tumorales primaires de patients atteints de MM, en présence de leur microenvironnement tumoral et d'IL-6³³³. Ce modèle est notamment utilisé pour des tests de drogues potentiellement anti-myélomateuses. Les résultats de ce type d'étude, associés aux profils d'expression génique, mutationnel et clinique des patients, pourraient permettre de

mettre en place une approche thérapeutique personnalisée et ciblée chez les patients atteints de MM, au diagnostic ou à la rechute.

F. Traitement du MM

1) Agents thérapeutiques conventionnels et résistances

Le traitement conventionnel du MM repose sur l'utilisation et la combinaison de 4 types de molécules à propriétés différentes :

- les agents immunomodulateurs (ou IMiDs) : thalidomide, **lenalidomide**, pomalidomide
- les inhibiteurs de protéasome : **bortezomib**, carfilzomib, ixazomib
- les glucocorticoïdes : **dexaméthasone**, prednisone
- les agents alkylants : **melphalan**, cyclophosphamide, bendamustine

Je décrirai ici, de manière succincte, les mécanismes d'action de ces classes de molécules et présenterai les différentes stratégies de résistance mises en place par les cellules tumorales pour échapper à l'action des traitements.

Le lenalidomide est un analogue du thalidomide. Il est préconisé pour le traitement de plusieurs hémopathies, dont le MM. En combinaison avec d'autres agents, le lenalidomide a montré un réel bénéfice thérapeutique en cas de traitement de première ligne ou encore à la rechute. Les IMiDs ont des effets pléiotropes sur le microenvironnement tumoral et sur les cellules tumorales, dont certaines des bases mécanistiques ont récemment été dévoilées. Ces molécules sont, dans un premier temps, capables de moduler la production de cytokines sécrétées par des cellules immunitaires, d'où le nom qui leur a été attribué. Le lenalidomide module plusieurs éléments du système immunitaire adaptatif et inné. Il est capable de réprimer la prolifération des cellules Treg et de costimuler les lymphocytes Th1 pour induire la production de cytokines permettant d'améliorer la cytotoxicité des cellules NK. Le lenalidomide régule l'évasion des cellules tumorales en réprimant l'expression de PD-L1 sur les cellules de MM. L'inhibition, induite par le lenalidomide, de la production de cytokines pro-inflammatoire par les cellules mononuclées, réprime l'adhésion des cellules tumorales avec les cellules stromales de la MO ainsi que l'angiogenèse. Le lenalidomide inhibe

également l'ostéoclastogénèse dont la dérégulation est responsable des lésions osseuses dans le MM³³⁴.

Dans les cellules tumorales de MM, les IMiDs induisent un arrêt du cycle cellulaire via l'augmentation de l'expression du gène *CDKN1A*, codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, l'inhibition de l'expression d'*IRF4* et l'induction de l'apoptose³³⁵⁻³³⁷. Le complexe E3 ubiquitine ligase *CRL4^{CRBN}* utilise *CRBN* (ou céréblon) comme récepteur de substrats pour polyubiquityler et induire la dégradation par le protéasome de protéines spécifiques. Les IMiDs sont capables de lier *CRBN* et ainsi de moduler la spécificité de *CRL4^{CRBN}* pour son substrat. Via ce mécanisme, le lenalidomide induit ainsi la dégradation, entre autres, des facteurs de transcription *IKZF1* (Ikaros) et *IKZF3* (Aiolos) dans le MM. Cet événement conduit à la co-stimulation des lymphocytes T via l'induction de la transcription de l'*IL-2*, ainsi que la diminution de l'expression de *IRF4* (cible de *IRF4*) et de *MYC*, deux TFs dont la surexpression joue un rôle majeur dans la physiopathologie du MM^{335,338-340}. Une autre étude a montré que le lenalidomide inhibe la décomposition de H_2O_2 dans le MM en induisant la dégradation de la thioredoxine réductase dans les cellules exprimant *CRBN*, causant une accumulation de dimères de chaîne légère d'Ig, l'augmentation du stress de RE, et induisant ainsi l'apoptose via l'activation de *Bim*³⁴¹.

Certains patients possèdent une résistance innée ou développent d'une résistance au lenalidomide. Différents facteurs ont été décrits comme pouvant être responsables de ces résistances, notamment la perte de l'expression de *CRBN*³⁴², le stress oxydatif³⁴¹, et la perte de *CD138*³⁴³.

Bhutani et al. ont récemment développé un score basé sur l'expression de 14 gènes cibles des IMiDs, IMiD-14, permettant de prédire la sensibilité des patients atteints de MM au lenalidomide. En effet, un fort score IMiD-14 est associé à un mauvais pronostic dans plusieurs cohortes³⁴⁴. Une étude a également décrit 63 gènes dont la suppression permettrait d'augmenter la sensibilité au lenalidomide, dont le gène *RSK2*, impliqué dans la voie de signalisation *NF-κB*³⁴⁵.

Les PCs normaux, et encore plus les tumoraux, subissent un stress du RE due à une forte production et sécrétion d'Ig. L'activation du processus UPR permet de rectifier ce stress, et de rétablir une homéostasie correcte. Un stress trop important peut submerger la capacité corrective de l'UPR, entraînant ainsi l'apoptose des cellules de MM. En inhibant le protéasome 20S et en empêchant la dégradation des protéines mal repliées, les inhibiteurs du protéasome provoquent le stress du RE ainsi que l'apoptose induite par l'UPR. Ces molécules

sont également capables d'altérer le soutien de croissance du microenvironnement envers les cellules de MM. Le bortezomib est un inhibiteur du protéasome de première classe capable de se fixer de manière réversible à la sous-unité PSM β 5 de la chambre catalytique du protéasome 20S. L'arrivée du bortezomib dans le traitement du MM a été une avancée thérapeutique considérable, améliorant de manière significative la survie de nombreux patients. Cette molécule est désormais utilisée en première ligne de traitement en combinaison avec d'autres molécules. Cependant, certains patients présentent des résistances, innées ou acquises, dont les mécanismes commencent à être dévoilés. Des mutations de la sous-unité PSM β 5 au niveau de son site de fixation au bortezomib ont été décrites dans des lignées cellulaires de MM résistantes au bortezomib. Ce résultat n'a par ailleurs jamais été validé sur les patients ne répondant pas aux inhibiteurs du protéasome. Une surexpression de cette même protéine ainsi que d'autres sous-unités du protéasome ont été également associée à la résistance des cellules de MM au bortezomib. La résistance à l'apoptose, induite par une surexpression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, ainsi que l'autophagie observée dans toutes les cellules de MM est particulièrement augmentée dans les cellules résistantes au bortezomib. Une augmentation de l'activité d'efflux des drogues, une induction de la réponse anti-oxydative, l'altération de l'interaction avec le microenvironnement, la perte de maturité des PC tumoraux (perte de XBP1), l'induction de voies de signalisation favorisant la survie, ainsi que l'augmentation de l'autophagie sont également des mécanismes impliqués dans la résistance des cellules de MM au bortezomib^{346,347}.

La dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, est utilisée, principalement en combinaison, en première ligne de traitement ainsi qu'à la rechute chez les patients atteints de MM. Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes capables de se fixer sur le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes GR dans le cytoplasme. La fixation de l'hormone sur son récepteur induit principalement la translocation de GR dans le noyau et ainsi la régulation de ses gènes cibles, ainsi qu'une action non-génomique moins décrite. Le traitement de cellules de MM par la dexaméthasone entraîne une surexpression de facteurs pro-apoptotiques et une baisse d'expression de protéines anti-apoptotique, induisant ainsi de la mort cellulaire par apoptose des cellules tumorales. En monothérapie, seule la moitié des patients répondent à la dexaméthasone. De plus, la sous-expression de GR limite l'apoptose induite par la dexaméthasone, et confère aux cellules de MM une résistance à ce type de molécules. Aussi, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 participe à la résistance des cellules de MM à la dexaméthasone^{348,349}. Les cellules du microenvironnement tumoral participent

également au développement de la résistance des cellules tumorales. En effet, la sécrétion de BAFF et APRIL par les cellules du microenvironnement induit l'expression de protéines anti-apoptotiques dans les cellules de MM, les protégeant ainsi de l'apoptose induite par la dexaméthasone³⁵⁰.

Le melphalan est un agent alkylant exerçant un effet intracellulaire cytotoxique via la formation de liaisons covalentes stables dans et entre les brins d'ADN (ICLs : interstrand crosslink), et entre ADN et protéines, par alkylation. Cette « fixation » entraîne des délétions de bases, des cassures double-brins et la formation de structures secondaires de l'ADN, interférant ainsi avec la réplication de l'ADN et la transcription. L'effet du melphalan n'est pas dépendant du cycle cellulaire. L'absence de réparation des dommages créés entraîne la mort cellulaire des cellules tumorales. Un mécanisme de résistance aux agents alkylants est la capacité des cellules de MM à exporter la molécule via la surexpression de protéines membranaires d'efflux. Les cellules tumorales sont également capables d'exciser les adduits et les ICLs induits par le melphalan en utilisant différentes voies de réparation de l'ADN (voie de l'anémie de Fanconi (FANC), recombinaison homologue (HR), réparation par excision de base ou de nucléotide (BER, NER), jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ))³⁵¹. L'existence de polymorphismes, ou des changements d'activité ou d'expression de gènes impliqués dans ces voies pourraient activer et faciliter la réparation des lésions de l'ADN favorisant ainsi la survie cellulaire et la résistance au melphalan. L'autophagie, activée après induction de dommages à l'ADN par le melphalan, pourrait avoir un effet protecteur via une plus forte production d'ATP³⁵¹⁻³⁵⁶. La perte d'expression du suppresseur de tumeur p53 altère également la sensibilité des cellules de MM au melphalan³⁵⁷. De plus, une évolution du métabolisme vers la glycolyse aérobie et une augmentation de la réponse au stress oxydatif a également été associée à la résistance acquise des cellules de MM au melphalan³⁵⁸. Aussi, notre laboratoire a récemment mis en évidence le rôle de RECQ1 dans la résistance des cellules au melphalan³⁵⁹. Pour finir, l'adhésion des cellules de MM leur confère une forme de résistance *de novo* en les protégeant transitoirement contre les dommages cytotoxiques induit par le melphalan et leur permettant d'acquérir d'autres mécanismes plus permanents de résistance aux agents alkylants³⁶⁰.

2) Prise en charge des patients et stratégies thérapeutiques

Les progrès récents ont permis de démontrer que le MM constitue un groupe de maladies très hétérogènes en termes d'anomalies génétiques, présentation clinique, et de réponse au traitement. En se basant sur différents facteurs biologiques (âge, taux de protéine C-réactive, de créatinine, d'hémoglobine, de calcium, de lactate déshydrogénase dans le sérum) et/ou les anomalies cytogénétiques, différents systèmes de stratification capables de classer les patients dans différentes catégories de risques ont été développés, et sont résumés dans le Tableau ci-dessous, issus de la revue S.K. Kumar et S.V. Rajkumar de 2018 dans *Clinical Oncology*²⁵⁹.

| Staging system | Variables | Stages |
|--|---|--|
| International Staging System (ISS) ⁵⁶ | Serum albumin and β_2m levels | <ul style="list-style-type: none"> • I: serum albumin ≥ 3.5 g/dl and $\beta_2m < 3.5$ mg/dl • II: neither stage I nor III • III: $\beta_2m > 5.5$ mg/dl |
| Revised International Staging System (RISS) ⁸ | Serum albumin, β_2m , and LDH levels, and plasma cell FISH | <ul style="list-style-type: none"> • I: ISS stage I, LDH normal^a, and standard-risk disease according to FISH • II: neither stage I nor stage III • III: ISS stage III plus abnormal LDH or high-risk disease according to FISH (del 17p and/or t(4;14) or t(14;16)) |
| International Myeloma Working Group (IMWG) risk staging ⁵ | Serum albumin, β_2m , and LDH levels, and plasma cell FISH | <ul style="list-style-type: none"> • Low risk: ISS stage I or II, absence of t(4;14), del 17p13 and del 1q21, and < 55 years of age • Standard risk: all others • High risk: ISS stage II or III and either t(4;14) or del 17p13 |
| mSMART risk staging ⁴¹ | Serum albumin, β_2m and LDH levels, plasma cell FISH, and proliferation index | <ul style="list-style-type: none"> • Standard risk: trisomies and/or t(11;14) • Intermediate risk: t(4;14) or 1q amplification • High risk: t(14;16), t(14;20), or del 17p |
| Gene-expression-based signatures ^{59,118-120} | <ul style="list-style-type: none"> • UAMS • Skyline 92-HOVON • IFM | Presence of alterations detected by each signature |

β_2m , β_2 -microglobulin; del, deletion of; FISH, fluorescence in situ hybridization; IFM, Intergroupe Français du Myélome; LDH, lactate dehydrogenase; MM, multiple myeloma; UAMS, University of Arkansas for Medical Sciences.^aWithin the expected physiological range.

En se basant sur ces classifications, ainsi que différents facteurs intrinsèques aux patients, il est possible proposer des lignes de traitement plus individualisées qu'auparavant³⁶¹. Les recommandations pour les patients atteints de MGUS et de SMM sont un suivi et une surveillance clinique sur le long terme, sans préconisation de traitement. Par ailleurs, un essai clinique récent a mis en évidence un certain bénéfice lorsque les patients atteints de SMM de haut risque étaient traités pour diminuer la progression vers un MM symptomatique³⁶¹.

Pour les patients nouvellement diagnostiqués, la thérapie initiale se divise en trois phases :

- Thérapie d'induction VRd : bortezomib, lenalidomide et dexametasone

- Transplantation de cellules souches autologues (ASCT) chez les patients éligibles (âge <70ans et ne présentant pas de comorbidités)
- Thérapie de maintenance : lenalidomide et/ou bortezomib en fonction des facteurs de risques épigénétiques

Le schéma ci-dessous présente la stratégie thérapeutique préconisée en fonction du système de stratification mSMART (Figure 22)^{259,361}.

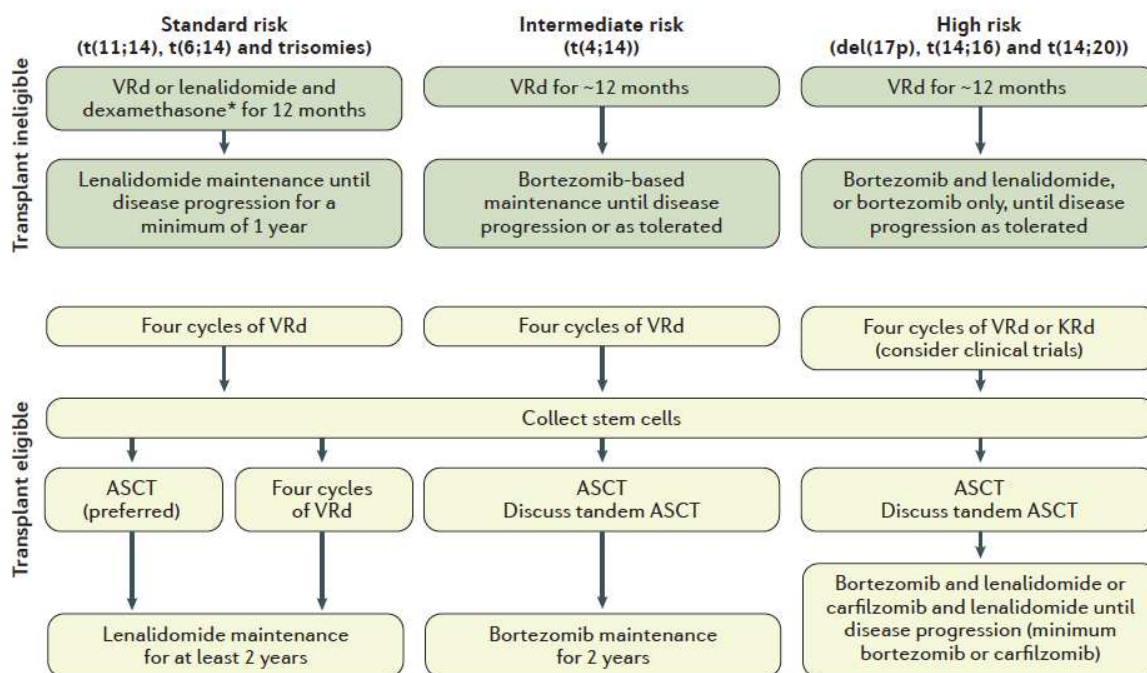


Figure 22 : Schéma issu de la revue de S.K Kumar, V. Rajkumar, R.A. Kyle, M. van Duin, P. Sonneveld, M-V. Mateos, F. Gay et K.C. Anderson de 2017 dans le journal Disease Primers, présentant les stratégies thérapeutiques proposées à partir du classement mSMART des patients atteints de MM²⁶⁰ – Les patients sont stratifiés en 3 groupes de risque déterminés à partir des aberrations chromosomiques des cellules tumorales. L'éligibilité des patients pour une transplantation de cellules souches est déterminée, puis différentes stratégies de traitement sont proposées.

A la rechute, le choix de thérapie est basé sur plusieurs facteurs, dont les effets secondaires et la réponse aux précédents traitements, l'agressivité de la rechute, le nombre de rechute, le temps de rémission, l'état général du patient... Différentes combinaisons des molécules utilisées en premières lignes peuvent alors être proposées. En revanche, comme il a été précisé précédemment, les patients atteints de MM développent des résistances aux thérapies conventionnelles. L'utilisation de nouvelles molécules approuvées par les agences du médicament ou en phase de validation clinique, telles que le daratumumab (anticorps monoclonal anti-CD38), l'elotuzumab (anticorps monoclonal anti-CS1), le carfilzomib ou

l'ixazomib (inhibiteurs du protéasome orale), le panobinostat (inhibiteur de HDAC) ou encore l'utilisation de CAR-T cells présentent un intérêt pour améliorer la prise en charge thérapeutique. La participation à un essai clinique testant de nouvelles molécules et/ou combinaisons de traitement peut également être conseillée aux patients^{259,361}.

3) Nouvelles approches thérapeutiques, validées ou en essais cliniques

(a) Immunothérapie et anticorps monoclonaux

Plusieurs stratégies thérapeutiques mettant en jeu des anticorps monoclonaux (mAbs) ainsi que l'amplification de la réponse immunitaire anti-tumorale voient le jour dans le MM.

Notamment, des anticorps monoclonaux ciblant SLAMF7 et CD38, des protéines membranaires exprimées sur les cellules de MM, montrent des résultats encourageant dans des essais pré-cliniques et cliniques. Ces anticorps monoclonaux reconnaissent l'antigène sur les cellules tumorales, et peuvent inhiber directement l'activité fonctionnelle de la molécule. De plus, la fixation des anticorps peut induire la mort cellulaire via l'activation du complément (CDC). L'anticorps fixé peut également être reconnu par des cellules immunitaires et induire une lyse médiée par les lymphocytes T natural killer (ADCC), ou la phagocytose par les macrophages (ADCP). Cette thérapie ciblée spécifiquement contre les cellules tumorales est considérée comme étant moins toxique que les chimiothérapies conventionnelles. SLAMF7 est une protéine fortement exprimée à la surface des plasmocytes normaux et tumoraux, ainsi que sur d'autres lymphocytes tels que les natural killer. Elle joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, l'adhésion cellulaire et la survie des cellules de MM. L'elotuzumab est un mAb humanisé dirigé contre SLAMF7. Il induit la mort cellulaire des cellules de MM via l'ADCC, l'inhibition des interactions entre les cellules tumorales et stromales, et augmente l'activité des lymphocytes T natural killer. Des essais cliniques ont montré que l'utilisation de l'elotuzumab en monothérapie n'est efficace que chez les patients atteints de SMM de haut risque, et retarderait l'apparition du MM. L'utilisation en essai clinique de différentes combinaisons en première ligne de traitement, chez des patients atteints de SMM ou chez des patients en rechute ou réfractaires aux autres agents thérapeutiques, est tolérée et montre des résultats encourageants quant à la survie des patients³⁶²⁻³⁶⁶.

CD38 est une glycoprotéine membranaire fortement exprimée dans les cellules de MM, et de façon moindre dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes saines. CD38 agit comme

un récepteur pour les signaux de prolifération, comme une ecto-enzyme dans le catabolisme extracellulaire des nucléotides, et est impliquée dans l'induction de la signalisation cellulaire et l'adhésion. Le daratumumab est le premier mAb humain anti-CD38 recevant l'accréditation pour être utilisé en thérapie dans le MM. Le daratumumab agit contre les cellules de MM via les mécanismes de CDC, ADCP et en inhibant l'activité de CD38. Cet mAb anti-CD38 améliore la survie des patients à la rechute ou réfractaires à d'autres molécules, en monothérapie et en combinaison. L'utilisation du daratumumab en monothérapie chez les patients atteints de SMM de haut risque retarde significativement l'apparition du MM. Aussi, un nouvel essai thérapeutique propose l'utilisation de cet mAb en combinaison avec des molécules de chimiothérapie conventionnelles³⁶²⁻³⁶⁶.

Dans des conditions normales, les lymphocytes T expriment des récepteurs inhibiteurs, tels que CTLA-4, PD-1 ou CD28, permettant d'assurer le maintien de la tolérance immune et la protection des tissus contre une réponse anormale des lymphocytes T. Les cellules de MM expriment les ligands de ces récepteurs, et échappent ainsi à la réponse immunitaire anti-tumorale. Les anticorps anti-CTLA4, ipilimumab et tremelimumab, empêchent la fixation du récepteur à la molécule B7 sur les cellules tumorales, et favorisent ainsi l'activation des lymphocytes T grâce à la stimulation induite par l'interaction entre CD28 et B7. Ces anticorps ne présentent aucune réponse en monothérapie, cependant des essais cliniques ont été mis en place pour leur utilisation en combinaison avec d'autres molécules thérapeutiques ou associés à la transplantation de cellules souches hématopoïétique.

PD-1 inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T, via son interaction avec son ligand PD-L1 présent sur les cellules normales, et surexprimé par les cellules de MM comme stratégie d'évasion de la réponse immunitaire. Le nivolumab et le pembrolizumab, des mAb anti-PD-1, présentent une efficacité significative dans la stabilisation de la maladie en monothérapie, et améliore la survie des patients en combinaison. En revanche, l'innocuité de ces inhibiteurs du checkpoint immunitaire a été remise en question face à la mort de patients traités avec ces molécules, et de plus amples études doivent être faites afin d'évaluer leurs risques et bénéfices thérapeutiques^{367,368}.

L'utilisation d'anticorps couplés à des drogues (ADC) constitue une autre stratégie thérapeutique ciblée prometteuse. Ces ADCs associent le ciblage des cellules cancéreuses et la distribution de molécules chimiothérapeutiques cytotoxiques directement dans la tumeur.

Cette approche ne dépend pas de la fonction immunitaire des patients, largement compromise. Actuellement, des ADCs ciblant les molécules CD138 ou BCMA, exprimées sur les cellules tumorales de MM, sont le plus majoritairement développés. Un essai clinique de phase II/Iia a montré que l'utilisation en monothérapie de l'ADC anti-CD138 indatuximab ravtansine présente peu d'effets secondaires et améliore le pronostic des patients. Cette molécule est actuellement en essai clinique en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques. L'ADC anti-BCMA GSK2857916 améliore la réponse de patients en rechute ou réfractaires. D'autres ADCs ciblant CD46 et FcRL5 présentent également une activité préclinique prometteuse^{367,368}.

Par ailleurs, la vaccination dans le cancer permet de rééduquer l'immunité de l'hôte à reconnaître les cellules tumorales comme étant étrangères, augmenter le nombre de lymphocytes ciblant la tumeur, et générer une mémoire immunitaire sur le long terme permettant d'éviter la récurrence ou la rechute de la pathologie. Les vaccins à base de peptides pour le MM, souvent des antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses, entraîne une réponse immunitaire, mais leur efficacité clinique est incertaine, potentiellement à cause de la perte d'expression des antigènes cibles sur les cellules tumorales. Une stratégie est de diversifier les vaccins en utilisant plusieurs peptides. L'utilisation d'un vaccin multi-épitope (XBP1, CD138 et SLAMF7) *in vitro* entraîne l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et la mort ciblée des cellules de MM. En essai clinique chez des patients atteints de SMM, ce vaccin déclenche la réponse immunitaire, et prévient ou retarde la progression de la SMM en maladie active³⁶⁹. Une autre stratégie de vaccination dans le MM implique la génération *ex-vivo*, à partir de monocytes prélevés chez le patient, de cellules dendritiques actives présentatrices d'antigène, qui seront ensuite réinjectées chez le patient afin de surmonter les déficiences intrinsèques en population de cellules dendritiques. Des études ont montré que la fusion de cellules autologues dendritiques générées *in-vitro* avec des cellules de MM patient permet à la cellule hybride générée de présenter les antigènes tumoraux, spécifique du patient, aux lymphocytes T CD8 et CD4. Cette nouvelle approche, a montré des résultats encourageants en essai clinique : innocuité, expansion des lymphocytes T ciblant les cellules de MM, stabilisation de la maladie, réponses partielles et complètes. Des essais de combinaison avec d'autres types de traitements sont actuellement en cours³⁶⁹.

La dernière tentative de rediriger et réactiver le système immunitaire du patient contre les cellules tumorales est l'utilisation de cellules CAR-T cells ou cellules T porteuses d'un

récepteur chimérique dirigé contre la tumeur. Ces cellules sont des lymphocytes T génétiquement modifiés, exprimant un récepteur synthétique capable de reconnaître un antigène à la surface des cellules de MM. Cette interaction est capable d'activer le lymphocyte T, et l'attaque de la cellule tumorale via la voie de signalisation FAS/FAS-L et/ou la sécrétion de granzyme. Plusieurs cibles ont été testées en essai clinique : BCMA, CD19 et CD138. Des essais cliniques utilisant des CAR ciblant BCMA et CD19 ont montré des résultats encourageants en termes d'innocuité et d'efficacité. Les CAR T cells ciblant CD138 ont permis de stabiliser la maladie de plusieurs patients dans un essai clinique, sans toxicité majeure. En revanche, la protéine CD138 peut parfois être perdue dans les cellules de MM, remettant en question l'intérêt d'utilisation de cette stratégie sur le long terme^{367,368}. D'autres cibles de CAR sont actuellement testées dans des modèles précliniques, notamment CD38 et CD44v6. Un inconvénient à considérer, dans l'utilisation de CAR T cells, est le ciblage de cellules non-tumorales exprimant aussi l'antigène. Pour plus de sécurité, de nouvelles stratégies utilisant des marqueurs de déplétion ou des gènes suicides (caspase inductible capable d'induire l'apoptose des CAR T cells quand elle est activée) ont été développées et leurs efficacités ont été confirmées dans des modèles précliniques^{367,368}.

(b) Thérapies ciblées

De nombreux inhibiteurs du protéasome de nouvelle génération ont été développés (ixazomib, carfilzomib, oprozomib, marizomib,...) et sont actuellement testés, seul ou en combinaison, dans des essais cliniques. L'utilisation de ces inhibiteurs permet notamment de surmonter la résistance des cellules de MM aux inhibiteurs du protéasome de première génération, et de proposer une prise orale de ce type de molécule pour une amélioration de la qualité de vie du patient.

L'interaction des cellules de MM avec les cellules stromales de la MO induit l'activation de différentes voies de signalisation, favorisant la prolifération, la survie, la résistance et la migration des cellules de MM. Plusieurs nouvelles drogues, interférant avec ces processus, sont actuellement investiguées dans des essais cliniques et montrent des réponses encourageantes en monothérapies et/ou en combinaison, comme par exemple des inhibiteurs de RAF (sorafenib), de BRAF (vemurafenib), de protéines kinesi du fuseau (filanesib), d'AKT (perifosib, afuresertib), de BCL-2 (venetoclax), d'héparanase (roneparstat), de CDK (dinaciclib), de MEK1/2 (trametinib) et de XPO-1 (export nucléaire ; selinexor)³⁷⁰⁻³⁷³.

(c) Molécules ciblant des enzymes épigénétiques ou Epi-drogues

Comme nous l'avons détaillé précédemment, de nombreuses aberrations épigénétiques ont été décrites dans le MM et participent à la prolifération, la survie et la résistance aux traitements des cellules tumorales. Aussi, contrairement aux altérations affectant le génome, les dérégulations de l'épigénome peuvent être réversées grâce à l'utilisation de molécules inhibant de manière spécifique l'activité d'enzymes épigénétiques : les épi-drogues. Ainsi, différentes épi-drogues ciblant des enzymes anormalement dérégulées dans le MM présentent des résultats précliniques encourageants et sont, pour la plupart, actuellement testées dans des essais cliniques, seules ou en combinaison. En revanche, tous les patients ne tirent pas les mêmes bénéfices des traitements ciblant l'épigénome et les réponses ne sont souvent visibles qu'après plusieurs mois de traitement. L'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux épi-drogues présente un intérêt important. En effet, les patients ayant peu de chance de répondre à une épi-drogue pourraient éviter un traitement de longue durée avec une molécule inefficace ayant des effets secondaires contraignants, et pourraient de ce fait se voir offrir des stratégies thérapeutiques alternatives.

Les inhibiteurs de protéines à bromodomaines en clinique dans le MM

L'expression de nombreux oncogènes impliqués dans la physiopathologie du MM est régulée par des superenhancers associés à la fixation de protéines à bromodomaine BET sur la marque histone H3K27ac. L'utilisation d'inhibiteurs de protéines à bromodomaines (BETi) permet la répression de la surexpression d'oncogènes dans le MM, et ainsi la diminution de la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules tumorales. Au niveau préclinique, les BETi présentent une activité en monothérapie, mais agissent en synergie avec le lenalidomide, le bortezomib et la dexaméthasone. A l'heure actuelle, 7 études cliniques utilisent des BETi (CPI0610, BAY1238097, RO6870810, GSK525762, INCB054329, INCB057643), seuls ou en combinaison, dans le MM. Alors que 5 études sont en cours et n'ont pas encore publié de résultats préliminaires, une étude utilisant l'inhibiteur BAY1238097 a dû prendre fin de manière précoce, à la suite d'une toxicité trop importante de la molécule chez les patients. En revanche, la molécule BETi INCB054329 utilisée en monothérapie a été tolérée par les patients présentant des tumeurs solides et des hémopathies. Les résultats concernant les éventuels progrès sur la survie des patients n'ont pas été publiés à ce jour^{304,371}.

Les inhibiteurs d'histone déacétylases en clinique dans le MM

Du fait de la dérégulation de leur expression, les HDACs représentent une cible thérapeutique intéressante dans le MM. Les inhibiteurs d'HDACs (HDACi) agissent via la dérégulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et de protéines oncogéniques, ainsi que via le blocage la voie de l'aggrésome, une voie alternative de la dégradation des protéines. De ce fait, ils induisent un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales de MM. A ce jour, 71 essais cliniques testant différents HDACi chez des patients atteints de MM, seuls ou en combinaison, sont en cours ou en phase terminale. Alors que le panobinostat et vorinostat ne présentent pas de bénéfice clinique en monothérapie, le traitement de patients atteints de MM (réfractaires ou en rechute) avec l'un de ces HDACi en combinaison avec du bortezomib et de la dexaméthasone est toléré par les patients, améliore de manière significative leur survie et a été validé par les agences du médicament (américaine et européenne). En revanche, l'utilisation de HDACi provoque des effets secondaires altérants considérablement la qualité de vie des patients atteints de MM. De plus, cette stratégie thérapeutique n'est seulement efficace que pour un sous-groupe de patients. Notre laboratoire a de ce fait mis au point un score prédictif de la réponse aux HDACi dans le MM, basé sur l'expression de gènes, qui est actuellement testé chez des patients, en rechute ou réfractaires aux agents thérapeutiques conventionnels, recevant une combinaison de panobinostat et de bortezomib (NCT03515915)^{304,371,374,375}.

Les inhibiteurs de DNA méthyltransférases en clinique dans le MM

Des inhibiteurs de DNMTs (DNMTi), dont la 5-azacytidine et la décitabine, sont actuellement utilisés dans des essais cliniques chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique et de leucémie myéloïde aigue, et présentent un réel avantage pour la survie des patients. Malgré l'efficacité des DNMTi dans des modèles précliniques de MM, les essais cliniques ayant utilisés ce type de molécules en monothérapie, se sont avérés peu concluant. La combinaison de DNMTi avec des traitements conventionnels n'a pas été testée en clinique et pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante. Un score capable de prédire la réponse des patients aux DNMTi a également été développé par notre laboratoire, permettant de proposer une prise en charge thérapeutique personnalisée^{304,374,376,377}.

Les inhibiteurs d'EZH2 en préclinique et clinique dans le MM

La surexpression d'EZH2 dans le MM, ainsi que les effets observés après inhibition dans des modèles précliniques, fait de cette enzyme épigénétique une cible thérapeutique intéressante dans cette pathologie. De nombreux essais cliniques dans le lymphome ainsi que d'autres tumeurs solides ont révélé l'innocuité et l'efficacité du tazemetostat, un inhibiteur d'EZH2. En revanche, une étude clinique récente utilisant la molécule GSK2816126 en monothérapie dans différents types de cancers, dont le MM, a été stoppée face à une efficacité insuffisante de la molécule^{304,371}.

La sensibilité des HMCLs et MMCs de patients aux inhibiteurs d'EZH2 est hétérogène^{318,322}. La réponse ne semble pas être corrélée au temps de doublement des cellules, ni au niveau basale protéique de EZH2 ou H3K27me3³¹⁷, ni à la perte de H3K27me3 après inhibition de l'enzyme³²². La balance entre les différentes marques d'histones permet une régulation fine de l'expression des gènes et est indispensable au maintien de l'homéostasie des cellules saines. Un déséquilibre peut induire ou participer au développement tumoral et contribuer au maintien du phénotype malin. La corrélation entre l'expression d'EZH2 et celle de la méthyltransférase MMSET est présente dans de nombreux cancers³⁷⁸. EZH2 est capable de réprimer différents miARNs ciblant MMSET (miR-26a, miR-31 and miR-203), promouvant ainsi le développement tumoral³⁷⁸. Dans le MM, la surexpression de MMSET dans le sous-groupe moléculaire t(4 ;14) induit une perte globale de H3K27me3, une augmentation du recrutement d'EZH2 et H3K27me3 au niveau de certains loci, et une sensibilité accrue aux inhibiteurs d'EZH2³⁷⁹. Ces résultats suggèrent que la répression de ces gènes par EZH2 dans ce contexte précis est important dans la physiopathologie du MM³⁷⁹, et que la sensibilité aux inhibiteurs d'EZH2 dépend fortement de l'expression de MMSET. La délétion ou mutation d'UTX, enzyme responsable de la déméthylation de H3K27, promeut la prolifération, la clonogénicité, l'adhésion et la capacité à former de nouvelles tumeurs des cellules de MM. Une étude récente a montré que la perte d'UTX confère une sensibilité accrue des cellules de MM aux inhibiteurs d'EZH2 in vitro et in vivo³¹². L'inhibition d'EZH2 dans ce contexte induit l'expression de BCL6, menant à la diminution de l'expression d'IRF4 et c-MYC, deux facteurs de transcription indispensables à la survie et la prolifération des cellules tumorales de MM³¹². Malgré la plausibilité des résultats présentés, ces deux études se basent seulement sur la comparaison de deux lignées de MM. Deux études récentes n'observent cependant aucune corrélation entre la sensibilité des HMCLs et MMCs de patients, à l'inhibiteur d'EZH2, et les statuts d'UTX ou de MMSET³¹⁷. **L'inhibition d'EZH2 étant une approche thérapeutique efficace pour un sous-groupe de patients de mauvais pronostic. Mon second projet a été**

de développer un biomarqueur permettant de prédire, avant traitement, la sensibilité des patients aux inhibiteurs d'EZH2.

L'utilisation en clinique d'inhibiteurs d'EZH2 dans le MM ne pourra cependant se faire qu'en association avec les agents thérapeutiques conventionnels. Il est donc important d'évaluer le rationnel biologique des combinaisons sur la survie des cellules tumorales. Une étude récente révèle une synergie entre le bortezomib et un inhibiteur d'EZH2 et EZH1. Les auteurs démontrent que le bortezomib induit la perte du recrutement d'E2F1 au niveau du promoteur d'*EZH2*, provoquant ainsi une diminution de son expression. De façon intéressante, le bortezomib n'affecte pas le niveau protéique de EZH1 et H3K27me3, et la répression d'*EZH2* n'a pas lieu dans les cellules résistantes au bortezomib. Aussi, une forte expression d'*EZH2* participerait à la résistance des cellules de MM au bortezomib. En accord avec cette affirmation, le bortezomib semble moins efficace chez les patients ayant une plus forte expression d'*EZH2*. L'inhibition d'EZH2 et EZH1 agit en synergie avec le bortezomib ou le carfilzomib sur des HMCLs, des MMCs de patients (avec un effet moindre sur les cellules de donneurs sains), et sur un modèle murin de xénogreffe. L'inhibition d'EZH2 et EZH1 permet également de surmonter la résistance des cellules résistantes au bortezomib. Cette re-sensibilisation est moins importante si seulement EZH2 est inhibé. Rizq et al. proposent pour finir que les deux molécules agiraient en coopération pour réprimer l'oncogène majeur du MM, c-MYC³²⁴.

Dimopoulos et al. ont, quant à eux, montré une synergie entre le lenalidomide, un inhibiteur d'EZH2 et un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, ainsi qu'une re-sensibilisation des cellules résistantes au lenalidomide. Les auteurs ont observé une répression globale des gènes et une compaction globale de la chromatine dans les cellules résistantes au lenalidomide comparé aux cellules sensibles. Le traitement des cellules présentant une résistance, intrinsèque comme acquise, avec un inhibiteur d'EZH2 et/ou un inhibiteur de la méthylation de l'ADN restaure le paysage épigénétique des HMCLs ainsi que leur sensibilité aux IMiDs³⁸⁰. **EZH2 étant capable de réguler l'expression de gènes, il serait intéressant de déterminer et de comprendre, par quels mécanismes, l'inhibition de cette enzyme affecte la réponse des cellules de MM au IMiDs. Mes travaux de thèse ont eu notamment pour but de répondre à cette question.** Dans ces études, les inhibiteurs épigénétiques sont administrés en prétraitement, quelques jours avant le traitement conventionnel, suggérant la nécessité d'un remaniement épigénétique pour que la synergie avec les agents conventionnels puisse avoir lieu.

Une autre étude présente néanmoins une potentielle contre-indication concernant une combinaison d'inhibiteurs d'EZH2 avec la dexaméthasone, la doxorubicine, le 4-hydroxycyclophosphamide et le melphalan. En effet, il semblerait que l'inactivation de l'activité méthyltransférase d'EZH2 via sa phosphorylation sur la sérine S21 est un processus intervenant dans la résistance aux drogues par contact cellulaire (CAM-DR) dans le MM. Ainsi, dans ce contexte, l'inhibition d'EZH2 mime ce type de résistance, et a un effet antagoniste en association avec différentes drogues conventionnelles du MM citées précédemment. La sensibilité des cellules devenues résistantes peut être rétablie via l'inhibition de la kinase responsable de la phosphorylation d'EZH2³⁸¹. Il est important de noter que le modèle utilisé dans cette étude est un modèle *in vitro* mimant l'adhésion cellulaire, et utilisant seulement deux HMCLs. Il serait donc nécessaire de confirmer ces résultats sur des cellules primaires de patients (Figure 21)³⁸¹.

Bien que de nombreux progrès thérapeutiques aient été faits depuis ces 20 dernières années, laissant place à de nouveaux traitements et stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la survie, la qualité de vie et le suivi des patients, le MM demeure une maladie sans traitement définitif dans la majorité des cas (Figure 23). De plus amples études sont nécessaires afin de pouvoir proposer des traitements induisant une rémission complète des patients ainsi que des stratégies thérapeutiques encore plus ciblées et personnalisées, utilisant les données récentes d'expression génique et mutations des cellules tumorales, tout en prenant en compte l'hétérogénéité clonale des tumeurs. De plus, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de résistance mis en place par les cellules de MM afin de pouvoir les prévenir ou les contrecarrer via l'utilisation de différentes combinaisons de molécules thérapeutiques.

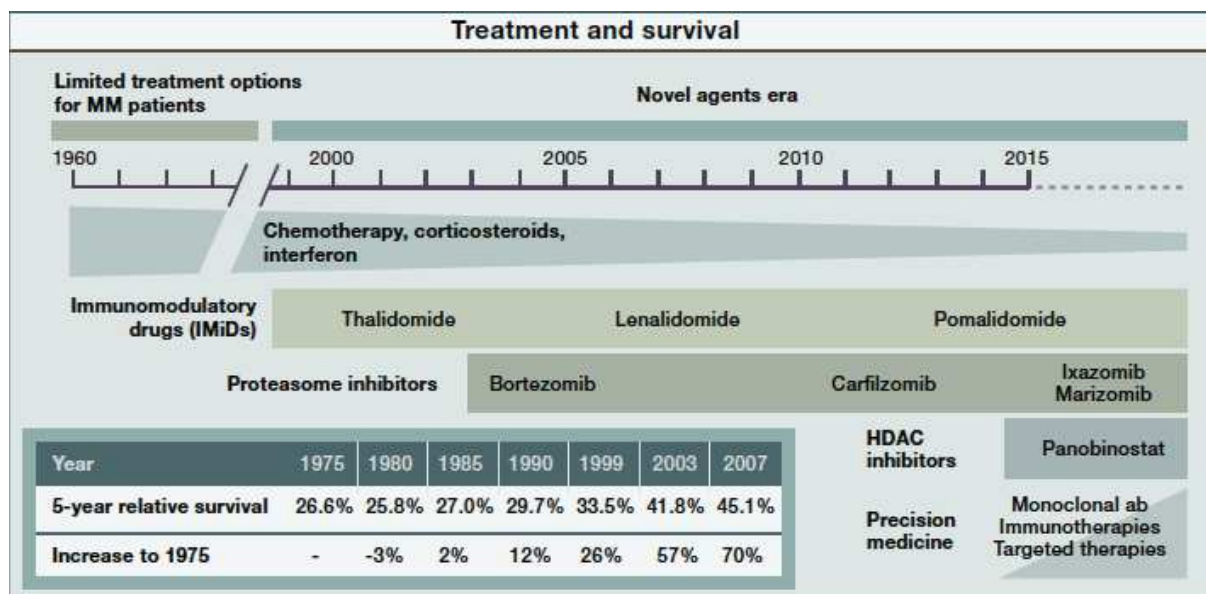


Figure 23 : Traitement et survie du MM issu du SnapShot de la revue Cell « Multiple Myeloma » par E. Braggio, K.M. Kortüm et A.K. Stewart²⁵⁸ – Le schéma représente les molécules thérapeutiques proposées aux patients atteints de MM au cours du temps (de 1960 à 2015 et au-delà), ainsi que l'évolution du pronostic de survie des patients, de 1975 à 2007.

Revue bibliographique

I. Revue 1 : Role of EZH2 in normal hematopoiesis and hematologic malignancies

Laurie Herviou², Giacomo Cavalli², Guillaume Cartron^{3, 4}, Bernard Klein^{1,2,3} and Jérôme Moreaux^{1, 2, 3}

¹ Department of Biological Haematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

² Institute of Human Genetics, CNRS-UPR1142, Montpellier F-34396, France

³ University of Montpellier 1, UFR de Médecine, Montpellier, France

⁴ Department of Clinical Haematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

Résumé :

Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2), la sous-unité catalytique du complexe répresseur Polycomb 2, inhibe l'expression des gènes via la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. EZH2 régule l'auto-renouveau et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. EZH2 contrôle également la différenciation des lymphocytes B normaux. Des dérégulations d'EZH2 ont été décrites dans de nombreux types de cancers, incluant les hémopathies malignes. Des inhibiteurs spécifiques d'EZH2 ont récemment été développés afin d'exploiter l'addiction oncogénique des cellules tumorales envers EZH2. Leur potentiel thérapeutique est en cours d'évaluation. Cette revue décrit le rôle d'EZH2 dans des processus hématologiques normaux et pathologiques ainsi que les récentes avancées dans le développement d'inhibiteurs d'EZH2 dans le traitement personnalisé de patients atteints d'hémopathies malignes.

Publication dans Oncotarget en Octobre 2015

EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies

Laurie Herviou², Giacomo Cavalli², Guillaume Cartron^{3,4}, Bernard Klein^{1,2,3} and Jérôme Moreaux^{1,2,3}

¹ Department of Biological Hematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

² Institute of Human Genetics, CNRS UPR1142, Montpellier, France

³ University of Montpellier 1, UFR de Médecine, Montpellier, France

⁴ Department of Clinical Hematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

Correspondence to: Jérôme Moreaux, **email:** jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

Keywords: hematological malignancies, EZH2, Polycomb complex, therapeutic target

Received: August 07, 2015

Accepted: October 14, 2015

Published: October 20, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), the catalytic subunit of the Polycomb repressive complex 2, inhibits gene expression through methylation on lysine 27 of histone H3. EZH2 regulates normal hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. EZH2 also controls normal B cell differentiation. EZH2 deregulation has been described in many cancer types including hematological malignancies. Specific small molecules have been recently developed to exploit the oncogenic addiction of tumor cells to EZH2. Their therapeutic potential is currently under evaluation. This review summarizes the roles of EZH2 in normal and pathologic hematological processes and recent advances in the development of EZH2 inhibitors for the personalized treatment of patients with hematological malignancies.

PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF EZH2

EZH2 and Polycomb complex-mediated transcription repression

Epigenetic modifications play important biological roles because they regulate gene expression by modifying chromatin organization and by modulating transcription initiation, elongation, splicing and termination. Epigenetic modifications are dynamically established by DNA methyltransferases (DNMTs) and by many categories of histone-modifying enzymes that write, read and erase histone modifications [1] in a highly regulated manner. Given the importance of epigenetic information in the control of DNA functions, epigenetic deregulations play a key role in the development of many diseases, including cancer where they have been extensively studied [2-5].

EZH2, one of the most studied histone-modifying enzymes, is the catalytic subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). PRC2 is one of the two major classes of Polycomb complexes and is responsible for maintaining its target genes in a transcriptionally repressed

state through tri-methylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3) [6]. The other PRC2 members are EED, SUZ12, RBAP46/48 and AEBP2. Although their function has not been fully characterized, it is clear that EZH2 requires at least EED and SUZ12 to be catalytically active in vitro, while RBAP46/48 and AEBP2 stimulate EZH2 activity [6].

It has been suggested that EZH2-mediated H3K27me3 allows Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) recruitment to chromatin that will then mono-ubiquitinylate lysine 119 of histone H2A (H2AK119ub1), thus establishing a higher repressive state of chromatin (Figure 1) [7, 8]. Alternatively, following H2AK119ub1 by alternative PRC1-like complexes, PRC2 components could be recruited. They, in turn, will drive the formation of canonical PRC1, suggesting an intimate interplay between PRC1 and PRC2 for target gene silencing [9, 10].

Roles of EZH2 in normal hematopoiesis

PRC1 and PRC2 play a major role in normal hematopoiesis by promoting pluripotency maintenance and self-renewal of adult stem cells [8, 11]. EZH2

involvement in hematopoiesis was first revealed by its interaction with VAV [18], an important effector in hematopoietic signal transduction [19].

As EZH2, EED or SUZ12 loss-of-function mutations increase the activity of hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitor cells, PRC2 could contribute to their negative control [20]. EZH2 overexpression in HSCs prevents exhaustion of their long-term repopulating potential during serial transplantation [18, 21, 22]. Therefore, EZH2 could prevent stem cell senescence [18] by regulating adult HSC differentiation, but not their self-renewal capacity [22-24]. EZH2 also increases the pool of quiescent HSCs by supporting their proliferation and inhibiting apoptosis. However, EZH2 inactivation has opposite effects on apoptosis and proliferation in multi-potent progenitors compared with long-term HSCs (LT-HSCs) [23]. In LT-HSCs, EZH2 is associated with hematopoietic differentiation and function, cellular growth and proliferation and survival [24].

One of the critical issues for understanding the role of EZH2 in hematopoiesis is to find, among the thousands of genes bound and modified by PRC2, the key targets of its transcriptional regulation. *CDKN2A* is one of the most important Polycomb target loci in mammals. *CDKN2A* negatively regulates cell proliferation through the RB/p53 pathway and is repressed by EZH2. However, EZH2 requirement for HSC proliferation and differentiation is

not only dependent on *CDKN2A* repression, suggesting that other PRC2 target genes must be involved in this function [24]. Indeed, EZH2 also regulates cell cycle genes to promote cell cycling and controls the expression of genes that inhibit HSC differentiation (*ID2* and *SOX7*) [24, 25]. Moreover, EZH2, by repressing pro-apoptotic genes, such as *NOXA*, *p21* and *WIG1*, protects HSCs from cell death [24].

During lymphopoiesis, EZH2 is strongly expressed in proliferating cells, such as human germinal center B cells, cycling T and B lymphocytes and plasmablasts, suggesting an important role in cell cycle regulation and in lymphocyte division [25-27]. In agreement with this hypothesis, lower levels of H3K27me3 and other histone methylation marks are observed in resting B-cells compared with activated and cycling cells. The histone H3.3 variant accumulates in non-cycling cells and directly reflects the length of time lymphocytes remain quiescent [28]. This suggests that canonical H3K27me3 could be replaced by the H3.3 variant that is not methylated at K27 [29, 30].

On the other hand, EZH2 is down-regulated during B-cell differentiation and maturation [27]. The authors of this study suggested that EZH2 is a component of the checkpoint mechanism that controls pro-B to pre-B cell transition [27]. EZH2 regulates pre-B cell receptor (pre-BCR) expression in pro-B cells. This receptor is essential

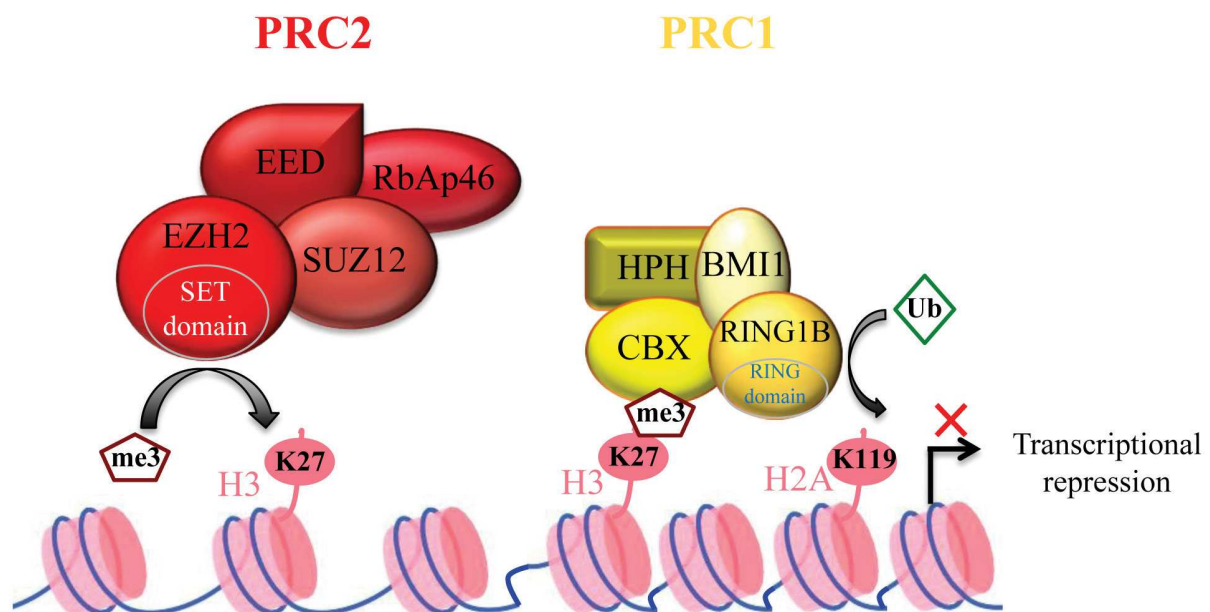


Figure 1: Polycomb complex-mediated transcription repression. Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) contains four core components. EZH2 (Enhancer-of-zeste homolog 2) is the catalytic sub-unit, whereas EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (zinc finger) and RBAP46/48 (Retinoblastoma Binding Protein) contribute to improving EZH2 activity. PRC2 induces EZH2-mediated H3K27 tri-methylation (H3K27me3) to repress its target genes. The H3K27me3 mark is recognized by the CBX subunit of Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). Then, the E3 ubiquitin-protein ligase RING1A ubiquitinylates histone H2A at lysine 119, strengthening gene transcription repression.

for B-cell maturation, by directing both cell cycle exit and Igk recombination at the pre-B cell stage. It has been proposed that H3K27me3 mark on the VhJ558 gene allows the specific targeting of the recombination machinery, DNA cleavage and gene rearrangement in pro-B cells [27].

Another study suggested that EZH2 could inhibit pro- to pre-B cell differentiation by interacting with STAT5. Activation of the IL7 receptor and STAT5 would lead to EZH2 recruitment, repression of Igk transcription and inhibition of its recombination [31]. STAT5 and EZH2 also act together to repress a significant subset of genes during B-cell lymphopoiesis [31]. Moreover, EZH2 controls B-cell differentiation and immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement during mouse B-cell development [21, 22].

During B-cell differentiation, EZH2 also blocks DNA repair response pathways in activated B-cells, thus allowing their survival following Activation-Induced cytidine Deaminase (AID)-mediated somatic hypermutation of Ig genes [32] (Figure 3).

EZH2 AND HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

During the last ten years, EZH2 has generated much interest as a potential therapeutic target in cancer. First, EZH2 overexpression was correlated with tumor cell aggressiveness, metastasis development and poor

prognosis in different cancer types [12-14]. More recently, EZH2 gain-of-function somatic mutations have been discovered [15-17]. These results led academic laboratories and pharmaceutical companies to develop molecules to target EZH2.

Increased EZH2 expression

A number of studies have shown that *EZH2* overexpression plays a major role in the physiopathology of several hematological malignancies by promoting cell proliferation and inducing tumor cell phenotypes. High *EZH2* expression in lymphomas is correlated with increased proliferation, tumor cell aggressiveness and poor prognosis [33, 34]. *EZH2* is also overexpressed in 100% of Burkitt lymphomas (BL), 87.5% of grade 3 follicular lymphomas (FL) and 85.7% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) [33].

Similarly, *EZH2* overexpression in natural killer (NK)/T-cell lymphomas is associated with a growth advantage and poor prognosis [35]. *EZH2* is also strongly expressed in mantle cell lymphomas where high *EZH2* expression is correlated with aggressiveness and poor prognosis [36, 37]. Increased *EZH2* expression in these malignancies is partly due to MYC-mediated inhibition of miR-26 and miR-101, two microRNAs that target EZH2 [35, 38].

In the B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)

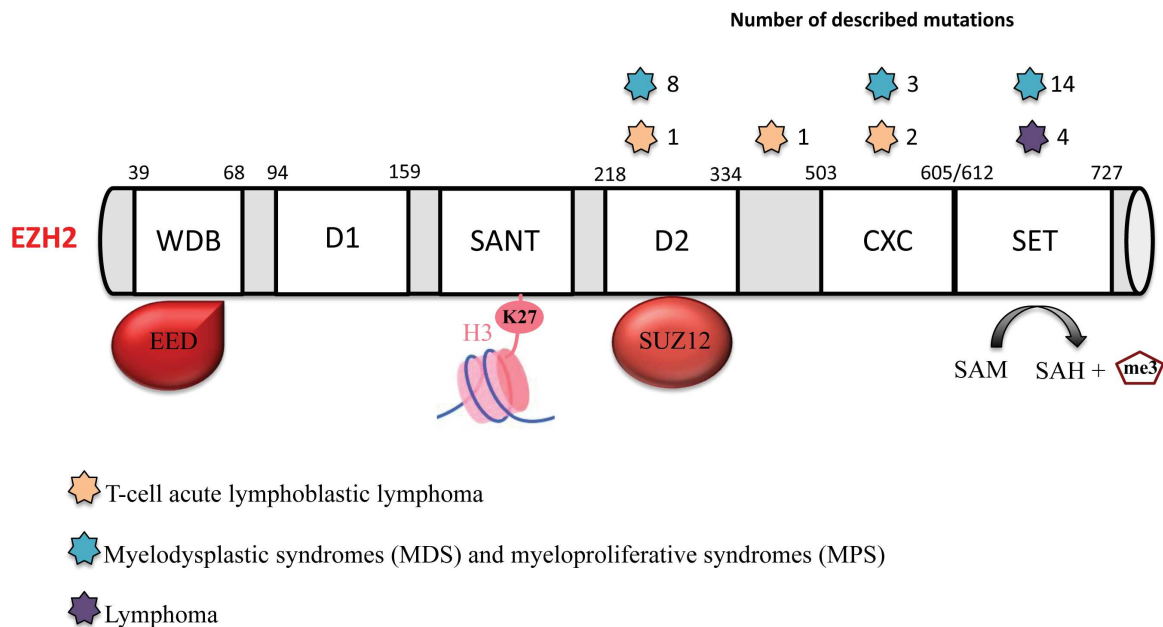


Figure 2: EZH2 mutations in hematological malignancies. EZH2 has several functional domains: the WD-40 binding domain (WDB) that interacts with EED; domain 1 (D1); domain 2 (D2) that interacts with SUZ12; the domains SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIB (SANT) that interact with histones; a cysteine-rich domain (CXC); and the suppressor of variegation 3-9, enhancer of zeste and trithorax (SET) catalytic domain. Several EZH2 mutations have been identified in different hematological malignancies: lymphoma (purple star), myelodysplastic syndromes (MDS) and myeloproliferative syndromes (MPS) (blue stars) and T-cell acute lymphoblastic lymphoma (T-ALL) (orange stars).

Nalm-6 cell line, *EZH2* overexpression is correlated with silencing of tumor suppressor genes (p21, p53 and PTEN) [39]. More recently, it has been reported that *EZH2* is significantly overexpressed in tumor cells from patients with chronic lymphoid leukemia compared with paired healthy B-cells [40]. This increased expression is correlated with hyper-lymphocytosis, chromosomal abnormalities, high ZAP-70 expression and poor prognosis [40].

In several cancers, *EZH2* expression is significantly correlated with expression of *MMSET*, a histone methyltransferase that regulates transcription and oncogenesis in multiple myeloma (MM) harboring t(4;14) translocations [41]. *EZH2* positively regulates *MMSET* expression at the post-transcriptional level by repressing the expression of miR-26a, miR-31 and miR-203, thus promoting tumor development [41]. Moreover, *MMSET*-overexpressing cells are more sensitive to *EZH2* inhibitors [42].

Other studies support a potential role for *EZH2* in MM pathogenesis, but the underlying mechanisms are still poorly understood. Global gene expression profiling indicated that *EZH2* is up-regulated in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and aggressive myeloma cells compared with normal plasma cells [43]. Moreover, H3K27me3 target genes are down-regulated in MGUS and MM compared with normal bone marrow plasma cells [44]. In human MM cell lines (HMCL), *EZH2* expression has been correlated with proliferation and growth factor independence [45]. Moreover, *EZH2* expression is required in HMCL with activated N-RAS and K-RAS proliferative phenotypes [45]. Inhibition of *EZH2* expression and activity, and thus loss of Polycomb target gene repression, is associated with HMCL growth inhibition [46, 47] and decreased tumor load and survival in a mouse model of MM [44]. Although these effects were correlated with decreased *EZH2* expression, the inhibitors used in these studies

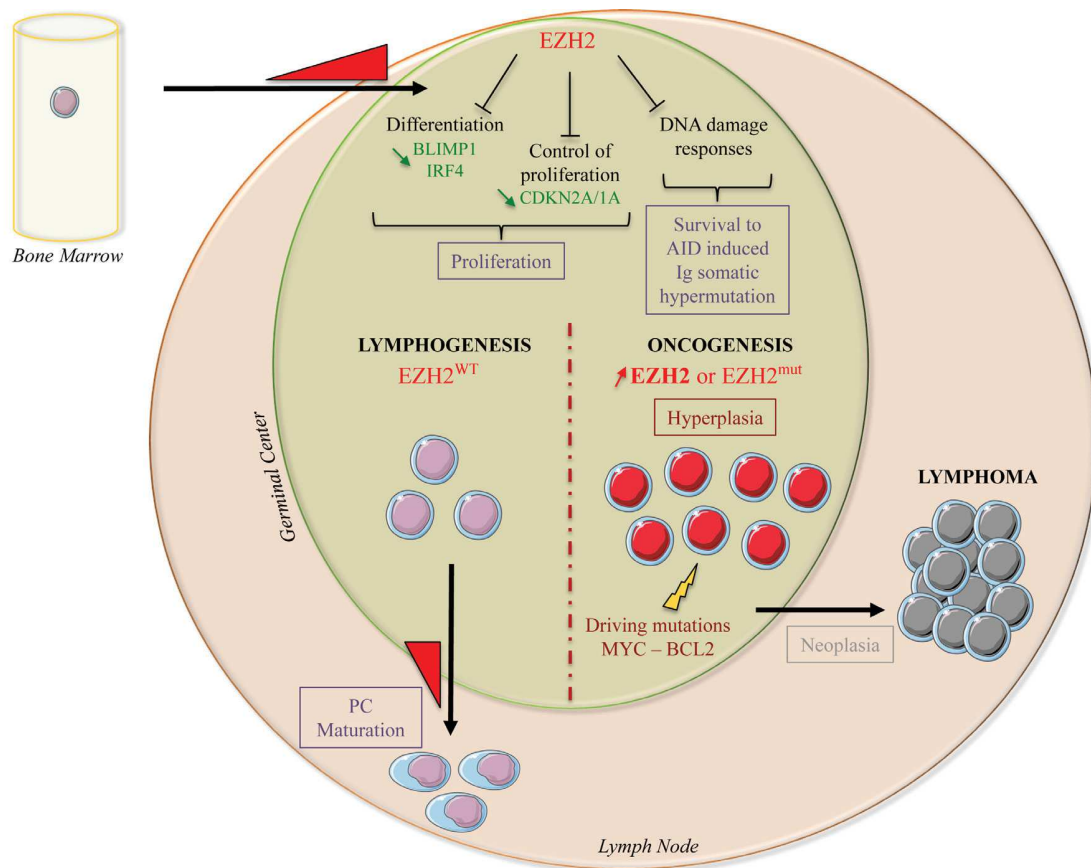


Figure 3: EZH2 biological functions during normal B-cell differentiation and lymphomagenesis. During normal B-cell differentiation, *EZH2* expression is induced when naive B-cells enter the germinal center for affinity maturation and antibody class switching. Through H3K27 tri-methylation, *EZH2* represses the expression of negative cell cycle regulators (*CDKN2A* and *CDKN1A*) and of B-cell differentiation transcription factors (*BLIMP1* and *IRF4*), leading to immature B-cell expansion. *EZH2* also inhibits DNA damage response pathways, allowing survival of B-cells during AID-mediated somatic hypermutation of Ig genes. *EZH2* expression decreases when B-cells exit the germinal centers, leading to de-repression of *EZH2* target genes to support plasma cell maturation. Conversely, activating mutations or *EZH2* overexpression lead to an imbalance due to increased repression of *EZH2* target genes, induction of proliferation and blockade of B-cell maturation. Additional oncogenic hits (c-MYC or *BCL2* deregulation) will then further promote cell transformation.

were not specific [48]. Therefore, specific inhibitors of EZH2 enzymatic activity are required to precisely define its roles in MM. Finally, one study reported that *EZH2* is overexpressed in the side population cells of MM cell lines. These side population cells, which are characterized by their ability to export Hoechst dye and by CD138 expression, actively proliferate and show tumor-initiating potential [49].

Altogether, these studies suggest an involvement of EZH2 in MM initiation/development and aggressiveness, but its role in this malignancy still need to be fully characterized.

A correlation between *EZH2* overexpression and myeloid leukemia development has also been described [50]. *EZH2* is highly expressed in high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and in acute myeloid leukemia (AML) arising from a pre-existing MDS. Specifically, *EZH2* is significantly overexpressed in MDS and AML primary tumor cells that display aberrant DNA methylation of the gene encoding the tumor suppressor p15INK4B compared with tumors where p15INK4B is not methylated [51].

In mice, *Ezh2* overexpression in HSCs leads to myeloproliferative neoplasms (MPNs) [23]. In this model, several genes associated with HSC maintenance are regulated by EZH2, including the transcriptional regulators *Evi-1* and *Ntrk3* that are aberrantly expressed in hematological malignancies [23]. In another AML murine model, *Ezh2* loss inhibits cancer cell proliferative capacity and disrupts tumor progression by re-activating EZH2 target genes that are implicated in myeloid cell differentiation [52]. These results obtained in several mouse models highlight EZH2 oncogenic function in myeloid cells.

EZH2 overexpression in cancer cells may result from different mechanisms. *EZH2* up-regulation has been linked to gene amplification in several solid cancers [53], but not in hematological malignancies. Alternatively, increased expression and/or activity of *EZH2* positive regulators could lead to *EZH2* overexpression. For instance, in hematological malignancies, c-MYC is deregulated by different mechanisms, including chromosome rearrangements, amplification, mutations and also epigenetic mechanisms, such as aberrant microRNA regulation [54-59]. Enhancement of *EZH2* expression by c-MYC has been described in prostate cancer and AML [60, 61]. Therefore, a link between c-MYC deregulation and *EZH2* overexpression could be involved in the physiopathology of hematological malignancies. On the other hand, overexpression of the ETS DNA binding protein ERG in a CML cell line is associated with drug resistance and repression of DNA chromatin remodeling genes, including the PRC2 members *SUZ12* and *EZH2* [62]. Other transcription factors, such as HIF1 α , ELK1, EWS-FLI1, E2F, ATAD2/ANCCA, NF-YA, STAT3 and BRAF, can modulate *EZH2* gene expression in solid

cancers [63-73]. As their expression/activity is also deregulated in hematological malignancies, it could be important to analyze their role in normal hematopoiesis and during tumorigenesis.

Somatic mutations leading to EZH2 gain of function

Recurrent heterozygous mutations that target specifically Y641 in the SET catalytic domain within the S-adenosylmethionine (SAM) pocket of EZH2 were described in germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma (GCB DLBCL) and in FL and are found in 22% of patients [17]. Other recurrent somatic mutations were identified at A677 and A687 of the EZH2 SET domain [15-17, 74] (Figure 2). These mutations are less frequent and are detected only in 1 to 2% of patients with DLBCL or FL. Unlike wild type EZH2 that preferentially targets non-methylated or mono-methylated lysine 27 of H3 (H3K27 or H3K27me1), EZH2^{Y641} mutants preferentially target di-methylated lysine 27 of H3 (H3K27me2), and have a weaker activity on H3K27 and H3K27me1 [16, 75]. The EZH2^{A677G} mutant methylates H3K27, H3K27me1 and H3K27me2, whereas EZH2^{A677V} targets preferentially H3K27me1 [16]. In agreement, lymphoma cell lines harboring EZH2^{Y641} or EZH2^{A677} display significantly higher H3K27me3 and lower H3K27me2 levels [16, 75]. Both histone modifications lead to inhibition of target gene expression, although it was suggested that H3K27me3 is associated with a more repressive chromatin state than H3K27me2 [76, 77]. How a decrease in H3K27me2 level contributes to the biology of EZH2-mutated lymphoma cells is not known. Although EZH2 inhibition induces the loss of di- and tri-methylation in all characterized lymphoma cell lines, independently of their *EZH2* mutational status, cell lines with EZH2 activating mutations that lead to higher H3K27me3 are more sensitive to EZH2 inhibitors than cells harboring wild type EZH2 [16, 78]. As H3K27me3 is a repressive mark, EZH2 inhibition in sensitive cell lines leads to expression of H3K27me3 target genes. Surprisingly, in cell lines that are not responsive to EZH2 inhibition, there are very few transcriptional changes, although H3K27me2/3 is completely lost [16]. These results suggest that inhibition of H3K27 methylation is not sufficient on its own to induce target gene transcription in unresponsive cell lines, and that other factors are implicated. Therefore, it would be interesting to target redundant epigenetic repressive marks (such as DNA methylation, H3K9 di- and tri-methylation), or the absence of activation marks, such as H3K4 tri-methylation or H3K27 acetylation (H3K27ac), to sensitize tumor cells to EZH2 inhibition. For instance, in DLBCL harboring EZH2 gain-of-function mutations, the cytotoxic and cytostatic effects induced by a histone deacetylase 1/2 (HDAC1/2) inhibitor were

correlated with increased H3K27ac at genes involved in the DNA damage response or apoptosis. This treatment did not induce loss of H3K27me3 globally, but only at genes involved in the DNA damage response, thus leading to DSB repair impairment and apoptosis. This study suggests that EZH2 gain-of-function mutations represent a survival advantage for DLBCL cells by improving DNA damage repair processes [79]. In mice, the presence of EZH2^{Y64I} mutations is correlated with higher number of germinal center B cells, germinal center hyperplasia and lymphoid transformation. This phenotype is associated with aberrant *EZH2* expression in tumor cells [80]. EZH2 deregulation interferes with the finely regulated balance between germinal center B cell proliferation and differentiation, blocking them in a proliferative and immature state, which constitutes a key determinant in lymphoma development [32, 80]. EZH2 gain-of-function mutations are not sufficient on their own for lymphoma development; however, they represent a driving hit in lymphoid transformation, in association with the deregulation of other genes, such as *c-MYC* or *BCL2* [80, 81] (Figure 3).

Somatic mutations leading to EZH2 loss of function

On the other hand, several studies have shown that H3K27me3 inhibition also contributes to the development of hematological malignancies [83, 84]. This inhibition can be directly caused by EZH2 inactivating mutations, or indirectly by ASK1 mutations that lead to loss of PRC2-mediated gene repression [82]. These data suggest that EZH2 can act not only as an oncogene, but also as a tumor suppressor, depending on the cell context. Two studies reported the presence of different EZH2 inactivating mutations in myeloid hemopathies, such as myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia (CML), atypical chronic myelogenous leukemia and MDS [83, 84]. EZH2 inactivating mutations are associated with significantly shorter overall survival and event-free survival in these patients. EZH2 loss-of-function mutations were correlated with poor prognosis also in a cohort of patients with myelofibrosis [85]. A recent model suggests that EZH2 inactivating mutations contribute to cancer stem cell development through the induction of *HOXA9* expression, thus supporting myeloid progenitor self-renewal [86]. In MDS, EZH2-inactivating mutations are frequently associated with *RUNX1* mutations. In a MDS mouse model induced by a *Runx1* mutation in HSCs, *Ezh2* loss promotes MDS development, but reduces its propensity to progress to AML [87]. EZH2-inactivating mutations are not restricted to myeloid hemopathies. Indeed, *EZH2* or *SUZ12* mutations are also observed in 25% of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) [88]. Several studies demonstrated that EZH2 loss-of-function mutations contribute to the development of T-ALL,

mostly through activation of the NOTCH signaling pathway. Moreover, in mice injected with T-ALL cells, EZH2 inhibition is associated with significantly higher tumorigenic potential and mortality [88, 89].

Many studies on the involvement of Polycomb group proteins in cancer initiation and development have highlighted their dual role as oncogenes/tumor suppressors [15-17, 35, 83-88]. Accumulating evidence shows that PRC2 inhibits the proliferative and self-renewal potential of immature lymphoid progenitors [22-24] and that enhanced EZH2 activity specifically stimulates mature cell proliferation [25-27]. Therefore, it could be hypothesized that Polycomb group proteins act as oncogenes in differentiated cells, such as B, NK or NKT cells [32, 80, 81], and as tumor suppressors in undifferentiated cells, such as HSCs/progenitor cells [87]. Experimental modulation of EZH2 expression in a cell-stage specific manner during hematopoiesis might help validating this hypothesis and improving our understanding of EZH2 role in hematological malignancies.

EZH2 functions not related to H3K27 methylation

The growth advantage associated with increased *EZH2* expression in NK/T-cell lymphoma cells is independent of its H3K27 methylation activity. Indeed, overexpressed EZH2 deregulates tumor cell proliferation by directly inducing *CCND1* transcription [35]. This H3K27me3-independent function in transcriptional activation has also been observed in breast and prostate cancer [90-92], suggesting a possible switch of EZH2 from silencer to activator during tumorigenesis in some cancers.

Concerning its silencing role, in addition to deposition of H3K27me3, the PRC2 complex can recruit HDACs and DNMTs that enhance its transcriptional repression activity. Treatment with HDAC inhibitors results in *EZH2* expression down-regulation in tumor cells, suggesting that PRC2 and HDACs collaborate in the epigenetic control of gene expression [93]. EZH2 can also directly interact with DNMTs [94]. Analysis of the DNA methylation profile of lymphoma cells revealed a significant enrichment in Polycomb complex target genes [95]. These data indicate that H3K27me3 and DNA methylation cooperate in repressing PRC2 target genes associated with lymphomagenesis.

TARGETED EPIGENETIC THERAPY: EZH2 INHIBITORS

Considerable efforts have been focused on the development of EZH2 inhibitors. 3-Deazaneplanocin (DZNep) was the first molecule developed to inhibit EZH2 through the competitive inhibition of the enzyme S-adenosylhomocysteine hydrolase. This

results in the accumulation of adenosylhomocysteine that inhibits methyltransferases and induces PRC2 degradation, thus leading to a decrease in EZH2 protein level [48]. As DZNep is a broad-spectrum inhibitor of methyltransferases, it is not considered a proper EZH2 targeted therapy [48]. Studies carried out in mice reported that DZNep could be of therapeutic interest as immunomodulator for the treatment of graft versus host disease (GvHD), underscoring the interest for allograft protocols in hematological malignancies [96]. Specifically, histone methylation can modulate the acquired immune response and DZNep activates the pro-apoptotic program in alloantigen-activated T-cells in a GvHD mouse model, without any effect on the antitumor activity of the donor T-cells.

The discovery of EZH2 mutations, particularly in DLBCL, promoted research to develop specific EZH2 inhibitors [16, 78, 97, 98], such as E11. E11 is recruited to wild type EZH2 or to Y641 mutants [98], resulting in H3K27me3 inhibition, arrest in the G1 phase of the cell cycle, apoptosis induction and differentiation of EZH2-mutated B-cells into memory B-cells. Two other EZH2 inhibitory molecules (EPZ005787 and GSK126) were identified independently by high-throughput screening [16, 78]. These two highly specific EZH2 inhibitors (500 to 1000 times more selective for EZH2 than for other methyltransferases) target EZH2 through the same mechanism as E11, thus inhibiting H3K27 tri-methylation

and allowing the transcriptional activation of EZH2 target genes. The milder apoptosis induction in wild type lymphoma cell lines compared with EZH2^{Y641} cells (where EZH2 catalytic activity is stronger) provided the proof of concept of the efficiency of these inhibitors [16]. In a xenograft mouse model of DLBCL, the GSK126 inhibitor leads to tumor growth inhibition and significantly longer survival in treated mice compared with untreated controls [16].

A phase I/II multicenter clinical trial on the use of an EZH2 inhibitor as monotherapy (E7438 or Tazemetostat) in patients with B-cell lymphoma (GCB and non-GCB DLBCL and grade 3 FL) or with advanced solid cancers is currently ongoing (NCT01897571). Preliminary results showed an acceptable safety profile in all treated patients and objective responses in patients with relapsed DLBCL and FL harboring, or not, EZH2 mutations. Partial responses were observed as early as two months and up to ten months after the beginning of treatment, and time-dependent responses were reported (ClinicalTrials.gov reference NCT01897571).

The efficiency of targeted approaches in patients with tumors harboring EZH2-activating mutations can be improved by using companion diagnostic tests to identify patients with EZH2^{Y641} mutations [99]. Moreover, it could be interesting to associate EZH2 inhibitors with other inhibitors that target oncogenic pathways involved in hematological malignancies. For instance, recent

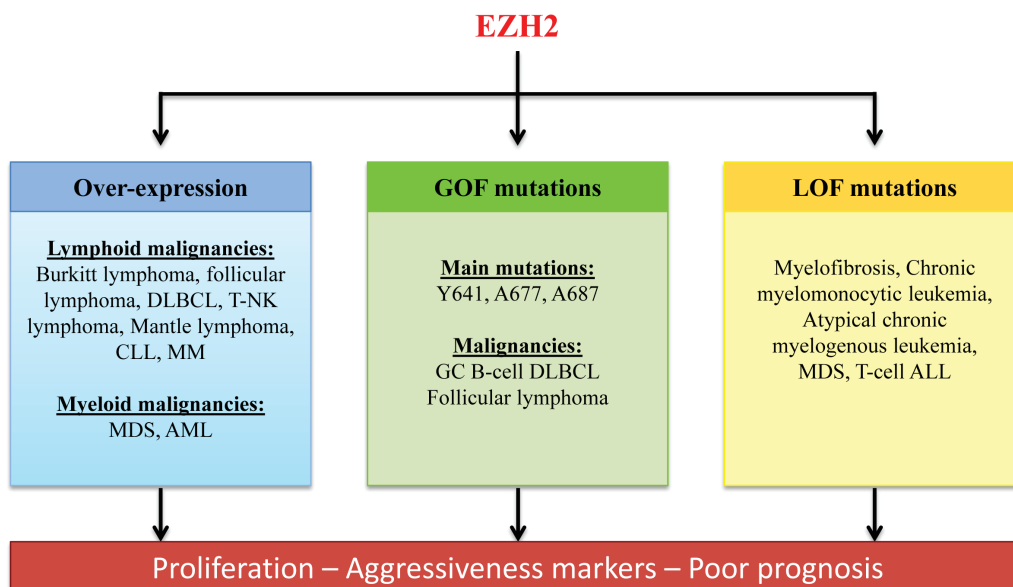


Figure 4: Role of EZH2 deregulation in hematological malignancies. EZH2 is deregulated in several hematological malignancies. EZH2 overexpression and gain-of-function mutations are correlated with increased proliferation of tumor cells and poor prognosis in patients with lymphoma. However, EZH2 loss-of function mutations also can be associated with aggressiveness of some hematological malignancies. Therefore, therapeutic molecules targeting EZH2 should not hinder EZH2 tumor-suppressor function. GC B-cell DLBCL: Germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; MM: multiple myeloma, MDS: myelodysplastic syndrome; AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia.

in vitro studies have highlighted the synergy between EZH2 inhibitors and HDACi in aggressive B-cell lymphoma [38, 97]. These effects are mainly mediated by *EZH2* deregulation and MYC-induced microRNA inhibition. Moreover, as EZH2 and DNMTs cooperate in transcriptional regulation, it might be interesting to explore the effects of associating EZH2 inhibitors with DNA demethylating agents in B-cell lymphoma cells. Finally, it has been reported that the combination of the EZH2 inhibitor E7438 with a corticosteroid has an anti-proliferative effect in GCB-like lymphoma cell lines and sensitizes EZH2 inhibitor-resistant cell lines, independently of EZH2 mutational status [100].

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Significant advances have been made in understanding the epigenetic landscape in hematological malignancies, including the characterization of EZH2 biological functions. In some cancers, such as GCB lymphoma, EZH2 plays a key oncogenic role and represents a promising therapeutic target (Figures 3&4). In other tumor types, EZH2 can also have a tumor suppressor activity. Further studies are required to elucidate this duality between oncogenic and anti-tumor activities, depending on the cancer type and the cellular context (Figure 4).

The first clinical trials are currently ongoing to determine the safety and efficiency of EZH2 inhibitors. Preliminary clinical data in patients with DLBCL and FL indicate limited adverse events and a time-dependent objective response after monotherapy with Tazemetostat. Moreover, H3K27 methylation status and EZH2 expression could be used as prognostic markers to help developing personalized medicine in hematological malignancies. Specifically, a H3K27me3/H3K27me2 score combined with EZH2 mutational status has been proposed for selecting patients with DLBCL who could benefit from treatment with EZH2 inhibitors [101].

Moreover, the discovery of non-histone EZH2 substrates and of PRC2-independent EZH2 functions opens new research directions and will probably influence the development of a second generation of EZH2 inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Languedoc Roussillon CRLR (R14026FF), Fondation de France (201400047510) and ITMO Cancer (MM&TT). LH is supported by a French Labex EpiGenMed fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Simo-Riudalbas L and Esteller M. Targeting the histone orthography of cancer: drugs for writers, erasers and readers. *Br J Pharmacol*. 2015; 172:2716-2732.
2. Breiling A and Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin*. 2015; 8:24.
3. Farria A, Li W and Dent SY. KATs in cancer: functions and therapies. *Oncogene*. 2015.
4. Volkel P, Dupret B, Le Bourhis X and Angrand PO. Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am J Transl Res*. 2015; 7:175-193.
5. Shaknovich R, De S and Michor F. Epigenetic diversity in hematopoietic neoplasms. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1846:477-484.
6. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS and Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002; 298:1039-1043.
7. Lund K, Adams PD and Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2014; 28:44-49.
8. Margueron R and Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011; 469:343-349.
9. Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP, De Marco V, Elderkin S, Koseki H, Klose R, Heger A and Brockdorff N. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep*. 2014; 7:1456-1470.
10. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL, Ito S, Cooper S, Kondo K, Koseki Y, Ishikura T, Long HK, Sheahan TW, Brockdorff N, Kessler BM, Koseki H, et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*. 2014; 157:1445-1459.
11. Di Croce L and Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013; 20:1147-1155.
12. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:11606-11611.
13. Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, Daigo Y, Takagi K, Iwai Y, Cho HS, Toyokawa G, Yamane Y, Maejima K, Field HI, Kobayashi T, Akasu T, Sugiyama M, Tsuchiya E, Atomi Y, et al. Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci*. 2011; 102:1298-1305.
14. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt

- RG, Otte AP, Rubin MA and Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002; 419:624-629.
15. Bodor C, O’Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A and Fitzgibbon J. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25:726-729.
 16. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A, 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:2989-2994.
 17. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010; 42:181-185.
 18. Kamminga LM, Bystrykh LV, de Boer A, Houwer S, Douma J, Weersing E, Dontje B and de Haan G. The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood*. 2006; 107:2170-2179.
 19. Hobert O, Jallal B and Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol*. 1996; 16:3066-3073.
 20. Majewski IJ, Ritchie ME, Phipson B, Corbin J, Pakusch M, Ebert A, Busslinger M, Koseki H, Hu Y, Smyth GK, Alexander WS, Hilton DJ and Blewitt ME. Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010; 116:731-739.
 21. Chou RH, Yu YL and Hung MC. The roles of EZH2 in cell lineage commitment. *Am J Transl Res*. 2011; 3:243-250.
 22. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H and Iwama A. Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011; 118:6553-6561.
 23. Herrera-Merchan A, Arranz L, Ligos JM, de Molina A, Dominguez O and Gonzalez S. Ectopic expression of the histone methyltransferase *Ezh2* in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat Commun*. 2012; 3:623.
 24. Xie H, Xu J, Hsu JH, Nguyen M, Fujiwara Y, Peng C and Orkin SH. Polycomb repressive complex 2 regulates normal hematopoietic stem cell function in a developmental-stage-specific manner. *Cell Stem Cell*. 2014; 14:68-80.
 25. Good-Jacobson KL. Regulation of germinal center, B-cell memory, and plasma cell formation by histone modifiers. *Front Immunol*. 2014; 5:596.
 26. Fukuyama T, Otsuka T, Shigematsu H, Uchida N, Arima F, Ohno Y, Iwasaki H, Fukuda T and Niho Y. Proliferative involvement of ENX-1, a putative human polycomb group gene, in haematopoietic cells. *Br J Haematol*. 2000; 108:842-847.
 27. Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT and Tarakhovskiy A. *Ezh2* controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*. 2003; 4:124-131.
 28. Baxter J, Sauer S, Peters A, John R, Williams R, Caparros ML, Arney K, Otte A, Jenuwein T, Merkenschlager M and Fisher AG. Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes. *EMBO J*. 2004; 23:4462-4472.
 29. Wen D, Banaszynski LA, Rosenwaks Z, Allis CD and Rafii S. H3.3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos. *Nucleus*. 2014; 5:369-375.
 30. Weth O, Paprotka C, Gunther K, Schulte A, Baierl M, Leers J, Galjart N and Renkawitz R. CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42:11941-11951.
 31. Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, Kee BL, Dinner AR and Clark MR. Epigenetic repression of the *Igk* locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase *Ezh2*. *Nat Immunol*. 2011; 12:1212-1220.
 32. Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain PL, George L, Alberghini F, Ferrarini L, Talukder AK, Ponzoni M, Testa G, Nojima T, Doglioni C, Kitamura D, Toellner KM, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2013; 123:5009-5022.
 33. Abd Al Kader L, Oka T, Takata K, Sun X, Sato H, Murakami I, Toji T, Manabe A, Kimura H and Yoshino T. In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, *Ezh2* is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2. *Virchows Arch*. 2013; 463:697-711.
 34. van Galen JC, Muris JJ, Oudejans JJ, Vos W, Giroth CP, Ossenkoppele GJ, Otte AP, Raaphorst FM and Meijer CJ. Expression of the polycomb-group gene *BMI1* is related to an unfavourable prognosis in primary nodal DLBCL. *J Clin Pathol*. 2007; 60:167-172.
 35. Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q and Chng WJ. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood*. 2013; 121:4512-4520.
 36. van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, Otte AP and Meijer CJ. Coexpression of *BMI-1* and *EZH2* polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001; 97:3896-3901.

37. Visser HP, Gunster MJ, Kluin-Nelemans HC, Manders EM, Raaphorst FM, Meijer CJ, Willemze R and Otte AP. The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2001; 112:950-958.
38. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R, Zhang Y, Chan JC, Fu K, Marquez VE, Chen-Kiang S, Moscinski LC, Seto E, Dalton WS, Wright KL, Sotomayor E, et al. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer Cell.* 2012; 22:506-523.
39. Chen J, Li J, Han Q, Sun Z, Wang J, Wang S and Zhao RC. Enhancer of zeste homolog 2 is overexpressed and contributes to epigenetic inactivation of p21 and phosphatase and tensin homolog in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237:1110-1116.
40. Rabello Ddo A, Lucena-Araujo AR, Alves-Silva JC, da Eira VB, de Vasconcellos MC, de Oliveira FM, Rego EM, Saldanha-Araujo F and Pittella Silva F. Overexpression of EZH2 associates with a poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2015; 54:97-102.
41. Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Mehra R, Lonigro RJ, Siddiqui J, Palanisamy N, Wu YM, Cao X, Kim JH, Zhao M, Qin ZS, Iyer MK, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell.* 2013; 49:80-93.
42. Popovic R, Martinez-Garcia E, Giannopoulou EG, Zhang Q, Zhang Q, Ezponda T, Shah MY, Zheng Y, Will CM, Small EC, Hua Y, Bulic M, Jiang Y, Carrara M, Calogero RA, Kath WL, et al. Histone methyltransferase MMSET/NSD2 alters EZH2 binding and reprograms the myeloma epigenome through global and focal changes in H3K36 and H3K27 methylation. *PLoS Genet.* 2014; 10:e1004566.
43. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M, Anaissie E, Morris C, Muwalla F, van Rhee F, Fassas A, Crowley J, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood.* 2002; 99:1745-1757.
44. Kalushkova A, Fryknas M, Lemaire M, Fristedt C, Agarwal P, Eriksson M, Deleu S, Atadja P, Osterborg A, Nilsson K, Vanderkerken K, Oberg F and Jernberg-Wiklund H. Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma. *PLoS One.* 2010; 5:e11483.
45. Croonquist PA and Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene.* 2005; 24:6269-6280.
46. Zhao F, Chen Y, Li R, Liu Y, Wen L and Zhang C. Triptolide alters histone H3K9 and H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis in multiple myeloma in vitro. *Toxicology.* 2010; 267:70-79.
47. Zhao F, Chen Y, Zeng L, Li R, Zeng R, Wen L, Liu Y and Zhang C. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells. *Eur J Pharmacol.* 2010; 646:1-11.
48. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE and Jones PA. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8:1579-1588.
49. Nara M, Teshima K, Watanabe A, Ito M, Iwamoto K, Kitabayashi A, Kume M, Hatano Y, Takahashi N, Iida S, Sawada K and Tagawa H. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS One.* 2013; 8:e56954.
50. Grubach L, Juhl-Christensen C, Rethmeier A, Olesen LH, Aggerholm A, Hokland P and Ostergaard M. Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2008; 81:112-122.
51. Xu F, Li X, Wu L, Zhang Q, Yang R, Yang Y, Zhang Z, He Q and Chang C. Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring. *Ann Hematol.* 2011; 90:643-653.
52. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H and Iwama A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 120:1107-1117.
53. Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM, Vessella RL and Visakorpi T. The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45:639-645.
54. Li X, Zhang XA, Xie W, Li X and Huang S. MYC-mediated synthetic lethality for treatment of hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015; 15:53-70.
55. Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI and Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell.* 2013; 153:320-334.
56. Chapuy B, McKeown MR, Lin CY, Monti S, Roemer MG, Qi J, Rahl PB, Sun HH, Yeda KT, Doench JG, Reichert E, Kung AL, Rodig SJ, Young RA, Shipp MA and Bradner JE. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2013; 24:777-790.
57. Stasik CJ, Nitta H, Zhang W, Mosher CH, Cook JR, Tubbs RR, Unger JM, Brooks TA, Persky DO, Wilkinson ST, Grogan TM and Rimsza LM. Increased MYC gene copy

- number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2010; 95:597-603.
58. Onnis A, De Falco G, Antonicelli G, Onorati M, Bellan C, Sherman O, Sayed S and Leoncini L. Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma. *PLoS One*. 2010; 5.
 59. Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, van Rijk A, Nyagol J, Byakika B, Lazzi S, Tosi P, van Krieken H and Leoncini L. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol*. 2008; 216:440-450.
 60. Salvatori B, Iosue I, Djodji Damas N, Mangiavacchi A, Chiaretti S, Messina M, Padula F, Guarini A, Bozzoni I, Fazi F and Fatica A. Critical Role of c-Myc in Acute Myeloid Leukemia Involving Direct Regulation of miR-26a and Histone Methyltransferase EZH2. *Genes Cancer*. 2011; 2:585-592. doi: 10.1177/1947601911416357.
 61. Koh CM, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnasubramanian S and De Marzo AM. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*. 2011; 2:669-683. doi: 10.18632/oncotarget.327.
 62. Mochmann LH, Neumann M, von der Heide EK, Nowak V, Kuhl AA, Ortiz-Tanchez J, Bock J, Hofmann WK and Baldus CD. ERG induces a mesenchymal-like state associated with chemoresistance in leukemia cells. *Oncotarget*. 2014; 5:351-362. doi: 10.18632/oncotarget.1449.
 63. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E and Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*. 2003; 22:5323-5335.
 64. Fujii S, Tokita K, Wada N, Ito K, Yamauchi C, Ito Y and Ochiai A. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene*. 2011; 30:4118-4128.
 65. Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, et al. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene*. 2004; 23:1627-1630.
 66. Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ and Sauter G. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene*. 2004; 23:5616-5623.
 67. Coe BP, Thu KL, Aviel-Ronen S, Vucic EA, Gazdar AF, Lam S, Tsao MS and Lam WL. Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads to activation of the oncogene EZH2 in small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013; 8:e71670.
 68. Garipov A, Li H, Bitler BG, Thapa RJ, Balachandran S and Zhang R. NF-YA underlies EZH2 upregulation and is essential for proliferation of human epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2013; 11:360-369.
 69. Lin YW, Ren LL, Xiong H, Du W, Yu YN, Sun TT, Weng YR, Wang ZH, Wang JL, Wang YC, Cui Y, Sun DF, Han ZG, Shen N, Zou W, Xu J, et al. Role of STAT3 and vitamin D receptor in EZH2-mediated invasion of human colorectal cancer. *J Pathol*. 2013; 230:277-290.
 70. Kalashnikova EV, Revenko AS, Gemo AT, Andrews NP, Tepper CG, Zou JX, Cardiff RD, Borowsky AD and Chen HW. ANCCA/ATAD2 overexpression identifies breast cancer patients with poor prognosis, acting to drive proliferation and survival of triple-negative cells through control of B-Myb and EZH2. *Cancer Res*. 2010; 70:9402-9412.
 71. Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rossler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Lowel D, von Luetlichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Muller-Tidow C and Burdach S. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:5324-5329.
 72. Hou P, Liu D, Dong J and Xing M. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle*. 2012; 11:286-295.
 73. Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH, Woodward WA, Hsu JM, Hortobagyi GN and Hung MC. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signaling. *Cancer Cell*. 2011; 19:86-100.
 74. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, Novak AJ, Dogan A, Ansell SM, Link BK, Zou L, Gould J, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:3879-3884.
 75. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM and Copeland RA. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:20980-20985.
 76. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I and Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007; 129:823-837.
 77. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stutzer A, Fischle W, Bonaldi T and Pasini D. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell*. 2014; 53:49-62.
 78. Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, Scott MP, Jin L, Smith JJ, Olhava EJ, Chesworth R, Moyer MP, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat*

Chem Biol. 2012; 8:890-896.

79. Johnson DP, Spitz GS, Tharkar S, Quayle SN, Shearstone JR, Jones S, McDowell ME, Wellman H, Tyler JK, Cairns BR, Chandrasekharan MB and Bhaskara S. HDAC1,2 inhibition impairs EZH2- and BBAP-mediated DNA repair to overcome chemoresistance in EZH2 gain-of-function mutant diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015; 6:4863-4887. doi: 10.18632/oncotarget.3120.
80. Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, Shen H, Yang SN, Wang L, Ezponda T, Martinez-Garcia E, Zhang H, Zheng Y, Verma SK, McCabe MT, Ott HM, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*. 2013; 23:677-692.
81. Berg T, Thoene S, Yap D, Wee T, Schoeler N, Rosten P, Lim E, Bilenky M, Mungall AJ, Oellerich T, Lee S, Lai CK, Umlandt P, Salmi A, Chang H, Yue L, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood*. 2014; 123:3914-3924.
82. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, Perna F, Zhao X, Taylor JE, Park CY, Carroll M, Melnick A, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*. 2012; 22:180-193.
83. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boulwood J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010; 42:722-726.
84. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA and Jansen JH. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010; 42:665-667.
85. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, Fanelli T, Ernst T, Winkelmann N, Jones AV, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Villani L, Bosi A, Barosi G, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011; 118:5227-5234.
86. Khan SN, Jankowska AM, Mahfouz R, Dunbar AJ, Sugimoto Y, Hosono N, Hu Z, Cheriya V, Vatolin S, Przychodzen B, Reu FJ, Sauntharajah Y, O'Keefe C, Sekeres MA, List AF, Moliterno AR, et al. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2013; 27:1301-1309.
87. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K, Nakajima H, Inaba T, Koseki H, et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nat Commun*. 2014; 5:4177.
88. Ntziachristos P, Tsirogas A, Van Vlierberghe P, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, Ferres-Marco D, da Ros V, Tang Z, Siegle J, Asp P, Hadler M, Rigo I, De Keersmaecker K, Patel J, Huynh T, et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2012; 18:298-301.
89. Simon C, Chagraoui J, Kros J, Gendron P, Wilhelm B, Lemieux S, Boucher G, Chagnon P, Drouin S, Lambert R, Rondeau C, Bilodeau A, Lavallee S, Sauvageau M, Hebert J and Sauvageau G. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes Dev*. 2012; 26:651-656.
90. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H, Cato L, Thornton JE, Gregory RI, Morrissey C, Vessella RL, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*. 2012; 338:1465-1469.
91. Jung HY, Jun S, Lee M, Kim HC, Wang X, Ji H, McCrea PD and Park JI. PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation. *Mol Cell*. 2013; 52:193-205.
92. Gonzalez ME, Moore HM, Li X, Toy KA, Huang W, Sabel MS, Kidwell KM and Kleer CG. EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:3098-3103.
93. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A, Ustun C, Rao R, Fernandez P, Chen J, Balusu R, Koul S, Atadja P, Marquez VE and Bhalla KN. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood*. 2009; 114:2733-2743.
94. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y and Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006; 439:871-874.
95. Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, Rosolowski M, Richter J, Lopez-Serra L, Ballestar E, Berger H, Agirre X, Bernd HW, Calvanese V, Cogliatti SB, Drexler HG, et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood*. 2009; 113:2488-2497.
96. He S, Wang J, Kato K, Xie F, Varambally S, Mineishi S, Kuick R, Mochizuki K, Liu Y, Nieves E, Mani RS, Chinnaiyan AM, Marquez VE and Zhang Y. Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. *Blood*. 2012; 119:1274-1282.
97. Zhao X, Lwin T, Zhang X, Huang A, Wang J, Marquez VE, Chen-Kiang S, Dalton WS, Sotomayor E and Tao J. Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity.

Leukemia. 2013; 27:2341-2350.

98. Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, Zeng J, Li M, Fan H, Lin Y, Gu J, Ardayfio O, Zhang JH, Yan X, Fang J, Mi Y, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:21360-21365.
99. Ryan RJ, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, Iafrate AJ, Bernstein BE, Sohani AR and Le LP. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS One*. 2011; 6:e28585.
100. Knutson SK, Warholc NM, Johnston LD, Klaus CR, Wigle TJ, Iwanowicz D, Littlefield BA, Porter-Scott M, Smith JJ, Moyer MP, Copeland RA, Pollock RM, Kuntz KW, Raimondi A and Keilhack H. Synergistic Anti-Tumor Activity of EZH2 Inhibitors and Glucocorticoid Receptor Agonists in Models of Germinal Center Non-Hodgkin Lymphomas. *PLoS One*. 2014; 9:e111840.
101. Dubois S, Mareschal S, Picquenot JM, Viailly PJ, Bohers E, Cornic M, Bertrand P, Veresezan EL, Ruminy P, Maingonnat C, Marchand V, Lanic H, Penther D, Bastard C, Tilly H and Jardin F. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: Implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? *Oncotarget*. 2015; 6:16712-16724. doi: 10.18632/oncotarget.3154.

II. Revue 2 : Rôle d'EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

Laurie Herviou¹, Giacomo Cavalli¹, Jérôme Moreaux^{1,2,3*}

¹ IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

² CHU Montpellier, Department of Biological Hematology, Montpellier, France

³ Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

Résumé:

EZH2, la sous-unité catalytique du complexe répresseur Polycomb PRC2, joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement et le processus de différenciation cellulaire, notamment via la catalyse de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. EZH2 participe notamment à la régulation de la différenciation des cellules B après activation par un antigène. Cette enzyme a été retrouvée dérégulée dans de nombreux cancers. L'activité oncogénique associée à EZH2 dans certaines hémopathies et tumeurs solides représente une cible thérapeutique intéressante. Au niveau préclinique comme clinique, de plus en plus d'études mettent en évidence l'efficacité d'inhibiteurs d'EZH2 sur les cellules cancéreuses surexprimant ou présentant des mutations activatrices d'EZH2. EZH2 joue notamment un rôle majeur dans la physiopathologie du myélome multiple, une hémopathie maligne affectant les plasmocytes dans la moelle osseuse dans lesquelles une surexpression d'EZH2 est retrouvée. Dans cette revue, nous présenterons EZH2 d'un point de vue mécanistique, puis nous décrirons son rôle au cours du développement et au cours de la différenciation des cellules B. Enfin, nous aborderons les fonctions et dérégulations d'EZH2 dans les cancers, dans la physiopathologie du myélome multiple et l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2 d'un point de vue thérapeutique.

Publication dans le Bulletin du Cancer en 2018

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

Laurie Herviou¹, Giacomo Cavalli¹, Jerome Moreaux^{1,2,3,4}

Reçu le 14 mai 2018

Accepté le 6 juin 2018

Disponible sur internet le :

1. IGH, CNRS, université Montpellier, 141, rue de la Cardonille, 34090 Montpellier, France
2. CHU de Montpellier, department of biological hematology, 80, avenue Augustin-Fliche, 34090 Montpellier, France
3. Université Montpellier, UFR de médecine, 2, rue École de Médecine, CS 59001, 34060 Montpellier cedex 2, France

Correspondance :

Jerome Moreaux : CHRU de Montpellier, Hôpital Saint-Éloi, IGH-Institute of Human Genetics, UMR 9002, CNRS, university of Montpellier, laboratory for monitoring innovative therapies, department of biological hematology, 80, avenue Augustin-Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France.
jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

Mots clés

EZH2

Épigénétique

Myélome multiple

Biomarqueur

■ Résumé

EZH2, la sous-unité catalytique du complexe répresseur Polycomb PRC2, joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement et les processus de différenciation cellulaire, notamment via la catalyse de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. EZH2 participe notamment à la régulation de la différenciation des cellules B après activation par un antigène. Cette enzyme a été retrouvée dérégulée dans de nombreux cancers. L'activité oncogénique associée à EZH2 dans certaines hémopathies et tumeurs solides représente une cible thérapeutique intéressante. Au niveau préclinique comme clinique, de plus en plus d'études mettent en évidence l'efficacité d'inhibiteurs d'EZH2 sur les cellules cancéreuses surexprimant ou présentant des mutations activatrices d'EZH2. EZH2 joue notamment un rôle majeur dans la physiopathologie du myélome multiple, une hémopathie maligne affectant les plasmocytes dans la moelle osseuse dans lesquelles une surexpression d'EZH2 est retrouvée. Dans cette revue, nous présenterons EZH2 d'un point de vue mécanistique, puis nous décrirons son rôle au cours du développement et au cours de la différenciation des cellules B. Enfin, nous aborderons les fonctions et dérégulations d'EZH2 dans les cancers, dans la physiopathologie du myélome multiple et l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2 d'un point de vue thérapeutique.

⁴ <http://www.igh.cnrs.fr/>.

Keywords

Epigenetics
EZH2
Multiple myeloma
Biomarker

Summary

EZH2 is therapeutic target for personalized treatment in multiple myeloma

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is a histone methyltransferase that functions as the catalytic subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2). PRC2 represses gene transcription through tri-methylation of lysine 27 of histone 3 (H3K27me3) by its catalytic subunit EZH2. EZH2 is also involved in normal B cell differentiation. EZH2 deregulation has been described in many cancer types including hematological malignancies. The oncogenic addiction of tumor cells to EZH2 represents a therapeutic target in several hematological malignancies and solid cancers. Specific small molecules have been recently developed to target cancer cells with EZH2 overexpression or activating mutation. Their therapeutic potential is currently under evaluation. In particular, EZH2 is overexpressed in multiple myeloma (MM), a neoplasia characterized by the accumulation of clonal plasma cells within the bone marrow, with biological functions in the pathophysiology. This review summarizes the roles of EZH2 in B cell differentiation and pathologic hematological processes with a particular focus in multiple myeloma. We also discuss recent advances in the development of EZH2 inhibitors for the personalized treatment of patients with hematological malignancies.

EZH2 d'un point de vue mécanistique

Les protéines du groupe Polycomb forment deux complexes multi-protéiques principaux, le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), présent sous forme canonique et non canonique, et le complexe PRC2. Les complexes PRC1 partagent des protéines centrales : les protéines RING1 (RING1A et RING1B), capables d'ubiquitinyler H2AK119, et une des six protéines PCGF. Le complexe PRC2 est composé de 3 protéines centrales : EED, SUZ12 ainsi que l'une des deux histones méthyltransférase, EZH2 ou EZH1. Ces trois composés sont indispensables pour l'activité méthyltransférase de PRC2. L'association de différentes protéines, dites accessoires, avec ces protéines centrales module l'activité enzymatique et le ciblage du complexe (*figure 1*) [1-3]. L'enzyme EZH2 est capable de mono-, di- et triméthyle la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me1/2/3) ainsi que des protéines non histone afin d'en moduler leur activité. Nous nous concentrons dans cette revue sur le rôle de H3K27me3 dans la répression de la transcription.

Chez les mammifères, PRC2 et H3K27me3 sont recrutés au niveau de domaines étendus de plus de 100 kb, tel que les loci Hox, et au niveau de domaines plus restreints de quelques kilobases. H3K27me3 est enrichi autour du Transcription Start Site (TSS) des promoteurs, bien qu'avec une plus faible intensité au niveau du TSS lui-même. La marque histone H3K27me3 est également retrouvée sur des régions intergéniques, et est enrichie au niveau des régions sub-télomériques et des séquences répétées [1-4].

Aucune séquence motif reconnue par les complexes Polycomb n'a été décrite à ce jour chez les mammifères. De nombreuses études ont montré que PRC2 et H3K27me3 sont particulièrement

présents au niveau d'îlots CpG non méthylés [5,6] et de régions riches en GC. En revanche, le mécanisme de recrutement de PRC2 au niveau de ses cibles est sujet à débat, et plusieurs études suggèrent que ce complexe pourrait être recruté via différents processus. Le premier modèle décrit, dit hiérarchique, propose l'enchaînement successif des événements suivants :

- recrutement de PRC2 au niveau d'une séquence cible ;
- triméthylation de H3K27 par EZH2 plaçant la chromatine dans un état répressif ;
- reconnaissance de H3K27me3 par les protéines CBX du complexe PRC1 ;
- ubiquitylation de H2AK119 par les protéines RING entraînant ainsi une plus ample compaction de la région ciblée.

Une étude récente a montré que le recrutement direct de SUZ12 sur des îlots CpG permettrait une triméthylation de novo de H3K27 par EZH2 [7]. La protéine EED permet également le recrutement de PRC2 au niveau de H3K27me3 permettant ainsi l'auto-propagation de la marque répressive sur de longues régions chromatiniennes (*figure 2*) [1,2,8,9].

Un autre modèle mettant en jeu le complexe PRC1 non canonique a été plus récemment décrit. L'ubiquitylation de H2AK119, induite par le complexe ncPRC1, est reconnue par les protéines accessoires de PRC2 AEBP2 et JARID2. Cette interaction permet ainsi le recrutement de PRC2 et la triméthylation de H3K27 [10,11]. Les deux complexes sont également capables d'interagir ensemble, permettant leur fixation sur des gènes cibles communs. Le recrutement de PRC2 au niveau de locus spécifiques peut également être régulé par la présence d'autres modifications post-traductionnelles (PTMs) d'histones (H3K36me3 ou H3K9me3), de facteurs de transcription ou encore de long ARN non codants (lncRNA) tels que Xist

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

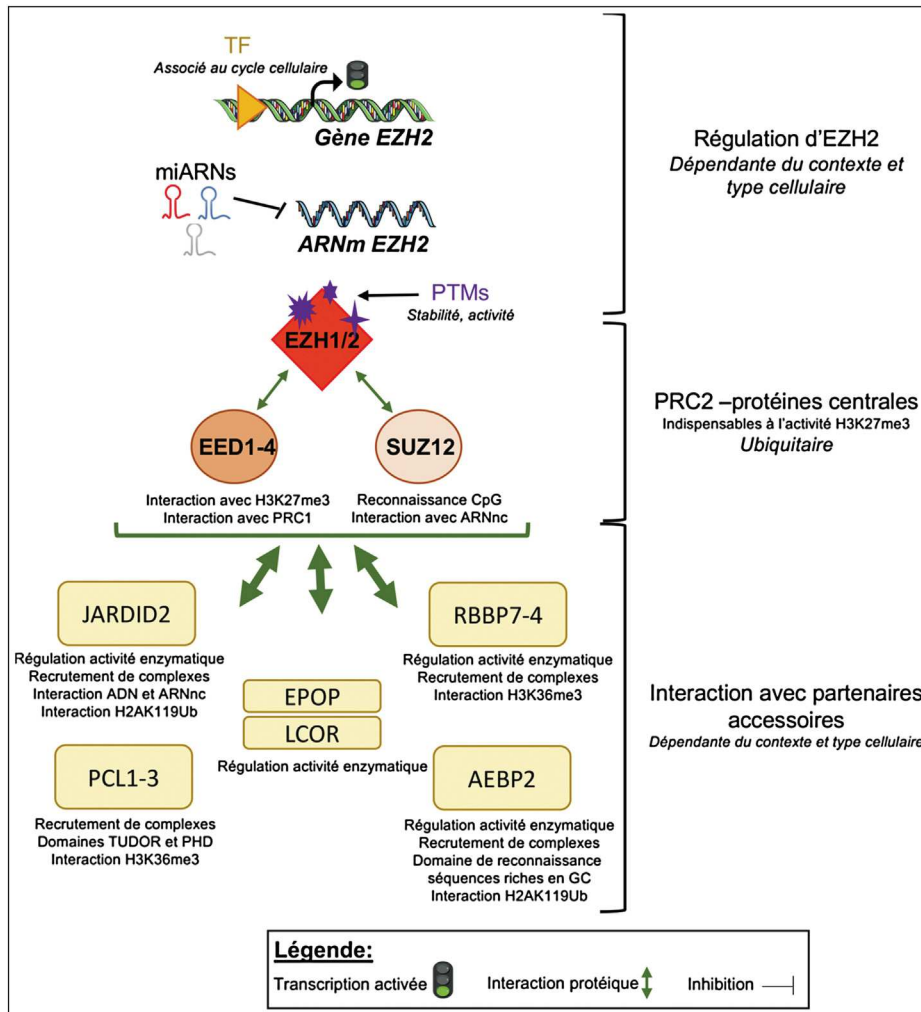


FIGURE 1
Régulation et partenaires d'EZH2 — Alors que l'expression d'EZH2 peut être régulée de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, la stabilité et l'activité de l'enzyme peuvent être modulées via diverses modifications post-traductionnelles. EZH2, EED et SUZ12 sont les protéines centrales du complexe PRC2, et interagissent avec des protéines « accessoires » conférant au complexe des propriétés complémentaires

ou HOTAIR [1-4]. PRC2 est également capable d'interagir avec l'ARN de manière aspécifique, c'est-à-dire indépendamment de leur séquence. Au niveau des gènes réprimés, la fixation de PRC2 sur des transcrits d'ARN abortifs pourrait permettre le maintien des complexes Polycomb et stabiliser la répression transcriptionnelle en cas d'initiation aberrante de la transcription [12]. Par ailleurs, les transcrits naissant produits à partir de gènes actifs pourraient interagir avec PRC2 et constituer un leurre bloquant les interactions entre PRC2 et la chromatine. Ce mécanisme pourrait ainsi protéger les gènes transcrits de l'activité répressive des complexes Polycomb. Lorsqu'un signal déclenche le recrutement de facteurs répresseurs, la transcription serait alors inhibée et

PRC2 pourrait ainsi intervenir et réprimer de manière plus stable l'expression du gène en question. Ce modèle suggère que la fonction principale de PRC2 serait de maintenir, et non d'initier, la répression de la transcription (figure 2) [3,13]. L'expression d'EZH2 est régulée par différents mécanismes, variables en fonction du type et du contexte cellulaire. De nombreux facteurs de transcriptions (tels que Myc, E2F, HIF-1α ou encore NF-κB) ont été mis en évidence comme étant capables de se fixer sur le promoteur d'EZH2 afin de réguler son expression. L'expression d'EZH2 peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel par des miRNAs, tels que miR-26a, miR-101 ou encore miR-32 [1,14,15]. Pour finir, la stabilité et l'activité d'EZH2 peuvent être

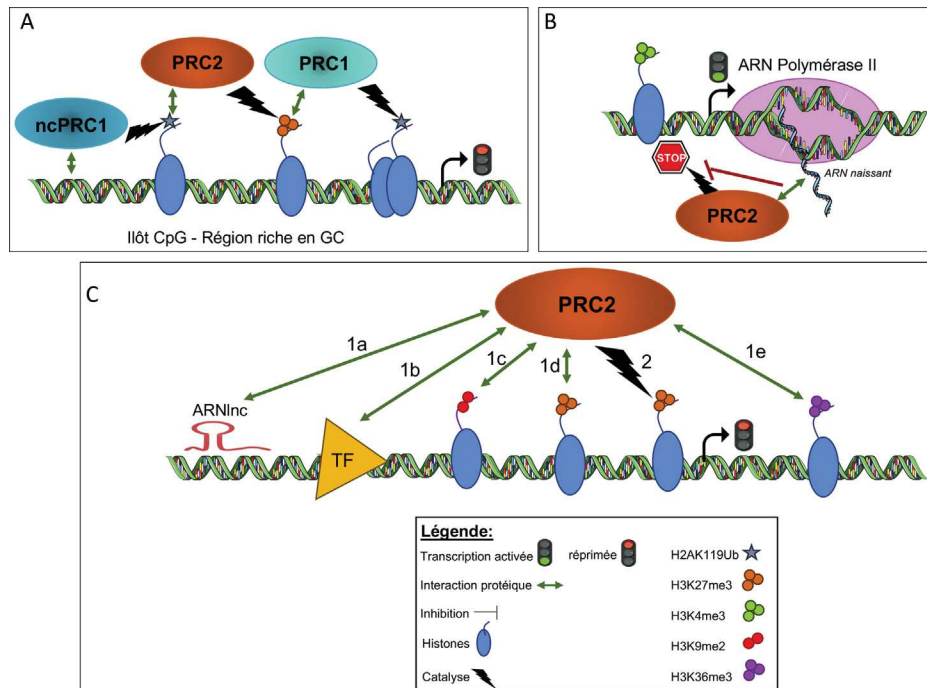


FIGURE 2

Mécanismes de recrutements de PRC2 au niveau de la chromatine. A. Collaboration entre PRC1 et PRC2 pour la répression de l'expression génique. B. Interaction de PRC2 avec les ARNs naissants pour une inhibition d'une répression génique aberrante. C. Recrutement de PRC2 au niveau de la chromatine via des ARNlnc (1a), des facteurs de transcriptions (TF, 1b) ou des modifications d'histones (H3K9me2 = 1c, H3K27me3 = 1d, H3K36me3 = 1e) pour permettre la répression génique via H3K27me3 (2)

modulées au niveau post-traductionnel, grâce à différentes modifications, comme la phosphorylation, l'ubiquitylation ou encore la palmitoylation [16] (figure 1).

EZH2, développement et différenciation

EZH2 joue un rôle primordial dans le développement. En effet, la délétion d'EZH2 chez la souris est létale au stade de gastrulation de l'embryon [17]. Dans les cellules souches embryonnaires et adultes, de nombreuses régions sont enrichies en marques histones H3K27me3 (répressive) et H3K4me3 (activatrice). Cette bivalence indique un état de « pause », et confère un statut actif ou réprimé aux promoteurs de gènes impliqués dans le déterminisme cellulaire et le développement, en fonction des stimuli développementaux. Les régions bivalentes diffèrent en fonction du statut de la cellule. Par exemple, dans les cellules souches pluripotentes, les complexes Polycomb répriment les gènes spécifiques de types cellulaires matures A et B, alors que les gènes nécessaires au maintien de la prolifération et de l'état indifférencié des cellules souches sont continuellement transcrits. Lorsque les cellules souches se différencient, les gènes de pluripotence sont réprimés et les gènes spécifiques de la

nouvelle identité cellulaire A sont activés. Les gènes impliqués dans la différenciation en un type cellulaire B alternatif restent réprimés, permettant aux cellules d'acquérir une seule identité cellulaire et de les protéger de la dé-différenciation ou de la trans-différenciation [1,2,8,9].

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des protéines Polycomb dans l'auto-renouveau et la pluripotence des cellules souches plutôt que leur survie, et dans la spécialisation et le maintien du déterminisme cellulaire [18,19]. EZH2 est ainsi impliqué dans la myogenèse, l'adipogenèse, l'ostéogenèse, la neurogenèse, l'hématopoïèse, la lymphopoïèse, la différenciation épidermale ou encore l'hépatogenèse.

De façon intéressante, seulement un sous-ensemble de gènes régulés par EZH2 devient actif dès la perte de fonction de l'enzyme. La régulation de la transcription par les complexes Polycomb est spécifique à chaque type cellulaire et reflète :

- l'expression de régulateurs et d'effecteurs développementaux ;
- l'expression et le recrutement de partenaires « accessoires » [8].

La présence d'EZH2 au sein du complexe PRC2 est principalement dépendante de l'état prolifératif des cellules. En effet,

plusieurs études ont montré une corrélation entre l'expression d'EZH2 et des marqueurs de prolifération, dans les tissus normaux comme dans les cancers [8]. Les fonctions de cette association sont entre autres :

- le maintien de la marque H3K27me3 au cours de la division cellulaire ;
- la modulation de l'état transcriptionnel des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire [20] ;
- la régulation directe de la réplication de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire [21,22].

À l'inverse, l'expression d'EZH1 est anti-corrélée à la prolifération, et est plus élevée dans les cellules différenciées. L'échange entre EZH2 et EZH1 au sein de complexe PRC2 joue un rôle important lors de la transition de cellules prolifératives vers des cellules différenciées. Une étude récente a montré que la perturbation de ce processus pourrait être impliquée dans le développement de lymphomes. Certaines études mettent également en évidence l'effet compensatoire, bien que partiel, d'EZH1 dans le cadre de la perte d'expression d'EZH2 [23-26]. EZH2 et EZH1 jouent aussi un rôle important dans le processus de sénescence cellulaire. Ainsi, en réprimant l'expression de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire (INK4A/ARF, CDKN2A), EZH2 et EZH1 protègent les cellules souches somatiques et les cellules différenciées de l'entrée en sénescence [27-31]. La perte de ces méthyltransférases dans ces types cellulaires entraîne une diminution globale de H3K27me3 associée à un arrêt du cycle cellulaire, puis la sécrétion de facteurs solubles associés à la sénescence.

EZH2 joue un rôle dans la formation des centres germinatifs et la différenciation plasmocytaire

Les plasmocytes sont des cellules hautement spécialisées représentant l'étape finale de la différenciation des cellules B. Ils jouent un rôle important dans l'immunité humorale grâce à leur capacité à synthétiser et sécréter les anticorps protégeant l'organisme hôte contre de potentielles infections [32]. Après stimulation par un antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, une partie des cellules B naïves va subir une expansion clonale rapide et massive, formant ainsi le centre germinatif dans les follicules ganglionnaires. Les processus de maturation des immunoglobulines (mutations hypersomatiques et commutation isotypique) vont permettre la formation d'anticorps hautement spécifiques contre l'antigène. À la suite de cette phase proliférative, une partie des cellules va alors se différencier en plasmablastes, puis en plasmocytes à courte ou longue durée de vie. Il s'agit de la réponse humorale primaire. L'autre partie des cellules va acquérir l'identité de cellules B mémoires, jouant un rôle important dans la réponse humorale secondaire, et permettant une mise en place des défenses immunitaires plus rapide. En effet, l'activation des cellules B mémoires entraîne leur différenciation en plasmocytes, en

passant par deux stades intermédiaires : les pré-plasmablastes, cellules hautement prolifératives, puis en cellules immatures sécrétrices d'antigènes, les plasmablastes [33].

Du point de vue transcriptionnel, la différenciation des cellules B en plasmocytes est associée à des changements coordonnés et conséquents de leur profil d'expression génique [34], classés en deux catégories principales : la perte de transcrits associés aux cellules B et l'acquisition d'un programme génique de plasmocytes. Ces changements sont guidés par deux groupes de facteurs de transcription (TF) spécifiques de chaque stade se réprimant entre eux :

- les TF de cellules B (PAX5, BCL6 et BACH2) maintiennent l'identité des cellules B ;
- et les TF de plasmocytes (IRF4, BLIMP-1, XBP-1) sont requis pour inhiber les gènes identitaires B et activer un programme de cellules sécrétrices d'anticorps [34,35].

Bien que le rôle de ce réseau complexe de TF dans la différenciation plasmocytaire (PCD) ait été investigué, les mécanismes de régulation transcriptionnel clés de la PCD restent peu connus. Un nombre croissant d'études a mis en évidence le rôle important d'EZH2 dans la formation des centres germinatifs et dans PCD.

En effet, EZH2 est fortement exprimé dans les cellules B du centre germinatifs et les plasmablastes, suggérant un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et la division des lymphocytes [36-39]. EZH2 régule en effet différents processus dans les cellules B du centre germinatif (GC). EZH2 supporte la prolifération, de manière dépendante [37,38,40] et indépendante [36] à la régulation transcriptionnelle des inhibiteurs du cycle cellulaire (CDKN1A, CDKN1B). EZH2 protège également les cellules de l'apoptose induite par les dommages à l'ADN médiés par l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase) [36]. Un nombre plus important de domaines bivalents (H3K4me3 et H3K27me3) a été observé dans les cellules B du GC comparativement aux cellules B naïves, confirmant l'état transitionnel de ces cellules. EZH2 réprime ainsi de manière transitoire la différenciation des cellules B en inhibant des gènes clés normalement exprimés dans les plasmocytes (IRF4, BLIMP1). Ces gènes sont notamment impliqués dans la sortie de la réaction GC, induits par CD40, IRF4, IL10 et NF- κ B, et exprimés dans les plasmocytes [37]. Une partie des gènes réprimés par EZH2 dans ce contexte sont également des cibles de BCL6 [36]. En effet, il a été démontré que le complexe PRC1 non canonique, via la protéine CBX8, est capable de se fixer sur H3K27me3 des promoteurs bivalents de novo, alors que BCL6 et BCOR sont directement recrutés sur l'ADN et stabilise le complexe PRC1-BCOR. Cette collaboration permet et est nécessaire à la répression transitoire efficace d'une partie des gènes bivalents impliqués dans la PCD (IRF4, BLIMP1, CDKN1A) [41]. De façon intéressante, des études ont montré qu'une mutation activatrice d'EZH2 pouvait conduire à une hyperplasie des GC et pourrait participer à la

lymphomagenèse [36,37,42], soulignant l'importance de la régulation fine de l'expression de cette protéine pendant le processus de différenciation plasmocytaire.

E2F1 induit de manière directe l'expression d'EZH2 dans les cellules B du GC. EZH2 est à son tour capable d'activer E2F1 en induisant la phosphorylation de Rb via la répression de l'expression de CDKN1A. La régulation de la prolifération par EZH2 pourrait donc aussi se faire de manière indirecte via l'activation d'E2F1 [40]. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence le rôle important du facteur de transcription de la famille NF- κ B c-Rel dans la régulation positive de l'expression d'EZH2 dans les lymphocytes B activés [43]. Une étude récente sur un modèle murin montre le rôle d'EZH2 dans la production et la fonction des plasmocytes. Les auteurs montrent dans un premier temps que les cellules sécrétrices d'anticorps expriment fortement EZH2. Ce résultat est pour le moins surprenant étant donné qu'EZH2 a été montré comme étant exprimé majoritairement dans des cellules hautement prolifératives, ce qui n'est pas le cas des plasmocytes matures. Par ailleurs, comme observé dans d'autres études, la faible quantité de plasmocytes produits après activation de cellules B déficientes pour EZH2 est en partie liée à la diminution du nombre de division due à la surexpression de gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire (CDKN1A). EZH2 est également impliqué dans la répression du programme transcriptionnel de cellules B matures dans les plasmocytes, dont la majorité est aussi réprimé par BLIMP-1, tels que les gènes *CIITA*, *BCL6* ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'inflammation médiée par NF- κ B [44]. EZH2 est par ailleurs responsable de la régulation de gènes impliqués dans la réponse UPR, dans la glycolyse et dans la phosphorylation oxydative dans les plasmocytes. Ces mécanismes facilitant la sécrétion des anticorps, EZH2 joue ainsi un rôle majeur dans la fonction primaire des plasmocytes (figure 3) [44].

EZH2 : une cible thérapeutique dans certains cancers, notamment le myélome multiple

EZH2 dans les cancers

Une surexpression d'EZH2 a été mise en évidence dans de nombreux cancers. Dans les tumeurs solides, la forte expression d'EZH2 est associée à l'agressivité tumorale, le développement métastatique, un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements. Le caractère oncogénique d'EZH2 dépend de son activité méthyltransférase et de sa capacité à réprimer l'expression des gènes. La surexpression d'EZH2 entraîne en effet une augmentation du niveau global de H3K27me3 et une répression des gènes impliqués dans la différenciation des cellules souches cancéreuses, tels que p16 et p19, et de gènes suppresseurs de tumeurs. EZH2 est plus fortement exprimé dans les cellules souches cancéreuses et semble également participer au maintien de leur capacité d'auto-renouvellement et de leur caractère tumorigène [45].

Des mutations activatrices d'EZH2 ont été mises en évidence dans différents types de lymphomes. Ces mutations se trouvent sur le domaine catalytique d'EZH2 au niveau de la tyrosine 641 (Y641N, F, S, ou H), l'alanine 677 (A677G) et l'alanine 687 (A687V). D'un point de vue mécanistique, l'enzyme non mutée permet la conversion initiale de H3K27 non méthylé en H3K27me1/2, alors que le mutant d'EZH2 catalyse de manière aberrante la triméthylation [46-51]. Tout comme la surexpression, ce gain de fonction confère aux cellules tumorales un avantage prolifératif et une capacité accrue à former des métastases [46-51].

Par ailleurs, des délétions, des mutations indel, non sens et faux sens ou des modifications post-traductionnelles inactivant EZH2 ont été identifiés dans les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, les leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T et les leucémies aiguës myéloïdes. La perte de fonction d'EZH2 dans ces cancers est associée au développement tumoral, et révèle la fonction de suppresseur de tumeur d'EZH2 [46,47,52,53].

Plusieurs autres mutations d'EZH2 ont été décrites dans des tumeurs solides, mais les conséquences sur la fonction de l'enzyme restent à être décrites [54].

D'autres mutations affectant l'histone H3, d'autres membres des complexes Polycomb et des facteurs reconnaissant ou régulant H3K27me3 ont été mis en évidence dans d'autres cancers, et pourraient altérer l'activité d'EZH2 et la répartition génomique globale de H3K27me3 [1,2,8,9].

EZH2 comme cible pour le traitement du Myélome Multiple

Le myélome multiple (MM), un cancer affectant les plasmocytes, est la seconde hémopathie la plus fréquente après les lymphomes non Hodgkinien. Il représente 1,7 % des néoplasies et 10-13 % des hémopathies malignes en 2017. Le MM est une maladie hétérogène tant au niveau moléculaire qu'au niveau clinique. Ainsi, malgré les avancées notables dans la compréhension de la maladie ainsi que dans sa prise en charge, le MM reste malheureusement une pathologie sans traitement définitif dans la majorité des cas.

Le rôle d'EZH2 dans la physiopathologie du MM a été suggéré il y a plus de 10 ans, et le nombre d'études sur son potentiel oncogène ne cesse d'augmenter. Un regain d'intérêt a été observé pour le ciblage thérapeutique d'EZH2 dans le MM depuis ces 5 dernières années avec l'arrivée d'inhibiteurs spécifiques utilisables en clinique.

EZH2 est significativement surexprimé dans les cellules tumorales de MGUS (gammopathie monoclonale de signification indéterminée) et de MM par rapport aux plasmocytes normaux [55], en association avec la perte d'expression des gènes cibles de H3K27me3 [56]. Une forte expression d'EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans deux cohortes indépendantes de patients au diagnostic. EZH2 est également plus fortement

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

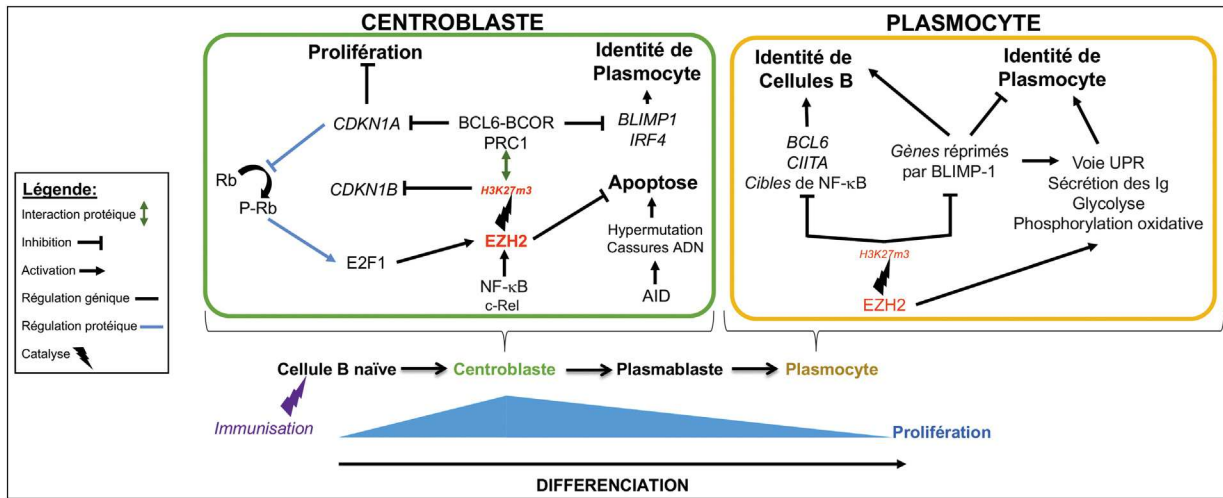


FIGURE 3

EZH2 dans le myélome multiple — EZH2 joue un rôle important dans la physiopathologie du MM en régulant la survie et la croissance cellulaire des cellules tumorales, et en modulant la balance ostéoblastes/ostéoclastes. L'inhibition d'EZH2 représente une stratégie thérapeutique potentielle dans le MM, seul ou en combinaison avec des traitements conventionnels

exprimé chez les patients de mauvais pronostic du sous-groupe moléculaire Prolifératif (PR), son expression étant significativement corrélée avec l'index de prolifération (PI) des cellules tumorales des patients [57]. Aussi, les gènes associés à H3K27me3 uniquement dans les cellules tumorales, comparés aux plasmocytes normaux sont plus fortement réprimés chez les patients de stade plus avancé de la maladie et de mauvais pronostic [58]. Croonquist et al. ont montré que l'expression d'EZH2 est induite par l'IL6 dans les lignées cellulaires humaines de MM (HMCLs) ayant une dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, et est constitutive dans les lignées indépendantes à l'IL6. Aussi, la surexpression ectopique d'EZH2 favoriserait l'indépendance des cellules de MM aux facteurs de croissances [59,60]. Une étude montre, quant à elle, qu'EZH2 est principalement surexprimé dans une sous-population de cellules de MM, caractérisée par leur capacité à exporter le colorant Hoechst, l'expression de CD138, une prolifération active et le potentiel d'induire une tumeur. Le bortezomib semble altérer significativement la prolifération de ces cellules en corrélation avec la diminution du niveau protéique d'EZH2 [61].

EZH2, via son activité méthyltransférase, joue un rôle dans la régulation de la prolifération et la viabilité des cellules de MM. En effet, la déplétion d'EZH2 par ARN interférence [59,60] ou l'inhibition de son activité méthyltransférase avec des inhibiteurs chimiques spécifiques (EPZ-6438, UNC1999, GSK343, EPZ005687) [57,58,62-64] et non spécifiques (Triptolide, DZNep) [56,65-67] induit une diminution de la prolifération d'un sous-groupe de HMCLs et de MMCs de patients. Les cellules s'accumulent en phase G0/G1 avant d'entrer en apoptose via un mécanisme partiellement caspase-dépendant. Cet effet est moindre lorsqu'EZH2 est inhibé dans des cellules sanguines

mononucléées de donneurs sains ou des cellules stromales de la moelle osseuse [57]. De plus, l'inhibition d'EZH2 dans des HMCLs, avant ou après xénotransplantation, sur des modèles murins, a permis de mettre en évidence l'effet anti-tumoral du traitement et le caractère oncogénique d'EZH2 dépendant de son activité méthyltransférase [59,60,62,64]. Comme décrit précédemment dans d'autres types de tumeurs, la perte globale de H3K27me3 est observée dès 3 jours de traitement, alors que l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur la croissance varie en fonction de l'inhibiteur, de la dose utilisée et de la durée de traitement [57,58,62,63]. Il est important de noter que les données de certaines études ont été obtenues après utilisation de l'inhibiteur UNC1999, inhibant les enzymes EZH2 et EZH1, et non EZH2 uniquement. Cet inhibiteur semble avoir un effet à plus court terme sur les MMCs comparativement aux molécules inhibant spécifiquement EZH2. Ainsi, alors que l'inhibition d'EZH1 ou EZH2 seuls induit un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose tardive, l'inhibition des deux simultanément provoque une mort cellulaire plus rapide [64].

L'analyse des profils d'expression des gènes cibles de l'inhibiteur d'EZH2 montre une variabilité de réponse en fonction des lignées traitées, indépendamment de l'effet sur leur prolifération. Par ailleurs, une majorité des gènes dérégulés sont sur-exprimés, en accord avec le caractère répressif de H3K27me3 [62]. EZH2 semble être responsable de la répression directe via H3K27me3 de gènes suppresseurs de tumeur et impliqués dans la différenciation et dans l'activation indirecte d'oncogènes. En effet, l'équipe d'Helena Jernberg-Wiklund montre qu'un inhibiteur d'EZH2 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques (tels que ID1, ID2, SOX2, SORL1) et réprime l'expression d'oncogènes importants dans le myélome (tels que CD69, JUNB, XBP1, IRF4,

BLIMP1 et c-Myc) [58,63]. Ce même traitement diminue l'expression de miARNs ayant des rôles oncogéniques dans le MM, réprimant des gènes suppresseurs de tumeurs et favorisant l'angiogenèse : les clusters miR-17-92 et miR-106b-25 potentiellement régulés par c-Myc, et les membres de la famille Let7. Les oncogènes sous-exprimés après inhibition d'EZH2 sont pour la plupart des cibles de miARNs potentiellement suppresseurs de tumeur dans le MM, surexprimés après traitement par l'inhibiteur d'EZH2 et associés à H3K27me3 et EZH2 dans les HMCLs et les MMCs de patients. En effet, BLIMP1, IRF4 et XBP1 sont des cibles des miR-125a et miR-320c, alors que c-Myc est la cible du miR-494. De façon intéressante, les miR-198, miR-601, miR125a-3p et miR-320c ont été identifiés comme étant également réprimés par la méthylation de l'ADN dans le MM, et réactivés après traitement avec des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN [63,68,69]. La coopération potentielle des deux marques répressives au niveau de suppresseurs de tumeurs pourrait être un moyen d'assurer une pression de sélection permettant une meilleure survie des cellules. Il serait intéressant d'étudier plus amplement ce mécanisme de « double répression », qui pourrait être impliqué dans d'autres cancers [63]. Une étude plus récente montre qu'EZH2 est capable de réprimer l'expression de gènes inhibiteurs du cycle tels que CDKN2B (p15) et CDKN1A (p21), soit via la surexpression de c-MYC ou directement via H3K27me3 [57]. Hernando et al., quant à eux, mettent en évidence la répression directe de gènes épithéliaux suppresseurs de tumeurs par EZH2. L'inhibition de l'enzyme résulte en une capacité d'adhésion accrue et un changement morphologique des cellules de MM [62]. L'inhibition d'EZH2 pourrait également avoir un intérêt dans la régulation du micro-environnement des cellules de MM et l'amélioration des signes cliniques en lien avec la qualité de vie des patients atteints de MM. En effet, des lésions ostéolytiques caractérisent la maladie chez 80 % des patients atteints de MM. Ce phénotype est dû à l'inhibition constante de la différenciation ostéoblastique par les MMCs. L'absence de différenciation des ostéoblastes semble perdurer même après rémission, c'est-à-dire élimination complète des MMCs. Chez les patients atteints de MM, la répression du gène *RUNX2* par le facteur de transcription GFI1 en complexe avec EZH2, HDAC1 et LSD1 induirait une inhibition de la différenciation ostéoblastique [70]. L'inhibition d'EZH2 ou de HDAC1 permet la réexpression de *RUNX2*, et de ce fait l'induction de la différenciation normale des ostéoblastes [70]. EZH2 est également impliqué dans la répression d'IRF8, un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse. EZH2 favoriserait donc la différenciation des ostéoclastes [71]. La surexpression d'EZH2 dans les cellules du micro-environnement tumoral pourrait donc être impliquée dans le développement des lésions osseuses caractéristiques de la maladie [71]. L'inhibition d'EZH2 dans ce contexte pourrait permettre d'inhiber la dégradation tout en favorisant la reconstruction osseuse chez les patients atteints de MM.

La sensibilité des HMCLs et MMCs de patients aux inhibiteurs d'EZH2 est hétérogène [58,62]. La réponse ne semble pas être corrélée au temps de doublement des cellules, ni au niveau basal protéique de EZH2 ou H3K27me3 [57], ni à la perte de H3K27me3 après inhibition de l'enzyme [62]. La balance entre les différentes marques d'histones permet une régulation fine de l'expression des gènes et est indispensable au maintien de l'homéostasie des cellules saines. Un déséquilibre peut induire ou participer au développement tumoral et contribuer au maintien du phénotype malin. La corrélation entre l'expression d'EZH2 et celle de la méthyltransférase MMSET (multiple myeloma SET domain), capable de catalyser H3K36me2, est présente dans de nombreux cancers [72]. EZH2 est capable de réprimer différents miARNs ciblant MMSET (miR-26a, miR-31 and miR-203), promouvant ainsi le développement tumoral [72]. Dans le MM, la surexpression de MMSET dans le sous-groupe moléculaire *t* (4 ; 14) induit une perte globale de H3K27me3, une augmentation du recrutement d'EZH2 et H3K27me3 au niveau de certains loci, et une sensibilité accrue aux inhibiteurs d'EZH2 [73]. Ces résultats suggèrent que la répression de ces gènes par EZH2, dans ce contexte précis, est importante dans la physiopathologie du MM [73], et que la sensibilité aux inhibiteurs d'EZH2 dépend fortement de l'expression de MMSET. La délétion ou mutation d'UTX, l'enzyme responsable de la déméthylation de H3K27 promeut la prolifération, la clonogénicité, l'adhésion et la capacité à former de nouvelles tumeurs des cellules de MM. Une étude récente a montré que la perte d'UTX confère une sensibilité accrue des cellules de MM aux inhibiteurs d'EZH2 *in vitro* et *in vivo* [74]. L'inhibition d'EZH2 dans ce contexte induit l'expression de BCL6, menant à la diminution de l'expression d'IRF4 et c-MYC, deux facteurs de transcription indispensables à la survie et la prolifération des cellules tumorales de MM [74]. Malgré la plausibilité des résultats présentés, ces deux études se basent seulement sur la comparaison de deux lignées de MM. Deux études récentes n'observent cependant aucune corrélation entre la sensibilité des HMCLs et MMCs de patients à l'inhibiteur d'EZH2 et les statuts d'UTX ou de MMSET [57]. L'inhibition d'EZH2 étant une approche thérapeutique efficace pour un sous-groupe de patients de mauvais pronostic, il paraît nécessaire de développer un biomarqueur permettant de prédire, avant traitement, la sensibilité des patients aux inhibiteurs d'EZH2. Dans ce contexte, notre laboratoire a récemment développé un biomarqueur, nommé EZ-score, basé sur l'expression de 15 gènes cibles d'EZH2 dans le MM, permettant de séparer les patients sensibles des patients résistants à l'EPZ-6438. Un tel biomarqueur permettra de déterminer, avant traitement, si un patient serait susceptible de répondre favorablement aux inhibiteurs d'EZH2 [75] (Brevet EP16306436.3). L'utilisation en clinique d'inhibiteurs d'EZH2 dans le MM ne pourra cependant se faire qu'en association avec les agents thérapeutiques conventionnels. Il est donc important d'évaluer

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

le rationnel biologique des combinaisons sur la survie des cellules tumorales. Une étude récente révèle une synergie entre le bortezomib et un inhibiteur d'EZH2 et EZH1. Les auteurs démontrent que le bortezomib induit la perte du recrutement d'E2F1 au niveau du promoteur d'EZH2, provoquant ainsi une diminution de son expression. De façon intéressante, le bortezomib n'affecte pas le niveau protéique de EZH1 et H3K27me3, et la répression d'EZH2 n'a pas lieu dans les cellules résistantes au bortezomib. Aussi, une forte expression d'EZH2 participerait à la résistance des cellules de MM au bortezomib. En accord avec cette affirmation, le bortezomib semble moins efficace chez les patients ayant une plus forte expression d'EZH2. L'inhibition d'EZH2 et EZH1 agit en synergie avec le bortezomib ou le carfilzomib sur des HMCLs, des MMCs de patients (avec un effet moindre sur les cellules de donneurs sains), et sur un modèle murin de xénogreffe. L'inhibition d'EZH2 et EZH1 permet également de surmonter la résistance des cellules résistantes au bortezomib. Cette re-sensibilisation est moins importante si seulement EZH2 est inhibé. Rizq et al. proposent pour finir que les deux molécules agirait en coopération pour réprimer l'oncogène majeur du MM, c-MYC [64].

Dimopoulos et al. ont, quant à eux, montré une synergie entre le lenalidomide, un inhibiteur d'EZH2 et un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, ainsi qu'une re-sensibilisation des cellules résistantes au lenalidomide. Les auteurs ont observé une répression globale des gènes et une compaction globale de la chromatine dans les cellules résistantes au lenalidomide comparé aux cellules sensibles. Le traitement des cellules

présentant une résistance, intrinsèque comme acquise, avec un inhibiteur d'EZH2 et/ou un inhibiteur de la méthylation de l'ADN restaure le paysage épigénétique des HMCLs ainsi que leur sensibilité aux IMiDs [76]. En accord avec cette étude, notre équipe a récemment mis en évidence une synergie similaire entre l'inhibiteur d'EZH2 et le lenalidomide, via la régulation de gènes favorisant la prolifération des cellules de MM [75]. Dans ces études, les inhibiteurs épigénétiques sont administrés en prétraitement, quelques jours avant le traitement conventionnel, suggérant la nécessité d'un remaniement épigénétique pour que la synergie avec les agents conventionnels puisse avoir lieu.

Une autre étude présente néanmoins une potentielle contre-indication concernant une combinaison d'inhibiteurs d'EZH2 avec la dexaméthasone, la doxorubicine, le 4-hydroxycyclophosphamide et le melphalan. En effet, il semblerait que l'inactivation de l'activité méthyltransférase d'EZH2 via sa phosphorylation sur la sérine S21 est un processus intervenant dans la résistance aux drogues mettant en jeu l'adhésion cellulaire dans le MM. Ainsi, dans ce contexte, l'inhibition d'EZH2 mime ce type de résistance, et a un effet antagoniste en association avec différentes drogues conventionnelles du MM citées précédemment. La sensibilité des cellules devenues résistantes peut être rétablie via l'inhibition de la kinase responsable de la phosphorylation d'EZH2 [77]. Il est important de noter que le modèle utilisé dans cette étude est un modèle in vitro mimant l'adhésion cellulaire, et utilisant seulement deux HMCLs. Il serait donc nécessaire de confirmer ces résultats sur des cellules primaires de patients (figure 4) [77].

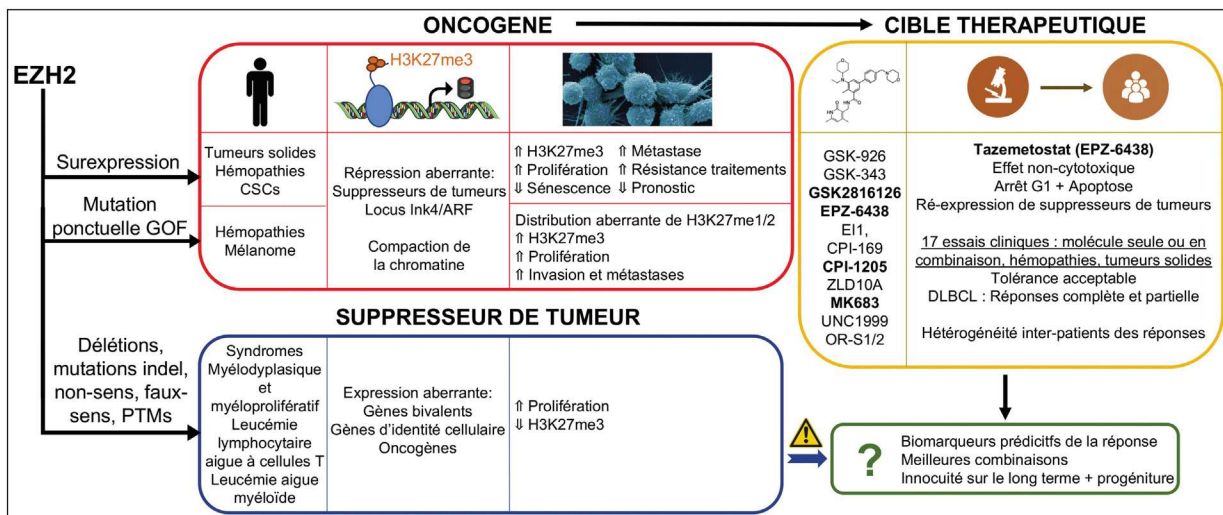


FIGURE 4

EZH2 joue un rôle dans la différenciation des cellules B en plasmocytes — Dans les centroblastes, EZH2 régule la prolifération en inhibant des inhibiteurs du cycle cellulaire, protège les cellules de l'apoptose et réprime l'expression de facteurs de transcription plasmocytaires. Dans les plasmocytes, EZH2 inhibe les facteurs de transcription caractérisant l'identité des cellules B et régule divers mécanismes associés aux cellules sécrétrices d'anticorps

EZH2 comme cible thérapeutique dans différents types de cancers

Du fait de son caractère oncogénique décrit dans plusieurs types de tumeurs, EZH2 représente une cible thérapeutique potentielle. De nombreux inhibiteurs spécifiques d'EZH2 (notamment GSK-926, GSK-343, EPZ-005687, EPZ-6438, EI1, CPI-169, ZLD10A...) ont ainsi été développés et présentent un effet significatif sur la prolifération et la survie des cellules tumorales in vitro [78-81]. Des études précliniques sur le model murin montrent que ces inhibiteurs améliorent de manière significative le pronostic des souris en induisant une réduction nette de la masse tumorale, sans effets secondaires majeurs [9,80,82-84]. Plusieurs inhibiteurs d'EZH2 sont actuellement testés dans différents essais cliniques, notamment dans les tumeurs solides et les lymphomes, seuls ou en

combinaison avec les traitements conventionnels (tableau 1) [9,80]. Les molécules GSK2816126 et Tazemetostat sont des inhibiteurs compétitifs de EZH2 altérant son interaction avec le cofacteur donneur de groupement méthyl SAM (S-Adénosylméthionine) [81], alors que la molécule MAK683 cible l'interaction de l'enzyme avec son partenaire au sein du complexe PRC2, EED (embryonic ectoderm development) [85]. Bien qu'ayant obtenu des résultats précliniques prometteurs, le composé GSK2816126, seul ou en combinaison, présente une faible efficacité chez les patients atteints de lymphomes, de tumeurs solides et de myélome multiple. Face à cet échec, les essais cliniques utilisant cette molécule n'ont pas été poursuivis. Les essais cliniques utilisant les molécules MK683 et CPI-1205 sont en cours, et aucun résultat n'a été publié à ce jour.

TABLEAU 1
Essais cliniques avec des inhibiteurs d'EZH2 en cancérologie

| Composé | Stratégie | Type de tumeur | Phase | Pays | Identifiant |
|-------------------------|---------------------|--|------------|--|-------------|
| CPI-1205 | Seul | Lymphome à cellules B | Phase 1 | États-Unis | NCT02395601 |
| CPI-1205 | Combinaison | Cancer prostatique résistant à la castration métastaté | Phase 1b/2 | États-Unis | NCT03480646 |
| GSK2816126 | Seul | Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) Lymphome folliculaire transformé (LF) Autres lymphomes non hodgkinien Tumeurs solides Myélome multiple (MM) | Phase 1 | États-Unis, France, Grande-Bretagne (GB) | NCT02082977 |
| MAK683 (inhibiteur EED) | Seul | DLBCL | Phase 1/2 | États-Unis, Canada, France, Hong-Kong, Japon, Singapore | NCT02900651 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Tumeurs pédiatriques des tissus mous Tumeurs rhabdoïdes Tumeur INI1 négative Sarcome synovial Tumeur rhabdoïde maligne de l'ovaire | Phase 1 | États-Unis, Australie, Canada, Danemark, France, Allemagne, Italie, GB, Pays-Bas | NCT02601937 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Tumeur rhabdoïde maligne Tumeur rhabdoïde du rein Tumeur rhabdoïde tératoïde atypique Tumeurs ayant des caractéristiques rhabdoïdes Sarcome synovial Tumeurs INI1-négative Tumeur rhabdoïde maligne de l'ovaire Carcinome médullaire du rein Sarcome épithéloïde Chordome peu différencié Tumeur solide avec mutation GOF d'EZH2 | Phase 2 | États-Unis, Australie, Belgique, Canada, France, Allemagne, Italie, Taiwan, GB | NCT02601950 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul + biomarqueurs | Mutations EZH2, SMARCB1 ou SMARCA4 Sujet jeune (1-21 ans) Tumeurs solides Désordres histiocytaires Lymphomes non hodgkinien | Phase 2 | États-Unis | NCT03213665 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul + biomarqueurs | Disfonctionnement hépatique, cancer métastaté Tumeurs solides Lymphome à cellules B | Phase 1 | Canada | NCT03217253 |

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

TABLEAU I (Suite).

| Composé | Stratégie | Type de tumeur | Phase | Pays | Identifiant |
|-------------------------|----------------------------|---|-----------|--|-------------|
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Lymphome à cellules B Tumeurs solides | Phase 1 | GB | NCT03010982 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Combinaison | Lymphome à cellules B Tumeurs solides | Phase 1 | États-Unis | NCT03028103 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul et combinaison | Lymphome à cellules B Tumeurs solides | Phase 1/2 | États-Unis, Australie, Canada, France, Allemagne, Italie, Pologne, Taiwan, Ukraine, GB | NCT01897571 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul + biomarqueurs | Cancer des ovaires Cancer de l'endomètre Carcinome péritonéal primitif | Phase 2 | États-Unis | NCT03348631 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Etude roll-over DLBCL FL Tumeur rhabdoïde maligne Tumeur rhabdoïde du rein Tumeur rhabdoïde térétoïde atypique Sarcome synovial Sarcome épithéloïde Chordome peu différencié Mésothéliome Tumeurs solides | Phase 2 | États-Unis, France | NCT02875548 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Combinaison | Cancer du poumon non à petites cellules, métastaté | Phase 1/2 | États-Unis, Australie France, Corée du Sud Espagne, GB | NCT03337698 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Mésothéliome malin | Phase 2 | États-Unis, France, GB | NCT02860286 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Tumeurs IN1-négative Sarcome synovial (réfractaire/rechute) | Phase 2 | États-Unis, Australie, Belgique, Canada, France, Allemagne, Italie, Taiwan, GB | NCT02601950 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Combinaison + biomarqueurs | Tumeurs pédiatriques Tumeurs solides Désordres histiocytaires Lymphomes non hodgkinien | Phase 2 | États-Unis | NCT03155620 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Lymphomes non hodgkinien à cellules B (réfractaire/rechute) | Phase 1 | Japon | NCT03009344 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Seul | Mutation EZH2 Lymphomes non hodgkinien à cellules B (réfractaire/rechute) | Phase 2 | Japon | NCT03456726 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Combinaison | DLBCL FL (réfractaire/rechute) | Phase 1 | États-Unis, France, Allemagne, Italie, GB | NCT02220842 |
| Tazemetostat (EPZ-6438) | Combinaison | DLBCL | Phase 1/2 | France | NCT02889523 |

Le Tazemetostat (ou EPZ-6438) est l'inhibiteur d'EZH2 le plus prometteur à l'heure actuel, étant testé dans de nombreux cancers adultes et pédiatriques dans le cadre d'essais cliniques (> 16 essais cliniques).

Les essais cliniques utilisant cette molécule présentent des résultats encourageant dans les lymphomes et les tumeurs rhabdoïdes pédiatriques [86], alors que les effets du Tazemetostat sur les gliomes pédiatriques sont moins convaincants [87]. Au cours de la phase 1 de l'essai clinique, 38 % des patients présentant un lymphome non Hodgkinien ont présenté des réponses complètes ou partielles [88]. Aussi, les tumeurs présentant des mutations activatrices d'EZH2 semblent être plus

efficacement affectées que les tumeurs exprimant la protéine sauvage. Cinquante-huit pour cent des patients traités avec la dose de Tazemetostat recommandée pour la phase 2 ont obtenu des réponses significatives. Les effets secondaires les plus communs après traitement avec Tazemetostat sont de faible grade et comprennent des nausées, une thrombocytopénie, une anémie et une neutropénie. L'innocuité de l'utilisation du Tazemetostat a donc pu être validée chez les patients atteints de lymphomes ou de tumeurs solides [88].

D'après ces résultats, l'inhibition d'EZH2 semble être une stratégie thérapeutique plus qu'encourageante pour le traitement de nombreux types de cancers caractérisés par une surexpression ou

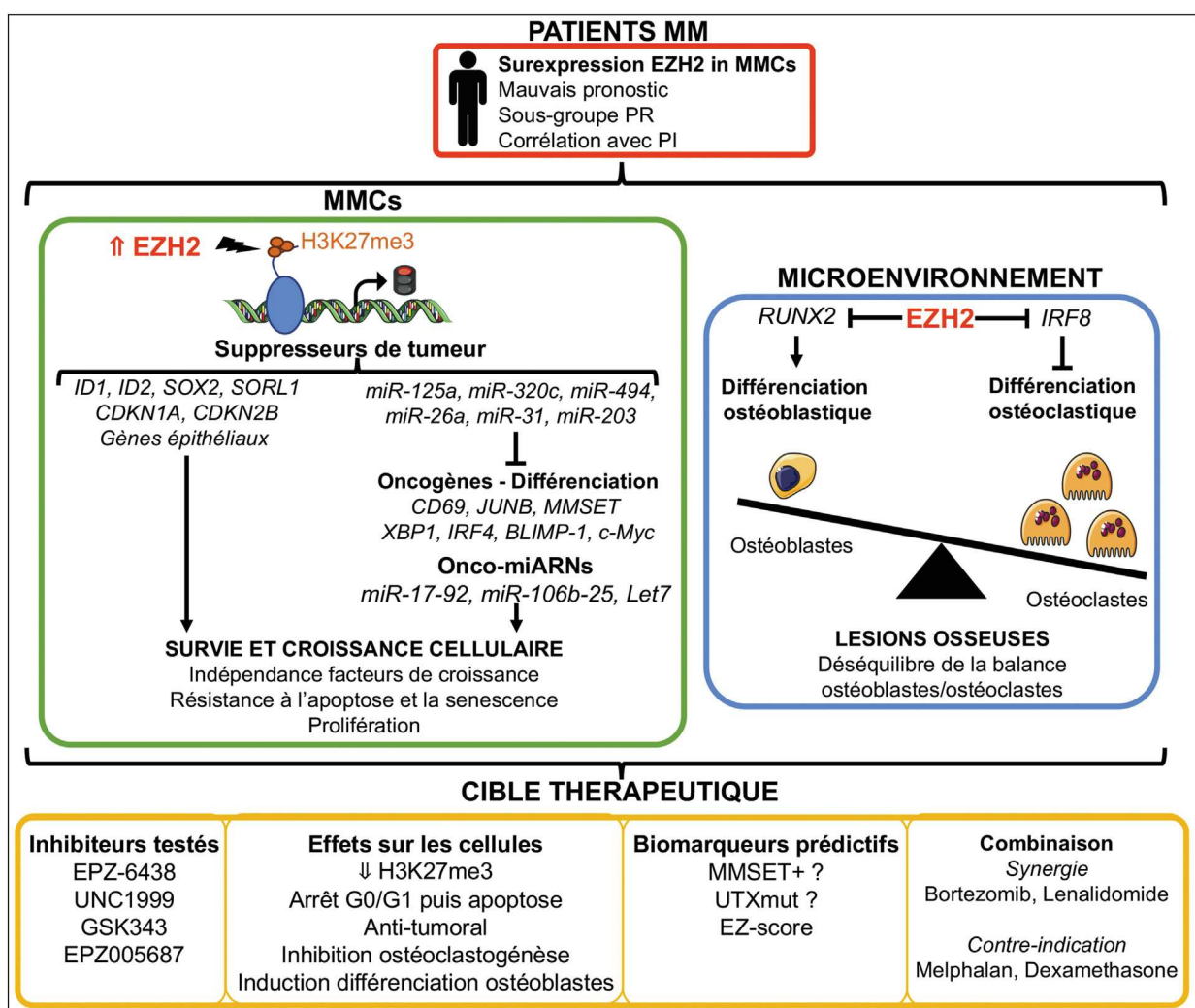


FIGURE 5

EZH2 comme cible thérapeutique dans différents types de cancers — EZH2 peut être surexprimé ou muté dans plusieurs types de cancers, lui conférant un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur en fonction du contexte cellulaire. Son caractère oncogénique a été ciblé de manière thérapeutique grâce à de nombreux inhibiteurs. Les essais cliniques utilisant de Tazemetostat présentent pour l'heure des résultats encourageant, mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser son utilisation chez les patients

une mutation activatrice d'EZH2. En revanche, l'efficacité de l'inhibiteur reste très hétérogène en fonction des modèles *in vitro* utilisés ou des patients traités, et n'est pas associée au niveau d'expression d'EZH2 ni au type de tumeur. Le développement de biomarqueurs permettant de prédire la réponse au traitement des patients est donc nécessaire afin de proposer un traitement efficace et personnalisé pour chaque patient. Aussi, le Tazemetostat, n'étant pas une molécule cytotoxique aux doses utilisées, permet la reprogrammation du paysage épigénétique aberrant des cellules tumorales, et pourrait sensibiliser les cellules malignes à d'autres types d'agents. L'association d'inhibiteurs d'EZH2 avec des agents de chimiothérapies conventionnels ou ciblés pourrait constituer une approche thérapeutique efficace. Cependant, des études sont nécessaires afin de déterminer quelle serait la meilleure combinaison ayant un rationnel biologique et afin de définir un protocole clinique optimal d'administration des drogues.

Des études récentes sur des cellules de lymphome ont mis en évidence l'apparition de mutations secondaires d'EZH2 (mutant et sauvage), conférant aux cellules tumorales un moyen de résister au traitement par le Tazemetostat, dépendant du domaine catalytique de l'enzyme et de son interaction avec SUZ12 et EED [89]. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'EED pourrait permettre, entre autres, de déjouer ce mécanisme de résistance [85]. De plus, EZH1 pourrait conférer aux cellules tumorales un moyen de compenser partiellement l'effet de l'inhibition d'EZH2 [23]. Le traitement de cellules tumorales avec des inhibiteurs spécifiques des deux enzymes (UNC-1999, OR-S1 ou OR-S2) permet en effet une amélioration d'efficacité comparativement à l'inhibition d'EZH2 seul [90–92]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si l'efficacité de cette double inhibition provient d'un effet synergique (les deux enzymes ont des fonctions différentes) ou additifs (les deux enzymes sont complémentaires).

Malgré les résultats encourageant des essais précliniques et cliniques, il est important de garder en mémoire que :

- PRC2 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire normale et le maintien de l'identité des cellules matures ;
- EZH2 est un suppresseur de tumeur dans certains contextes et types cellulaires ;
- EZH2 contrôle l'activité antitumorale des T CD8⁺ mémoires.

Ainsi, bien que l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur le paysage épigénétique puisse être réversible [7], l'utilisation systémique de ce type de molécule au lieu d'une approche plus ciblée pourrait avoir des effets délétères sur la fonction des cellules normales. L'utilisation de tels inhibiteurs, notamment chez les sujets jeunes, pourrait ainsi représenter un bénéfice sur le court terme (guérison), mais les effets sur les cellules saines sur le long terme devront être étudiés. Une étude récente effectuée chez la souris a mis en évidence une modulation irréversible de l'épigénome des ovocytes, induite par le Tazemetostat, et met en garde contre les effets potentiellement délétères pour les patientes traitées avec un inhibiteur d'EZH2 désirant avoir des enfants [93]. Le développement d'anticorps monoclonaux conjugués ciblant les cellules tumorales ou leur micro-environnement et délivrant la molécule inhibant EZH2 à proximité des cellules ciblées pourrait représenter une stratégie alternative intéressante (figure 5).

Financements

Ce travail est supporté par l'INCA (PLBIO15-256), ITMO Cancer (MM&TT) et le Labex EpiGenMed.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Gan L, Yang Y, Li Q, Feng Y, Liu T, Guo W. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res* 2018;6(1) [cited 2018 Apr 17; Internet; available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-018-0122-2>].
- [2] Schuettengruber B, Bourbon H-M, Di Croce L, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting. *Cell* 2017;171(1):34–57.
- [3] Aranda S, Mas G, Di Croce L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv* 2015;1(11):e1500737.
- [4] Ishak CA, Marshall AE, Passos DT, White CR, Kim SJ, Cecchini MJ, et al. An RB-EZH2 complex mediates silencing of repetitive DNA sequences. *Mol Cell* 2016;64(6):1074–87.
- [5] Li H, Liefke R, Jiang J, Kurland JV, Tian W, Deng P, et al. Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature* 2017;549(7671):287–91.
- [6] Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, et al. Genome-wide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 2008;4(10):e1000242.
- [7] Højfeldt JW, Laugesen A, Willumsen BM, Damhofer H, Hedehus L, Tvardovskiy A, et al. Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. *Nat Struct Mol Biol* 2018;25(3):225–32.
- [8] Wassef M, Margueron R. The multiple facets of PRC2 alterations in cancers. *J Mol Biol* 2017;429(13):1978–93.
- [9] Pan M-R, Hsu M-C, Chen L-T, Hung W-C. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell Mol Life Sci* 2017 [cited 2017 Jul 24; Internet; available from: <http://www.link.springer.com/10.1007/s00018-017-2596-8>].
- [10] Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LLP, et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* 2014;157(6):1445–59.
- [11] Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP, et al.

- Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep* 2014;7(5):1456–70.
- [12] Wang X, Paucek RD, Gooding AR, Brown ZZ, Ge EJ, Muir TW, et al. Molecular analysis of PRC2 recruitment to DNA in chromatin and its inhibition by RNA. *Nat Struct Mol Biol* 2017;24(12):1028–38.
- [13] Kaneko S, Son J, Shen SS, Reinberg D. PRC2 binds to active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells; 2014;19.
- [14] Lee S-R, Roh Y-G, Kim S-K, Lee J-S, Seol S-Y, Lee H-H, et al. Activation of EZH2 and SUZ12 regulated by E2F1 predicts the disease progression and aggressive characteristics of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(23):5391–403.
- [15] Xiao J. MiR-32 functions as a tumor suppressor and directly targets EZH2 in human oral squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit* 2014;20:2527–35.
- [16] Lu H, Li G, Zhou C, Jin W, Qian X, Wang Z, et al. Regulation and role of post-translational modifications of enhancer of zeste homolog 2 in cancer development. *Am J Cancer Res* 2016;6(12):2737.
- [17] Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development* 2013;140(12):2525–34.
- [18] Bracken AP. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 2006;20(9):1123–36.
- [19] Collinson A, Collier AJ, Morgan NP, Sienerth AR, Chandra T, Andrews S, et al. Deletion of the polycomb-group protein EZH2 leads to compromised self-renewal and differentiation defects in human embryonic stem cells. *Cell Rep* 2016;17(10):2700–14.
- [20] Martinez A-M, Cavalli G. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 2006;5(11):1189–97.
- [21] Piunti A, Rossi A, Cerutti A, Albert M, Jammula S, Scelfo A, et al. Polycomb proteins control proliferation and transformation independently of cell cycle checkpoints by regulating DNA replication. *Nat Commun* 2014;5 [cited 2018 Apr 18; Internet; available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms4649>].
- [22] Picard F, Cadoret J-C, Audit B, Arneodo A, Alberti A, Battail C, et al. The spatiotemporal program of DNA replication is associated with specific combinations of chromatin marks in human cells. *PLoS Genet* 2014;10(5) [cited 2018 Apr 18; Internet; available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006723/>].
- [23] Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 2008;32(4):503–18.
- [24] Abdalkader L, Oka T, Takata K, Sato H, Murakami I, Otte AP, et al. Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms. *Pathology (Phila)* 2016 [cited 2016 Jun 22; Internet; available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003130251634908X>].
- [25] Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, et al. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. *Blood* 2015;126(10):1172–83.
- [26] Xu J, Shao Z, Li D, Xie H, Kim W, Huang J, et al. Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. *Mol Cell* 2015;57(2):304–16.
- [27] Jie B, Weilong C, Ming C, Fei X, Xinghua L, Junhua C, et al. Enhancer of zeste homolog 2 depletion induces cellular senescence via histone demethylation along the INK4/ARF locus. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;65:104–12.
- [28] Hidalgo I, Herrera-Merchan A, Ligos JM, Carramolino L, Nuñez J, Martínez F, et al. Ezh1 is required for hematopoietic stem cell maintenance and prevents senescence-like cell cycle arrest. *Cell Stem Cell* 2012;11(5):649–62.
- [29] Kheradmand Kia S, Solaimani Kartalaei P, Farahbakhshian E, Pourfarzad F, von Lindern M, Verrijzer CP. EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 2009;2:16.
- [30] Tzatsos A, Paskaleva P, Lymperi S, Contino G, Stoykova S, Chen Z, et al. Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J Biol Chem* 2011;286(38):33061–69.
- [31] Ito T, Teo YV, Evans SA, Neretti N, Sedivy JM. Regulation of cellular senescence by polycomb chromatin modifiers through distinct DNA damage- and histone methylation-dependent pathways. *Cell Rep* 2018;22(13):3480–92.
- [32] Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol* 2004;16(2):226–34.
- [33] Jourdan M, Caraux A, Caron G, Robert N, Fiol G, Reme T, et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J Immunol* 2011;187(8):3931–41.
- [34] Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15(3):160–71.
- [35] Shaffer AL, Lin K-I, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17(1):51–62.
- [36] Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P-L, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2013;123(12):5009–22.
- [37] Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 2013;23(5):677–92.
- [38] Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 2010;116(24):5247–55.
- [39] Raaphorst FM, van Kemenade FJ, Fieret E, Hamer KM, Satijn DPE, Otte AP, et al. Cutting edge: polycomb gene expression patterns reflect distinct B cell differentiation stages in human germinal centers. *J Immunol* 2000;164(1):1–4.
- [40] Béguelin W, Rivas MA, Calvo Fernández MT, Teater M, Purwada A, Redmond D, et al. EZH2 enables germinal center formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun* 2017;8(1) [cited 2018 Apr 4; Internet; available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01029-x>].
- [41] Béguelin W, Teater M, Gearhart MD, Calvo Fernández MT, Goldstein RL, Cárdenas MG, et al. EZH2 and BCL6 cooperate to assemble CBX8-BCOR complex to repress bivalent promoters, mediate germinal center formation and lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2016;30(2):197–213.
- [42] Berg T, Thoene S, Yap D, Wee T, Schoeler N, Rosten P, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood* 2014;123(25):3914–24.
- [43] Neo WH, Lim JF, Grumont R, Gerondakis S, Su I-H. c-Rel regulates Ezh2 expression in activated lymphocytes and malignant lymphoid cells. *J Biol Chem* 2014;289(46):31693–707.
- [44] Guo M, Price MJ, Patterson DG, Barwick BG, Haines RR, Kania AK, et al. EZH2 represses the B cell transcriptional program and regulates antibody-secreting cell metabolism and antibody production. *J Immunol* 2018;200(3):1039–52.
- [45] Wen Y, Cai J, Hou Y, Huang Z, Wang Z. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget* 2017;8(23) [cited 2018 Mar 27; Internet; available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/16467>].
- [46] Iwama A. Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. *Blood* 2017.
- [47] Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B, Moreaux J. EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget* 2016;7(3):2284.

Rôle de EZH2 comme biomarqueur dans le traitement personnalisé du myélome multiple

- [48] Ryan RJH, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, et al. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS ONE* 2011;6(12):e28585.
- [49] Ott HM, Graves AP, Pappalardi MB, Huddleston M, Halsey WS, Hughes AM, et al. A687V EZH2 is a driver of histone H3 lysine 27 (H3K27) hypertrimethylation. *Mol Cancer Ther* 2014;13(12):3062-73.
- [50] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010;42(2):181-5.
- [51] McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(8):2989-94.
- [52] Shirahata-Adachi M, Iriyama C, Tomita A, Suzuki Y, Shimada K, Kiyoi H. Altered EZH2 splicing and expression is associated with impaired histone H3 lysine 27 trimethylation in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2017;63:90-7.
- [53] Göllner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, Schenk T, Klein H-U, Rohde C, et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2016 [cited 2016 Dec 15; Internet; available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4247>].
- [54] Yan K-S, Lin C-Y, Liao T-W, Peng C-M, Lee S-C, Liu Y-J, et al. EZH2 in cancer progression and potential application in cancer therapy: a friend or foe? *Int J Mol Sci* 2017;18(6):1172.
- [55] Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99(5):1745-57.
- [56] Kalushkova A, Fryknäs M, Lemaire M, Fristedt C, Agarwal P, Eriksson M, et al. Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma. *PLoS ONE* 2010;5(7):e11483.
- [57] Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, Stein CK, Walters Z, Aronson LI, et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J* 2017;7(3):e549.
- [58] Agarwal P, Alzrigat M, Párraga AA, Enroth S, Singh U, Ungerstedt J, et al. Genome-wide profiling of histone H3 lysine 27 and lysine 4 trimethylation in multiple myeloma reveals the importance of Polycomb gene targeting and highlights EZH2 as a potential therapeutic target. *Oncotarget* 2016;7(6):6809.
- [59] Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 2005;24(41):6269-80.
- [60] Croonquist PA. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. *Blood* 2003;102(7):2581-92.
- [61] Nara M, Teshima K, Watanabe A, Ito M, Iwamoto K, Kitabayashi A, et al. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS ONE* 2013;8(3):e56954.
- [62] Hernando H, Gelato KA, Lesche R, Beckmann G, Koehr S, Otto S, et al. EZH2 inhibition blocks multiple myeloma cell growth through upregulation of epithelial tumor suppressor genes. *Mol Cancer Ther* 2016;15(2):287-98.
- [63] Alzrigat M, Párraga AA, Agarwal P, Zureigat H, Österborg A, Nahi H, et al. EZH2 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *Oncotarget* 2016 [cited 2017 Apr 6; Internet; available from: https://www.researchgate.net/profile/Mohammad_Alzrigat/publication/312021585_EZH2_inhibition_in_multiple_myeloma_downregulates_myeloma_associated_oncogenes_and_upregulates_microRNAs_with_potential_tumor_suppressor_functions/links/58694b7008ae8f3ce4917d807.pdf].
- [64] Rizq O, Mimura N, Oshima M, Saraya A, Koide S, Kato Y, et al. Dual inhibition of EZH2 and EZH1 sensitizes PRC2-dependent tumors to proteasome inhibition. *Clin Cancer Res* 2017 [clicancer.2735.2016].
- [65] Zhao F, Chen Y, Zeng L, Li R, Zeng R, Wen L, et al. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells. *Eur J Pharmacol* 2010;646(1-3):1-11.
- [66] Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 2009;8(6):1579-88.
- [67] Xie Z, Bi C, Cheong LL, Liu SC, Huang G, Zhou J, et al. Determinants of sensitivity to DZNep induced apoptosis in multiple myeloma cells. *PLoS ONE* 2011;6(6):e21583.
- [68] Bi C, Chung T-H, Huang G, Zhou J, Yan JJ, Fonseca R, et al. Genome-wide pharmacologic unmasking identifies tumor suppressive microRNAs in multiple myeloma. *Oncotarget* 2015;6(28) [cited 2018 Apr 29; Internet; available from: <http://www.oncotarget.com/full-text/4769>].
- [69] Zhang W, Wang YE, Zhang Y, Leleu X, Reagan M, Zhang Y, et al. Global epigenetic regulation of microRNAs in multiple myeloma. *PLoS ONE* 2014;9(10):e110973.
- [70] Adamik J, Jin S, Sun Q, Zhang P, Weiss KR, Anderson JL, et al. EZH2 or HDAC1 inhibition reverses multiple myeloma-induced epigenetic suppression of osteoblast differentiation. *Mol Cancer Res* 2017;15(4):405-17.
- [71] Fang C, Qiao Y, Mun SH, Lee MJ, Murata K, Bae S, et al. Cutting edge: EZH2 promotes osteoclastogenesis by epigenetic silencing of the negative regulator IRF8. *J Immunol* 2016;196(11):4452-6.
- [72] Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell* 2013;49(1):80-93.
- [73] Popovic R, Martinez-Garcia E, Giannopoulou EG, Zhang Q, Zhang Q, Ezponda T, et al. Histone methyltransferase MMSET/NSD2 alters EZH2 binding and reprograms the myeloma epigenome through global and focal changes in H3K36 and H3K27 methylation. *PLoS Genet* 2014;10(9):e1004566.
- [74] Ezponda T, Dupéré-Richer D, Will CM, Small EC, Varghese N, Patel T, et al. UTX/KDM6A loss enhances the malignant phenotype of multiple myeloma and sensitizes cells to EZH2 inhibition. *Cell Rep* 2017;21(3):628-40.
- [75] Herviou L, Kassambara A, Boireau S, Robert N, Requirand G, Vincent L, et al. Targeting EZH2 in multiple myeloma could be promising for a subgroup of MM patients in combination with IMiDs. *Blood* 2016;128(22):311.
- [76] Dimopoulos K, Søgaard Helbo A, Fibiger Munch-Petersen H, Sjø L, Christensen J, Sommer Kristensen L, et al. Dual inhibition of DNMTs and EZH2 can overcome both intrinsic and acquired resistance of myeloma cells to IMiDs in a cereblon-independent manner. *Mol Oncol* 2018;12(2):180-95.
- [77] Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Izumi T, Hofgaard PO, Bogen B, et al. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. *J Clin Invest* 2015;125(12):4375-90.
- [78] Song X, Zhang L, Gao T, Ye T, Zhu Y, Lei Q, et al. Selective inhibition of EZH2 by ZLD10A blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells proliferation. *Biomed Pharmacother* 2016;81:288-94.
- [79] Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(52):21360-65.
- [80] Gulati N, Béguelin W, Giulino-Roth L. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leuk Lymphoma* 2018;1-12.
- [81] Kuntz KW, Campbell JE, Keilhack H, Pollock RM, Knutson SK, Porter-Scott M, et al. The importance of being me: magic methyls, methyltransferase inhibitors, and the discovery of tazemetostat. *J Med Chem* 2016;59(4):1556-64.
- [82] Campbell JE, Kuntz KW, Knutson SK, Warholc NM, Keilhack H, Wigle TJ, et al. EPZ01989, a potent, orally-available EZH2 inhibitor with robust in vivo activity. *ACS Med Chem Lett* 2015;6(5):491-5.
- [83] Van Aller GS, Pappalardi MB, Ott HM, Diaz E, Brandt M, Schwartz BJ, et al. Long residence

- time inhibition of EZH2 in activated polycomb repressive complex 2. *ACS Chem Biol* 2014;9(3):622-9.
- [84] Kurmasheva RT, Sammons M, Favours E, Wu J, Kurmashev D, Cosmopoulos K, et al. Initial testing (stage 1) of tazemetostat (EPZ-6438), a novel EZH2 inhibitor, by the Pediatric Pre-clinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 2016 [cited 2016 Aug 29; Internet; available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/psc.26218>].
- [85] Huang Y, Zhang J, Yu Z, Zhang H, Wang Y, Lingel A, et al. Discovery of first-in-class, potent, and orally bioavailable embryonic ectoderm development (EED) inhibitor with robust anticancer efficacy. *J Med Chem* 2017;60(6):2215-26.
- [86] Rare tumors in kids may respond to tazemetostat. *Cancer Discov* 2018;8(1):OF5.
- [87] Wiese M, Schill F, Sturm D, Pfister S, Hulleman E, Johnsen S, et al. No significant cytotoxic effect of the EZH2 inhibitor tazemetostat (EPZ-6438) on pediatric glioma cells with wildtype histone 3 or mutated histone 3.3. *Klin Pädiatr* 2016;228(03):113-7.
- [88] Italiano A, Soria J-C, Toulmonde M, Michot J-M, Lucchesi C, Varga A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 2018 [cited 2018 Apr 19; Internet; available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204518301451>].
- [89] Gibaja V, Shen F, Harari J, Korn J, Ruddy D, Saenz-Vash V, et al. Development of secondary mutations in wild-type and mutant EZH2 alleles cooperates to confer resistance to EZH2 inhibitors. *Oncogene* 2016;35(5):558-66.
- [90] Garapaty-Rao S, Nasveschuk C, Gagnon A, Chan EY, Sandy P, Busby J, et al. Identification of EZH2 and EZH1 small molecule inhibitors with selective impact on diffuse large B cell lymphoma cell growth. *Chem Biol* 2013;20(11):1329-39.
- [91] Honma D, Kanno O, Watanabe J, Kinoshita J, Hirasawa M, Nosaka E, et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. *Cancer Sci* 2017 [cited 2017 Aug 16; Internet; available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13326>].
- [92] Konze KD, Ma A, Li F, Barsyte-Lovejoy D, Parton T, MacNevin CJ, et al. An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem Biol* 2013;8(6):1324-34.
- [93] Torano EG, García MG, Fernández-Morera JL, Niño-García P, Fernández AF. The Impact of external factors on the epigenome: in utero and over lifetime. *Biomed Res Int* 2016;2016:1-17.

Résultats

I. Article 1 : EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in human plasma cell differentiation

Laurie Herviou², Michel Jourdan², Anne-Marie Martinez², Giacomo Cavalli², Jerome Moreaux^{1,2,3*}

¹ CHU Montpellier, Department of Biological Hematology, Montpellier, France

² IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

³ Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

Résumé :

Les plasmocytes jouent un rôle majeur dans la défense de l'organisme hôte contre des pathogènes. Nous avons montré que la génération de plasmocytes peut être mimée grâce à l'utilisation d'un système de culture multi-étapes reproduisant la différenciation cellulaire séquentielle telle qu'observée *in vivo*. En utilisant ce modèle unique, nous avons étudié le rôle d'EZH2 dans la différenciation plasmocytaire (PCD) grâce au ChIP-seq H3K27me3 et EZH2. Nous avons par la suite étudié l'effet de l'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 afin de comprendre comment EZH2 peut réguler des fonctions clés impliquées dans la PCD. L'expression d'EZH2 augmente significativement dans les pré-plasmablastes, avec une répression de gènes via H3K27me3 impliqués dans l'identité cellulaire des lymphocytes B et des plasmocytes. EZH2 peut également être recruté en l'absence de H3K27me3 au niveau de promoteurs de gènes actifs au niveau transcriptionnel, connus pour réguler la prolifération cellulaire. L'inhibition de l'activité catalytique d'EZH2 induit un switch du programme transcriptionnel de cellules B vers celui de plasmocytes, associé à l'induction de la maturation des plasmocytes et une plus forte sécrétion d'immunoglobuline. Nos données suggèrent qu'EZH2 est impliqué dans le maintien d'un état pré-plasmablastique transitoire, immature et prolifératif nécessaire à leur amplification.

Soumis au journal Leukemia en juillet 2018

1 **EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in**
2 **human plasma cell differentiation**

3

4 Laurie Herviou², Michel Jourdan², Anne-Marie Martinez², Giacomo Cavalli², Jerome
5 Moreaux^{1,2,3*}

6

7 ¹ CHU Montpellier, Department of Biological Hematology, Montpellier, France

8 ² IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

9 ³ Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

10

11

12

13

14

15 Corresponding author:
16 Jerome MOREAUX,
17 Laboratory for Monitoring Innovative Therapies
18 Department of Biological Hematology
19 Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier
20 80, av. Augustin Fliche
21 34295 Montpellier Cedex 5
22 IGH - Institute of Human Genetics
23 UMR 9002, CNRS and University of Montpellier
24 <http://www.igh.cnrs.fr/>
25 phone: +33 (0)4 67 33 79 03
26 fax: +33 (0)4 67 33 70 36
27 mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

28

29

30 **Abstract**

31

32 Plasma cells (PCs) play a major role in the defense of the host organism against
33 pathogens. We have shown that PC generation can be modeled using multi-step
34 culture systems reproducing the sequential cell differentiation occurring *in vivo*. Using
35 this unique model, we investigated the role of EZH2 during PC differentiation (PCD)
36 using H3K27me3 and EZH2 ChIP-sequencing. We then studied the effect of EZH2
37 enzymatic activity inhibition in order to understand how EZH2 regulates key functions
38 involved in PCD.

39 EZH2 expression significantly increases in preplasmablasts with H3K27me3
40 mediated repression of genes involved in B cell and plasma cell identity. EZH2 was
41 also found to be recruited to H3K27me3-free promoters of transcriptionally active
42 genes known to regulate cell proliferation. Inhibition of EZH2 catalytic activity resulted
43 in B to PC transcriptional changes associated with PC maturation induction together
44 with higher immunoglobulin secretion.

45 Altogether, our data suggest that EZH2 is involved in the maintenance of
46 preplasmablast transitory immature proliferative state supporting their amplification.

47

48

49 Introduction

50 Plasma cells (PCs) are highly specialized cells representing the end stage of B cell
51 differentiation. PCs play an important role in humoral immunity by synthesizing and
52 secreting antibodies protecting the host against infections(1). B to PC differentiation
53 is a complex and highly coordinated process. The differentiation of B cells into PC is
54 guided by the hierarchical expression of transcription factors (TFs) and is influenced
55 by the microenvironment(2). B cell master TFs including PAX5, BCL6 and BACH2
56 negatively regulate PC fate-determining TFs. Reciprocally, IRF4, BLIMP1 and XBP1
57 PC TFs are required to suppress the B cell lineage genes as well as to activate the
58 antibody-secreting cell (ASC) program(2,3). Although the role of this complex
59 network of TFs has been investigated, the mechanisms regulating key transcriptional
60 steps in PC differentiation remain poorly known. We have developed a multi-step
61 culture system, modeling B to PC differentiation, where various combinations of
62 cytokines and activation molecules are used to reproduce the sequential PC
63 differentiation occurring in the different organs/tissues *in vivo*. In this culture model,
64 memory B cells (MBCs) differentiate into CD20^{low/-} CD38⁻ preplasmablasts (prePBs),
65 CD20⁻CD38⁺CD138⁻ plasmablasts (PBs), CD20⁻CD38⁺CD138⁺ early PCs and, finally,
66 into long-lived PCs (LLPCs), which may survive and produce continuously high
67 amounts of immunoglobulins (Igs) for months *in vitro*(4–6). PrePBs have been
68 identified in lymph nodes, tonsil and bone marrow in human(6,7). This transitional
69 stage is characterized by the absence of CD20, CD38, and CD138 markers and the
70 coexpression of B and PC TFs, but at a reduced level compared with B cells, PBs, or
71 PC(6). The phenotype of *in vitro*-generated PBs and early PCs is similar to the
72 phenotype of the PBs detected in the peripheral blood (4,6). It is thought that cellular
73 transitions during development are mostly driven by epigenetic and transcriptional
74 changes of a selective group of genes. However, the terminal differentiation of B
75 lymphocytes into PC is a unique process whose epigenetic modifications remain
76 poorly understood.

77 DNA methylation has been shown to be largely remodeled during PC differentiation
78 (PCD). Indeed, B cell engagement toward PC phenotype is associated with cell
79 division-dependent heterochromatin DNA-demethylation, hypermethylation of
80 Polycomb-rich regions and 5-hydroxymethylation of enhancers and genes involved in
81 PCD, such as BLIMP1(8,9). We recently showed that several miRNAs could also

82 participate into the regulation of expression of key transcription factors during PCD,
83 including IRF4, PRDM1, ELL2 and ARID3A(10). Moreover, B cell and PC
84 transcription factors can cooperate with epigenetic enzymes, such as histone
85 deacetylases or methyltransferases, to regulate their target genes (11,12). Enhancer
86 of Zeste Homolog 2 (EZH2), the catalytic subunit of Polycomb Repressive Complex 2
87 (PRC2), is able to trimethylate the lysine 27 in histone H3 (H3K27me3) to repress
88 transcription. EZH2 has been shown to play an important role in germinal center
89 formation in mice. Indeed, EZH2 is overexpressed in germinal center B cells, and
90 induces their proliferation through repression of cell cycle inhibitors, such as
91 CDKN1A and CDKN1B(13–15). It has been suggested that EZH2 protects activated
92 B cells from AID-dependent DNA damage induced apoptosis(16). Moreover, in these
93 cells, EZH2 transiently represses B cell differentiation by inhibiting key PC genes
94 such as IRF4 and BLIMP1(13). EZH2 can also acts as a partner of BCL6 in germinal
95 center cells to repress its target genes(16). In mice, B to PC differentiation is
96 associated with transcriptional and epigenetic regulation related to cell division-
97 coupled chromatin accessibility changes(17). In this study, we aimed to define EZH2
98 target genes and thus understand its role in normal human PC differentiation, using
99 our previously described *in vitro* model(4–6). Our data indicate that EZH2 is
100 overexpressed in the transitional prePBs stage, where it represses both B cell and
101 the PC transcriptional programs. EZH2 inhibition using specific inhibitor EPZ-6438
102 induces an early derepression of mature PC gene signature, leading to an
103 accelerated differentiation of MBC into competent antibody-secreting cells. We
104 purpose a model in which EZH2 is involved in the maintenance of prePBs transitory
105 immature proliferative state to support their amplification.

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117 **Materials and Methods.**

118 **Reagents**

119 Human recombinant interleukin (IL)-2 was purchased from R&D Systems
120 (Minneapolis, MN, USA), interferon-alpha-2b (IFN- α , IntronA) from Merck Canada
121 Inc. (Kirckland, Canada), IL-6, IL-10 and IL-15 from PeproTech (Rocky Hill, NJ,
122 USA). Used antibodies are listed in Supplementary Table 1.

123

124 **Cell samples**

125 Peripheral blood cells from healthy volunteers were purchased from the French
126 Blood Center (Toulouse, France) and CD19+CD27+ MBCs were purified (\geq 95%
127 purity) as described(4).

128

129 **Cell cultures**

130 MBCs were differentiated using a previously described culture protocol(4,6,46). All
131 cultures were performed in Iscove modified Dulbecco medium (Invitrogen, Carlsbad,
132 CA, USA), 10% FCS and 25-35% of Resto-6 cells supernatant. 1.5×10^5 /ml purified
133 peripheral blood MBCs were activated for 4 days by 10 μ g/ml of phosphorothioate
134 CpG oligodeoxynucleotides (ODN) 2006 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 50
135 ng/ml histidine tagged soluble CD40 ligand (CD40L) and 5 μ g/ml of an anti-poly-
136 histidine mAb (R&D Systems) in the presence of 20 U/ml IL-2, 50 ng/ ml IL-10 and
137 10 ng/ml IL-15. The next 3 days, PBs were generated by removing ODN and CD40L
138 and changing the cytokine cocktail (20 U/ml IL-2, 50 ng/ml IL- 6, 50 ng/ml IL-10 and
139 10 ng/ml IL-15). From day 7 to day 10, PBs were differentiated into early PCs by
140 adding 50 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-15, 500 U/ml IFN- α . EPZ-6438 (EPIZYME,
141 Cambridge, MA, USA) was added (1 μ M) at the start of each step and its effects was
142 evaluated by analyzing cell counts and phenotype at the end of each step. mRNA
143 expression data are available at ArrayEx- press (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>,
144 E-MTAB-1771, E-MEXP-2360 and E-MEXP-3034)(4,6).

145

146 **Cell viability**

147 Cell concentration and viability were assessed using the trypan blue dye exclusion
148 assay.

149

150 **Cell cycle analysis**

151 Cycling cells were assessed using DAPI staining (Sigma-Aldrich). S-phase cells were
152 visualized by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. BrdU incubation was carried
153 out for 1 hour before fixation and labeling with an anti-BrdU antibody (APC BrdU flow
154 kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's
155 instructions.

156

157 **Study of apoptosis**

158 After incubation with EPZ-6438 (1uM) or DMSO, cells were washed twice in PBS and
159 apoptosis was assayed with PE-conjugated Annexin V labeling (BD Pharmigen).
160 Fluorescence was analyzed on a LSR Fortessa X20 flow cytometer (Becton
161 Dickinson).

162

163

164 Supplementary informations concerning methodology are included in Supplementary
165 experiment procedures.

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182 **Results**

183 EZH2 is significantly upregulated in preplasmablasts during PCD

184 Affymetrix microarrays were used to assess EZH2 expression in our *in vitro* model of
185 normal PCD (Figure 1A). EZH2 expression is significantly increased in the prePB
186 stage of the PCD ($p < 0.001$) (Figure 1B). Interestingly, other members of PRC2 core
187 complex, like EED or SUZ12, follow the same expression pattern as EZH2 ($p < 0.001$)
188 (Supplementary Figure S1). EZH2 expression at the protein level is 40, 2 and 8 times
189 more elevated in prePBs compared to MBCs, PBs and PCs respectively ($p < 0.001$)
190 and positively correlated with *EZH2* mRNA levels in each population (Figure 1B and
191 1C). Surprisingly, H3K27me3 global levels did not correlate with EZH2 expression
192 levels and were stable during PCD (Supplementary Figure S2). However, the histone
193 methyltransferase EZH1 can also catalyze H3K27me3. Interestingly, EZH1 and
194 EZH2 expression levels were anti-correlated from MBC to PC stage ($p = 0.0035$)
195 (Supplementary Figure S3). This EZH1prePB-specific downregulation could partly
196 explain the relative stability of H3K27me3 levels during PCD while EZH2 is
197 upregulated at this stage.

198

199 EZH2 regulates B cell gene signature during human PCD

200 As a core PRC2 member displays an increased expression in prePBs and in PBs,
201 EZH2 and H3K27me3 chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-
202 Seq) was performed in order to identify their target genes in these cell populations. A
203 genome distribution analysis of EZH2 and its H3K27me3 deposited mark confirmed
204 previously published results showing an enrichment at promoters, intronic and distal
205 intergenic regions (Supplementary Figure S4 and Supplementary Table S2). The
206 specific enrichment of H3K27me3 and EZH2 around transcription start sites (TSSs)
207 (Supplementary Figure S5) also confirmed the known function of PRC2 as a major
208 transcriptional regulator(18). Interestingly, Gene Ontology analysis of H3K27me3-
209 marked genes revealed a significant enrichment of genes involved in developmental
210 processes (Supplementary Figure S6 and Supplementary Table S3). As expected,
211 EZH2 and H3K27me3 are recruited on genes involved in embryonic development,
212 such as the *HOX* gene clusters, and genes regulating neurogenesis or development
213 of other tissues (Supplementary Figure S6). These results therefore confirmed the

214 role of PRC2 in repressing genes involved in developmental processes during cell
215 differentiation (19).

216 Gene expression analysis showed that 30.6% of MBC specific genes were
217 associated with EZH2-associated H3K27me3 in prePBs and PBs. Moreover, these
218 genes were significantly downregulated in prePBs and PBs compared with MBC
219 (Supplementary Figure S8A and Supplementary Table S4). These results suggest
220 that, upon MBC activation, EZH2 represses these genes in prePBs and PBs through
221 H3K27me3 deposition. GSEA pathway analysis demonstrated a significant
222 enrichment of genes involved in negative regulation of proliferation, differentiation
223 and cell death as well as in negative regulation of transcription (Figure 2A and
224 Supplementary Table S4). Notably, H3K27me3-associated repressed genes in
225 prePB/PB were found to be key known B-cell fate genes including *CIITA*, *BAMBI*,
226 *BACH2*, *BCR*, *ID3* or *SMAD3* (Figure 2C).

227 Surprisingly, 21.5% of EZH2-bound promoters were not enriched with H3K27me3
228 repressive histone mark (EZH2o) (Figure 2C and Supplementary Table S2). EZH2o-
229 associated gene promoters were enriched in DNA-binding motifs for transcription
230 factors involved in different processes, notably B cell differentiation, including NFAT,
231 SP1, MYC, c-MYB, SMAD or C/EBP (Supplementary Figure S7 and Supplementary
232 Table S6). Interestingly, *CREB1*, *E2F1*, *GABPβ2*, *c-MYB*, *NFATC3*, *NRF1*, and *YY1*
233 expression positively correlated with *EZH2* expression from MBC to BMPC, whereas
234 *ETS2* and *RORA* expression were anti-correlated to EZH2 levels. HIF1α and EZH2
235 expression significantly anti-correlated from MBC to early PC (Supplementary Figure
236 S7). These data suggest that EZH2 and these transcription factors could potentially
237 regulate a common set of genes involved in PCD.

238 Notably, 13.8% of prePB/PB-up-regulated genes compared with MBC were
239 associated with EZH2o in these cells. These genes were found to be repressed in
240 MBCs and significantly upregulated at early stages of PCD (Supplementary Figure
241 S8B and Supplementary Table S4). Pathway analysis highlighted a significant
242 enrichment of genes upregulated in PC compared with B cells, involved in DNA
243 processes such as DNA repair or chromosome organization, and in cell cycle (Figure
244 2B, 2C and Supplementary Table S5). These results suggest that EZH2 could
245 directly repress a B cell transcriptional program in prePB/PB during cell activation
246 and proliferation induction.

247

248 EZH2 is involved in PC transcriptional program regulation

249 30.5% of PC signature genes were associated with H3K27me3 in prePB/PB. These
250 genes were found to be significantly upregulated in PC compared with prePB/PB
251 (Supplementary Figure S9A and Supplementary Table S4), suggesting that EZH2
252 could participate in PC transcriptional program repression during the more immature
253 stages of the PCD. Pathway analysis revealed that these H3K27me3-associated
254 genes were enriched in key PC IRF4 transcription factor targets (*DUSP5*, *CAV1*,
255 *NFIL3*, *DUSP5*, *CAV1*, *NFIL3*, *UAP1*, *PAM*, *CFLAR*, *FKBP11*, *UBE2J1*, *TIMP2*,
256 *GFPT1*, *SLAMF7*, *BMP6*, *AVPI1*, *CFLAR* and *BSPRY*)(20), cell to cell
257 communication including *SDC1* and immune response (*IFIT5*, *IFIT3*). Moreover,
258 some of these genes were involved in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus
259 functions that play a major role in PC to accommodate the synthesis of secreted Ig
260 (Figure 3A and 3C and Supplementary Table S5). According to these data, EZH2
261 through H3K27me3 appears to participate in key PC transcriptional program
262 regulation including IRF4 targets and Ig secretion stress adaptation.

263 EZH2o-associated gene represented 18% of the genes that were significantly
264 upregulated in prePB/PB and repressed in PC (Supplementary Figure S9B and
265 Supplementary Table S4). These genes were enriched in genes involved in cell
266 cycle, including *CSK* and *MCM5* genes, and in DNA damage repair processes, such
267 as *SSRP1*, *TP53*, *ACD* and *ALKBH2* genes (Figure 3B, 3C and Supplementary
268 Table S5). These results suggest an EZH2 role in repressing key features of PC in
269 prePBs, thus poising differentiation, while associating with active characteristic
270 prePB/PB genes promoting cell proliferation.

271

272 EZH2 targeting affects B to plasma cell gene expression profiles

273 To better understand the role of EZH2 in PCD, the chemical inhibitor EPZ-6438 was
274 used to inhibit its catalytic activity. The drug was added at each step of the *in vitro*
275 system, as illustrated by the chart in Supplementary Figure S10, to avoid any
276 reversibility of the significant drug-induced global H3K27me3 decrease
277 (Supplementary Figures S11 and S12). RNA sequencing of prePBs, PBs and PCs
278 treated or not with EPZ-6438 was performed. In prePBs, 488 genes were significantly
279 activated after treatment, while 143 were repressed (ratio \geq 1.5, FDR \leq 0.05; Figure 4A
280 and Supplementary Table S7). In PBs, 514 genes were upregulated whereas 235
281 were downregulated after treatment (ratio \geq 1.5, FDR \leq 0.05; Figure 4A and

282 Supplementary Table S7). Moreover, only 183 genes (over 488 in prePB and 514 in
283 PB) were commonly activated in prePBs and PBs, while 24 genes were similarly
284 downregulated in both cell types (Supplementary Figure S13 and S14). This high
285 proportion of genes specifically deregulated in one cell stage suggest that EZH2
286 could regulate unique transcriptional programs in prePBs and in PBs, respectively.
287 Interestingly, EPZ-6438 treatment had a more modest effect on the PC
288 transcriptional profile: 42 genes were found upregulated while 12 were repressed
289 (ratio \geq 1.5, FDR \leq 0.05; Supplementary Figure S15 and Supplementary Table S7).
290 Altogether, these data underscore that EZH2 main functions involve the prePB and
291 PB cell stages. Almost all EPZ-6438-activated genes were associated with
292 H3K27me3 in prePBs (84%) and PBs (79%), implying that EZH2 directly represses
293 their expression in immature stages of the PCD (Figure 4D). EPZ-6438-induced gene
294 repression might involve a direct or indirect mechanism. Less than 10% of EPZ-
295 6438-downregulated genes were associated with EZH2 without H3K27me3
296 (Supplementary Table S8). This low percentage suggests that EZH2 regulates
297 expression of those genes mostly indirectly. EZH2-mediated H3K27me3 has been
298 previously shown to repress miRNA expression. Our results show that 458 and 403
299 miRNAs were enriched in H3K27me3 repressive mark in prePBs and PBs
300 respectively (Figure 4B and Supplementary Table S9). Using a previously described
301 R package miRTarget(10), we identified H3K27me3-associated miRNAs validated
302 targets (Supplementary Table S9). Interestingly, 32.2% of EPZ-6438-downregulated
303 genes in prePBs are potential repression targets of H3K27me3-associated miRNAs
304 in prePBs. Similarly, 49.6% of EPZ-6438-downregulated genes in PB might be
305 repressed by H3K27me3-associated miRNAs in prePB, and 46% by H3K27me3-
306 associated miRNAs in PBs (Figure 4B and Supplementary Table S9). Moreover,
307 several of these miRNAs were found to potentially target important B cell
308 transcription factors repressed under EPZ-6438 treatment: PAX5 (miR-1270, miR-
309 4710, miR-3714, miR-4739), MYB (miR-198, miR-429) and CIITA (miR-4257, miR-
310 4270, miR-4739, miR-650) (Supplementary Table S9). Interestingly, none of these
311 miRNAs were previously described as playing a role in PCD(10). EZH2 could also
312 regulate transcription factor expression, which could in turn modulate gene
313 transcription. Binding motif analysis showed that EPZ-6438-repressed genes could
314 be targeted by different transcription factors involved in PCD, including the E2F
315 family, IRF family, MYC, NF- κ B or STAT5A (Figure 4C and Supplementary Table

316 S10). Interestingly, the expression of the transcription factors *RELB* in prePBs and
317 *E2F1*, *E2F7* and *IRF5* in PBs was found to be downregulated, and the expression of
318 the transcription factors *IRF1* in prePB and *CEBPD* in PB was upregulated after EPZ-
319 6438 treatment (Supplementary Table S7). Deregulation of these transcription factors
320 could thus take part in the downregulation of their potential target genes after EPZ-
321 6438 treatment.

322 To further understand the role of EZH2 in prePBs and PBs, we performed GSEA
323 pathway enrichment analysis. EPZ-6438-upregulated genes in prePBs were enriched
324 in STAT5A (such as *CKAP4*, *DDN*, *DUSP5*, *FCGR2A* or *SOCS2*), SMAD2/3
325 (including *NFIL3*, *NT5E* and *SCD*) and TP53 targets, in genes involved in hypoxia
326 (including *DUSP6* and *FILIP1L*), cell death (such as *ANXA1*, *BCL2L11*, *BCL2L14*,
327 *PERP* or *TNFSF10*), cell differentiation (for examples *IRF1* and *STAT1*),
328 communication and proliferation (such as *CGREF1*), and immune response
329 (including *IGHV3-13*, *IFNG* and *TNFSF15*) (Figure 5A and Supplementary Table
330 S11). Genes upregulated in PBs after EPZ-6438 treatment were mostly involved in
331 hypoxia, protein metabolism, cell death (such as *BTG2*, *DAPK2*, *G0S2*, *GADD45A* or
332 *RASSF6*), cell differentiation (such as *CCR1*, *IL6ST* or *RORA*) vesicle transport and
333 cell secretion (including *FCGRT*, *GOLM1*, *RAB26* and *RAB3B*). Moreover, these
334 genes were more highly expressed in mature PC compared with PBs (such as *IL4R*
335 or *MAPKAPK2*). Immunoglobulin genes (including *IGHG1*, *IGHV1-24*, *IGHV5-78*,
336 *IGKV1-33* or *IGKV5-2*) were also found to be significantly upregulated after treatment
337 (Figure 5A and Supplementary Table S11). EPZ-6438-repressed genes in prePBs
338 are involved in cell proliferation (such as *DDR1* or *TELO2*) and pathways involved in
339 B cell activation such as p38 α/β pathway (including *BLK* and *MAPK12*), TNF
340 signaling pathway (such as *TNFRSF13B* or *TNF*), NF- κ B signaling (such as *CD27* or
341 *RELB*), CD40 signaling, and cytokine production (such as *TLR10*). Moreover, specific
342 B cell genes were identified (including *BCL11A*, *CD22*, *CXCR5* and *TLR1*) (Figure 5B
343 and Supplementary Table S10). EPZ-6438-repressed genes in PBs were involved in
344 cell cycle regulation (such as *E2F7*, *CCNA2*, *E2F1* or *AURKB*), DNA replication
345 (including *CDT1*, *POLD1*, *CDC45*, *MCM2* and *MCM5*) and DNA damage response
346 (such as *WHSC1*, *BRCA1*, *PCNA*, *RAD51AP1*). They were found to be also
347 downregulated in mature PCs compared with PBs (Figure 5B and Supplementary
348 Table S10).

349 At a cellular level, EPZ-6438 treatment had no effect on Day 4 cell counts nor cell
350 viability (data not shown). At Day 7 and 10, global cell counts significantly decreased
351 by 46% and 70% respectively (Figure 6A). According to these data, cell viability
352 dropped to 73% and 29% (Figure 6A). EZH2 inhibition induced a significantly
353 increased apoptosis in prePBs (18.5%) and PBs (21,3%) at Day 7, and in PBs
354 (36,3%) and PCs (37,6%) at Day 10 (Figure 6B). Furthermore, EPZ-6438 treatment
355 induced a cell cycle arrest of prePBs and PBs at Day 7 with a significant reduction of
356 BrdU incorporation and an accumulation in the G₀G₁ cell cycle phase (P< 0.05)
357 (Figure 6C). The effect on proliferation was confirmed using CFSE assay, showing a
358 significant decrease of the number of cell divisions in prePBs and PBs at Day 7
359 (Supplementary Figure S16). Interestingly, a decreased number of 53BP1 foci per
360 cell in PBs and PCs was observed at Day 7 and 10 respectively. This data could be
361 the result of the observed cell cycle blockage and thus of a decreased replicative
362 stress (Supplementary Figure S17). Altogether, these results demonstrate a major
363 role of EZH2 in transcriptionally regulating prePBs and PBs proliferation and survival.

364

365 EZH2 inhibition affects plasma cell differentiation through stimulation of maturation

366 Hierarchical clustering analysis of EPZ-6438 deregulated genes highlighted the
367 clustering of EZH2 inhibitor-treated PB with normal untreated PC (Supplementary
368 Figure S18). EPZ-6438 treatment appears to increase PC maturation with a PC gene
369 expression signature in PB. Consistent with this result, a significant decrease of
370 known B cell specific genes expression (including *MYC*, *CD58*, *CD22*, *AICDA*, *CD80*,
371 *CXCR4*, *CD83*, *CIITA*, *CXCR5* and *PAX5*)(1,2,4,21) and an increase of known PC
372 actors (such as *CD274*, *IL10*, *CCR2*, *CD38*, *TET1*, *FRZB*, *ID3*, *IRF1* or *BMI1*)
373 (1,2,4,21) was observed (Supplementary Figure S19). At a cellular level, the
374 percentage of prePBs at Day 4 was not affected by the EPZ-6438 (Figure 7A).
375 Conversely, at Day 7, the percentage of prePBs was significantly reduced whereas
376 PB percentage was significantly increased under EZH2 inhibition compared to control
377 (Figure 7A). Furthermore, PBs expressed higher levels of CD38 at their surface
378 (Figure 7B), suggesting a more advanced differentiation status. At Day 10, the
379 percentage of PBs was significantly reduced, while the percentage of mature PCs
380 increased after EPZ-6438 treatment (Figure 7A) together with a higher CD38 and
381 CD138 expression (Figure 7B) characterizing a more mature state of EPZ-6438
382 treated PCs. Moreover, analysis of immunoglobulin secretion showed a 3-fold

383 increase in IgG secretion at Day 10 after EZH2 inhibition (Figure 7C), while the PC
384 production was only slightly increased (Supplementary Figure S20). IgM production
385 was significantly decreased after treatment in Day 10 PCs (Supplementary Figure
386 S20).

387 These data show that EZH2 inhibition, through an earlier repression of B cell specific
388 genes and genes involved in cell cycle, and upregulation of PC genes, accelerates
389 PC differentiation and Ig secretion (Figure 8).

390

391 **Discussion**

392 PC are rare cells with early differentiation stages taking place in anatomic locations
393 that hamper full biological characterization, particularly in human. Herein, using an *in*
394 *vitro* PCD model, we provide direct evidence that EZH2 is involved in late PC
395 differentiation and biological functions. EZH2 is required for B cells to form germinal
396 centers through repression of cyclin dependent kinase inhibition and control of GC B
397 cell proliferation(15). Here, we demonstrated that EZH2 controls transcriptional
398 changes during PC differentiation controlling B and PC genes through PRC2 and
399 H3K27me3 dependent mechanisms. Currently, the significant induction of EZH2 in
400 the transitional preplasmablastic stage was not documented. We previously
401 described a regulatory network in which miR-106b inhibits the transcription repressor
402 ZBTB4 known to target EZH2 that could explain, at least in part, *EZH2* upregulation
403 in prePBs(10).

404 EZH2 and H3K27me3 are associated with B and PC genes transcriptional repression
405 in prePBs. 30.6% of B cells genes significantly downregulated in prePBs are
406 associated with EZH2-mediated H3K27me3. Among them, key B cell genes were
407 identified including *CIITA*, *BAMBI*, *BACH2*, *BCR*, *ID3* or *SMAD3*. *CIITA* gene
408 expression regulation mediated by EZH2 and H3K27me3 have been reported in Hela
409 cells(22,23). Furthermore, *PAX5*-regulated genes including *ID3*, *BACH2*, *CD47*,
410 *VAV3*, *CD40*, *IGF2*, *FLT3*, *CR2/CD21*, *CD72*, *EBF1*, *FCER2/CD23*, *LEF1* and
411 *CIITA*(24) are significantly downregulated in prePBs in association with EZH2-
412 mediated H3K27me3. *PAX5* and *BCL6* gene expression decreases in prePBs with
413 concomitant *IRF4* and *PRDM1* upregulation(6). However, neither H3K27me3 nor
414 EZH2 were recruited to *PAX5* and *BCL6* promoters. These results underline a role of
415 PRC2 and H3K27me3 in the downregulation of B cell transcriptional program in

416 prePBs. EZH2-mediated H3K27me3 is also involved in concomitant PC
417 transcriptional program repression. These results concur with recent data describing
418 an increased accessibility of a set of primed promoters, associated with H3K27me3,
419 of repressed genes in undivided murine naïve B cells(17). Among H3K27m3-
420 associated genes, we identified IRF4 target genes including *DUSP5*, *CAV1*, *NFIL3*,
421 *UAP1*, *PAM*, *CFLAR*, *FKBP11*, *UBE2J1*, *TIMP2*, *GFPT1*, *SLAMF7*, *BMP6*, *AVPI1*,
422 *CFLAR* and *BSPRY*(20), but not IRF4 itself. Among them, *NFIL3*, *UBE2J1*, *FKBP11*,
423 *ABPI1* and *BSPRY* have been shown to participate in ER stress response and
424 UPR(25–31). UAP1 and GFPT1 are involved in hexosamine pathway that take part in
425 protein quality control mechanisms(32–35). Therefore, PRC2, through H3K27me3,
426 was found to negatively regulate genes that were involved in endoplasmic reticulum
427 and Golgi apparatus functions known to play a key role in PC by accommodating the
428 synthesis of secreted Ig. *XBP1* splicing is essential to support the unfold protein
429 response gene program induction(36). Our team previously highlighted that *XBP1*
430 was mainly expressed as its unspliced isoform in prePBs(6). This PRC2-mediated
431 gene regulation concurs with the prePB status that start to secrete Igs but at a lower
432 level than PBs or PCs(6).

433 PrePBs are highly proliferating cells(6). The repression of B and PC transcriptional
434 programs is associated with the activation of proliferation. Our results underline for
435 the first time a role of EZH2 in PC differentiation poising during the prePB stage
436 through H3K27me3-mediated gene repression, concomitant with a positive activation
437 of proliferation. The proliferation signature is enriched in genes presenting EZH2-
438 bound promoters without H3K27me3. A H3K27me3-independent EZH2-mediated
439 transcriptional activation was previously reported in cancers(37,38). However, further
440 investigations are needed to confirm a direct role of EZH2 in transcriptional gene
441 activation during normal PCD. EZH2 overexpression inhibits DNA damage response
442 pathways, allowing survival of activated GC B-cells during AID-mediated somatic
443 hypermutation of Ig genes(16). We reported a significant enrichment of genes
444 involved in DNA repair associated with EZH2 and active transcription in prePBs that
445 may play a key role to protect them from replicative stress. This data could be of
446 interest to progress in the understanding of the poor outcome related to EZH2
447 overexpression in multiple myeloma(39–41).

448 The differentiation of B cells into PC takes place in a cell-division related manner(42)
449 and is associated with DNA demethylation(43,44). Treatment with 5 azacytidine

450 induces an increase of PC differentiation as reported here with EZH2 inhibitor(43,44).
451 Our results agree with recent data demonstrating an enhanced antibody secreting
452 cell formation for murine naïve B cells in presence of EZH2 chemical inhibition(17). In
453 this context EZH2 participates in the epigenetic mechanisms that could contribute to
454 B to PC differentiation and cell fate selection(45).

455 Inhibition of EZH2 catalytic activity resulted in B to PC transcriptional changes
456 associated with PC maturation induction. EZH2 inhibitor induced proliferation
457 inhibition in prePBs and PBs in addition to cell maturation and higher IgG secretion.
458 However, the total number of PC obtained at day 10 is significantly lower in presence
459 of EZH2 inhibitor. These data suggest that EZH2-mediated transcriptional regulation
460 may be important to support and extend prePB amplification at the cost of PC
461 differentiation. This is consistent with the rapid EZH2 downregulation observed in
462 PBs and PCs together with proliferation inhibition and maturation.

463

464 Our results support a model in which EZH2 is involved in the maintenance of
465 prePBs/PBs transitory immature proliferative state through H3K27me3-dependent
466 gene regulation. Our data provide insight into critical epigenetic-mediated
467 reprogramming events that sustain PC cell fate through cell division and proliferation.

468

469

470 **Author contributions**

471 LH performed research and participated in the writing of the paper.

472 MJ, AMM and GC participated in the research and in the writing of the paper.

473 JM supervised the research and the writing of the paper.

474

475 **Conflict of interest**

476 The authors declare that they have no competing interests.

477

478 **Acknowledgments**

479 This work was supported by grants from French INCA (Institut National du Cancer)
480 Institute (PLBIO15-256), ITMO Cancer (MM&TT) and SIRIC Montpellier (INCa-
481 DGOS-Inserm 6045). LH is supported by a grant from Labex EpiGenMed.

482

483

484

485

486

487 **References**

- 488 1. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev*
489 *Immunol.* 2005 Mar;5(3):230–42.
- 490 2. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-
491 secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15(3):160–71.
- 492 3. Shaffer AL, Lin K-I, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1
493 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell
494 Gene Expression Program. *Immunity.* 2002 Jul;17(1):51–62.
- 495 4. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, et al. An in vitro
496 model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells
497 including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood.* 2009 Dec
498 10;114(25):5173–81.
- 499 5. Jourdan M, Cren M, Robert N, Bolloré K, Fest T, Duperray C, et al. IL-6 supports
500 the generation of human long-lived plasma cells in combination with either
501 APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia.* 2014 Aug;28(8):1647–56.
- 502 6. Jourdan M, Caraux A, Caron G, Robert N, Fiol G, Reme T, et al.
503 Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of
504 Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. *J Immunol.* 2011 Oct
505 15;187(8):3931–41.
- 506 7. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE,
507 et al. Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic
508 Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell.* 2013
509 Sep;24(3):289–304.
- 510 8. Barwick BG, Scharer CD, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is
511 coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. *Nat*
512 *Immunol* [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2016 Aug 16]; Available from:
513 <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3519>
- 514 9. Caron G, Hussein M, Kulis M, Delaloy C, Chatonnet F, Pignarre A, et al. Cell-
515 Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal
516 Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Rep.* 2015
517 Nov;13(5):1059–71.
- 518 10. Kassambara A, Jourdan M, Bruyer A, Robert N, Pantesco V, Elemento O, et al.
519 Global miRNA expression analysis identifies novel key regulators of plasma cell
520 differentiation and malignant plasma cell. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jun
521 2;45(10):5639–52.

- 522 11. Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K. Transcriptional
523 Repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) Involves Recruitment of Histone
524 Deacetylase. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(7):2592–603.
- 525 12. Zan H, Casali P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the
526 Antibody Response. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Dec 14 [cited 2018 Apr 2];6.
527 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677338/>
- 528 13. Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 Is
529 Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote
530 Lymphoid Transformation. *Cancer Cell*. 2013 May;23(5):677–92.
- 531 14. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM,
532 et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes
533 to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*. 2010 Dec 9;116(24):5247–55.
- 534 15. Béguelin W, Rivas MA, Calvo Fernández MT, Teater M, Purwada A, Redmond
535 D, et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of
536 CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Dec
537 [cited 2018 Apr 4];8(1). Available from: [http://www.nature.com/articles/s41467-](http://www.nature.com/articles/s41467-017-01029-x)
538 [017-01029-x](http://www.nature.com/articles/s41467-017-01029-x)
- 539 16. Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P-L, et al.
540 Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes
541 lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2013 Dec 2;123(12):5009–22.
- 542 17. Scharer CD, Barwick BG, Guo M, Bally APR, Boss JM. Plasma cell
543 differentiation is controlled by multiple cell division-coupled epigenetic programs.
544 *Nat Commun* [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2018 May 2];9. Available from:
545 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923265/>
- 546 18. Aranda S, Mas G, Di Croce L. Regulation of gene transcription by Polycomb
547 proteins. *Sci Adv*. 2015 Dec 4;1(11):e1500737–e1500737.
- 548 19. Mallo M, Alonso CR. The regulation of Hox gene expression during animal
549 development. *Development*. 2013 Oct 1;140(19):3951–63.
- 550 20. Shaffer AL, Emre NCT, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, et al. IRF4 addiction
551 in multiple myeloma. *Nature*. 2008 Jul 10;454(7201):226–31.
- 552 21. Kassambara A, Rème T, Jourdan M, Fest T, Hose D, Tarte K, et al.
553 GenomicScape: An Easy-to-Use Web Tool for Gene Expression Data Analysis.
554 Application to Investigate the Molecular Events in the Differentiation of B Cells
555 into Plasma Cells. Miyano S, editor. *PLOS Comput Biol*. 2015 Jan
556 29;11(1):e1004077.
- 557 22. Mehta NT, Truax AD, Boyd NH, Greer SF. Early epigenetic events regulate the
558 adaptive immune response gene CIITA. *Epigenetics*. 2011 Apr;6(4):516–25.
- 559 23. Boyd NH, Morgan JE, Greer SF. Polycomb recruitment at the Class II
560 transactivator gene. *Mol Immunol*. 2015 Oct;67(2):482–91.
- 561 24. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell
562 identity and function. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):463–70.
- 563 25. Taylor GM, Raghuvanshi SK, Rowe DT, Wadowsky RM, Rosendorff A.
564 Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood*. 2011 Nov
565 17;118(20):5528–39.
- 566 26. Elangovan M, Chong HK, Park JH, Yeo EJ, Yoo YJ. The role of ubiquitin-
567 conjugating enzyme Ube2j1 phosphorylation and its degradation by proteasome
568 during endoplasmic stress recovery. *J Cell Commun Signal*. 2017
569 Sep;11(3):265–73.

- 570 27. van Raam BJ, Lacina T, Lindemann RK, Reiling JH. Secretory stressors induce
571 intracellular death receptor accumulation to control apoptosis. *Cell Death Dis.*
572 2017 Oct 5;8(10):e3069.
- 573 28. Mamrosh JL, Lee JM, Wagner M, Stambrook PJ, Whitby RJ, Sifers RN, et al.
574 Nuclear receptor LRH-1/NR5A2 is required and targetable for liver endoplasmic
575 reticulum stress resolution. *eLife* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2018 Jun 1];3.
576 Available from: <https://elifesciences.org/articles/01694>
- 577 29. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic
578 Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol*
579 *Cell Biol.* 2003 Nov 1;23(21):7448–59.
- 580 30. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al.
581 Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. In: *International*
582 *Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2018 Jun
583 1]. p. 215–90. Available from:
584 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124077041000051>
- 585 31. Bensellam M, Maxwell EL, Chan JY, Luzuriaga J, West PK, Jonas J-C, et al.
586 Hypoxia reduces ER-to-Golgi protein trafficking and increases cell death by
587 inhibiting the adaptive unfolded protein response in mouse beta cells.
588 *Diabetologia.* 2016 Jul;59(7):1492–502.
- 589 32. Denzel MS, Storm NJ, Gutschmidt A, Baddi R, Hinze Y, Jarosch E, et al.
590 Hexosamine Pathway Metabolites Enhance Protein Quality Control and Prolong
591 Life. *Cell.* 2014 Mar;156(6):1167–78.
- 592 33. Itkonen HM, Engedal N, Babaie E, Luhr M, Guldvik IJ, Minner S, et al. UAP1 is
593 overexpressed in prostate cancer and is protective against inhibitors of N-linked
594 glycosylation. *Oncogene.* 2015 Jul;34(28):3744–50.
- 595 34. Xiao G, Zhou J, Lu X, Huang R, Zhang H. Excessive UDPG resulting from the
596 mutation of *UAP1* causes programmed cell death by triggering reactive oxygen
597 species accumulation and caspase-like activity in rice. *New Phytol.* 2018
598 Jan;217(1):332–43.
- 599 35. Chaveroux C, Sarcinelli C, Barbet V, Belfeki S, Barthelaix A, Ferraro-Peyret C,
600 et al. Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the
601 GCN2-ATF4 signalling pathway. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jul [cited 2018 Jun
602 1];6(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep27278>
- 603 36. Iwakoshi NN, Lee A-H, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher
604 LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the
605 transcription factor XBP-1. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):321–9.
- 606 37. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 Oncogenic Activity
607 in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent.
608 *Science.* 2012 Dec 14;338(6113):1465–9.
- 609 38. Xu H, Xu K, He HH, Zang C, Chen C-H, Chen Y, et al. Integrative Analysis
610 Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the
611 Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol Cancer Res.* 2016 Feb
612 1;14(2):163–72.
- 613 39. Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste
614 homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the
615 mutant ras phenotype. *Oncogene.* 2005;24(41):6269–6280.
- 616 40. Hernando H, Gelato KA, Lesche R, Beckmann G, Koehr S, Otto S, et al. EZH2
617 Inhibition Blocks Multiple Myeloma Cell Growth through Upregulation of
618 Epithelial Tumor Suppressor Genes. *Mol Cancer Ther.* 2016 Feb 1;15(2):287–
619 98.

- 620 41. Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, Stein CK, Walters Z, Aronson LI, et al.
621 Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis
622 and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J.* 2017 Mar 31;7(3):e549.
623 42. Hasbold J, Corcoran LM, Tarlinton DM, Tangye SG, Hodgkin PD. Evidence from
624 the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms
625 regulate lymphocyte differentiation. *Nat Immunol.* 2004 Jan;5(1):55–63.
626 43. Barwick BG, Scharer CD, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is
627 coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. *Nat*
628 *Immunol.* 2016 Aug 8;17(10):1216–25.
629 44. Barwick BG, Scharer CD, Martinez RJ, Price MJ, Wein AN, Haines RR, et al. B
630 cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA
631 methylation. *Nat Commun [Internet].* 2018 May 15 [cited 2018 May 22];9.
632 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5953949/>
633 45. Duffy KR, Wellard CJ, Markham JF, Zhou JHS, Holmberg R, Hawkins ED, et al.
634 Activation-Induced B Cell Fates Are Selected by Intracellular Stochastic
635 Competition. *Science.* 2012 Jan 20;335(6066):338–41.
636 46. Jourdan M, Robert N, Cren M, Thibaut C, Duperray C, Kassambara A, et al.
637 Characterization of human FCRL4-positive B cells. Richard Y, editor. *PLOS*
638 *ONE.* 2017 Jun 21;12(6):e0179793.
639 47. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat*
640 *Methods.* 2012 Mar 4;9(4):357–9.
641 48. Feng J, Liu T, Zhang Y. Using MACS to Identify Peaks from ChIP-Seq Data.
642 *Curr Protoc Bioinforma Ed Board Andreas Baxevanis Al.* 2011
643 Jun;CHAPTER:Unit2.14.
644 49. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, et al.
645 Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 2008;9(9):R137.
646 50. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al.
647 Bioconductor: open software development for computational biology and
648 bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):1.
649 51. Yu G, Wang L-G, He Q-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP
650 peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics.* 2015 Jul
651 15;31(14):2382–3.
652 52. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR:
653 ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013 Jan 1;29(1):15–21.
654 53. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and
655 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol [Internet].* 2014 Dec
656 [cited 2016 Jul 4];15(12). Available from:
657 <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>
658 54. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P,
659 Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011
660 Jun 15;27(12):1739–40.
661 55. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et
662 al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting
663 genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(43):15545–
664 15550.
665 56. Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chang N-W, Lin Y-L, Liao K-W, et al.
666 miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-
667 target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(Database issue):D296–
668 302.

- 669 57. Hsu S-D, Lin F-M, Wu W-Y, Liang C, Huang W-C, Chan W-L, et al. miRTarBase:
670 a database curates experimentally validated microRNA–target interactions.
671 Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D163–9.
672 58. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource
673 for microRNA–target interactions. Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database
674 issue):D105–10.

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685 **Abbreviations**

686 MBC: memory B cell

687 prePB: preplasmablast

688 PB: plasmablast

689 PC: plasma cell

690 PCD: plasma cell differentiation

691 Ig: immunoglobulin

692 ASC: antibody-secreting cells

693

694

695

696 **Figure Legends**

697 **Figure 1: *EZH2* is overexpressed in preplasmablasts:** A) PCD *in vitro* model
698 highlighting CD20, CD38 and CD138 expression in memory B cells (MBC), pre-
699 plasmablasts (prePB), plasmablasts (PB) and plasma cells (PC). B) *EZH2* Affymetrix
700 microarrays expression signal during PCD, in MBCs, prePBs, PBs, PCs, long-lived
701 plasma cells (LLPC) and bone marrow plasma cells (BMPC). C) *EZH2* protein levels,
702 assessed by immunofluorescence, in MBCs (Day 0), prePBs (Day 4), PBs (Day 7)
703 and PCs (Day 10), using an anti-*EZH2* antibody. Corrected total cell fluorescence

704 (CTCF) was assessed using the ImageJ software (mean number of cells counted:
705 40).

706

707 **Figure 2: EZH2 regulates memory B cell gene signature during PCD:** A) GSEA
708 enriched pathways of genes upregulated in MBC and associated with H3K27me3 in
709 prePB and/or PB. Log₁₀(pvalue) was assessed for each pathway (FDR≤0.05). B)
710 GSEA enriched pathways of genes downregulated in MBC and associated with
711 EZH2o in prePB and/or PB. Log₁₀(pvalue) was assessed for each pathway
712 (FDR≤0.05). C) i: IGV visualization of EZH2 and H3K27me3 enrichment on *CIITA*,
713 *BAMBI*, *BACH2*, *BCR*, *ID3* and *SMAD3* genes in prePBs and PBs. ii: Genomic
714 snapshots of EZH2 and H3K27me3 ChIP-seq results on *SMC2*, *MYB*, *AURKA*,
715 *CCND2*, *POLR3G* and *RAD51AP1* genes in prePBs and PBs.

716

717 **Figure 3: EZH2 regulates plasma cell transcriptional program during PCD:** A)
718 GSEA enriched pathways of genes upregulated in PC and associated with
719 H3K27me3 in prePBs and/or PBs. Log₁₀(pvalue) was assessed for each pathway
720 (FDR≤0.05). B) GSEA enriched pathways of genes downregulated in PC and
721 associated with EZH2o in prePBs and/or PBs. Log₁₀(pvalue) was assessed for each
722 pathway. C) i: Genomic snapshots of EZH2 and H3K27me3 enrichment on *IFIT5*,
723 *DUSP5*, *SDC1*, *CAV1*, *NFIL3* and *IFIT3* genes in prePBs and PBs. ii: Genomic
724 snapshots of EZH2 and H3K27me3 ChIP-seq results on *SSRP1*, *TP53*, *CSK*, *MCM5*,
725 *ACD* and *ALKBH2* genes in prePBs and PBs.

726

727 **Figure 4: EPZ-6438 treatment affects gene expression during PCD:** A)
728 Scatterplots of EPZ-6438-deregulated genes in prePBs and PBs. Activated genes
729 are represented in red, while repressed genes are represented in blue. B) First bar
730 plot represents the number of miRNA-coding genes associated with H3K27me3 in
731 prePBs and/or PBs. Second bar plot represents the percentage (Y-axis) and number
732 (top of each bar) of EPZ-6438-activated genes that are validated targets of
733 H3K27me3-associated miRNAs. H3K27me3-associated miRNA validated targets in
734 prePBs were compared with EPZ-6438-activated genes in prePBs (green bar) and
735 PB (yellow-horizontal stripes bar); and H3K27me3-associated miRNA validated
736 targets in PB were compared with EPZ-6438-activated genes in PBs (yellow-vertical
737 stripes bar). C) Transcription factors predicted to recognize and regulate EPZ-6438-

738 repressed genes in prePBs and/or PBs. Log₁₀(pvalue) was assessed for each
739 transcription factors.

740

741 **Figure 5: Function of EPZ-6438 target genes in preplasmablasts and**

742 **plasmablasts:** A) i: First chart represents Log₁₀(pvalue) of GSEA enriched

743 pathways of EPZ-6438-upregulated genes in prePBs (FDR≤0.05). Second chart

744 represent the fold expression (EZIP-6438 condition over control) of genes related to

745 first chart pathways. ii: First chart represents Log₁₀(pvalue) of GSEA enriched

746 pathways of EPZ-6438-upregulated genes in PBs (FDR≤0.05). Second chart

747 represent the fold expression (EZIP-6438 condition over control) of genes related to

748 first chart pathways. B) i: First chart represents Log₁₀(pvalue) of GSEA enriched

749 pathways of EPZ-6438-downregulated genes in prePBs (FDR≤0.05). Second chart

750 represent the fold expression (EZIP-6438 condition over control) of genes related to

751 first chart pathways. ii: First chart represents Log₁₀(pvalue) of GSEA enriched

752 pathways of EPZ-6438-downregulated genes in PBs (FDR≤0.05). Second chart

753 represent the fold expression (EZIP-6438 condition over control) of genes related to

754 first chart pathways.

755 Statistical significance between conditions was assessed using Student paired t-test

756 (*: pvalue<0.05).

757

758 **Figure 6: EPZ-6438 alters preplasmablasts and plasmablasts viability and**

759 **proliferation:** A) After EPZ-6438 treatment (1μM), cell counts and viability were

760 analyzed by trypan blue assay. Represented data are the mean percentage of the

761 absolute counts or viability ± SD of 7 independent experiments. B) Apoptosis

762 induction was analyzed with AnnexinV-PE staining by flow cytometry. Represented

763 data are the mean percentage values ± SD of 4 (Day 7) and 3 (Day 10) separate

764 experiments. C) Cell cycle was analyzed by flow cytometry using DAPI, BrdU

765 incorporation and labelling with an anti-BrdU antibody. Represented data are the

766 mean percentage values ± SD of 4 independent experiments. Statistical significance

767 between conditions was assessed using Student paired t-test (*: pvalue<0.05).

768

769 **Figure 7: EZH2 inhibition accelerates PCD through gene expression regulation:**

770 A) Mean percentage ± SD (7 separated experiments) of MBC and prePB at Day 4,

771 prePBs and PBs at Day 7; and PBs and PCs at Day 10 after EPZ-6438 (1μM)

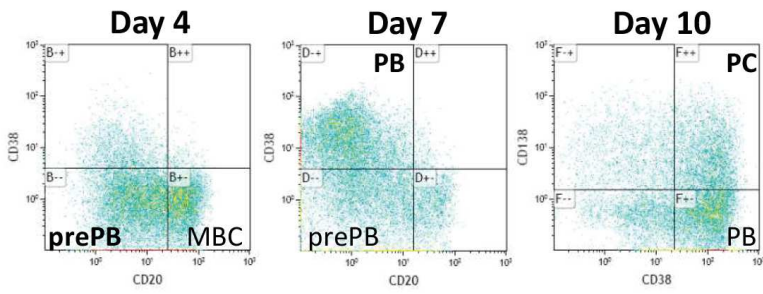
772 treatment. B) Protein expression of surface markers CD38 in PBs (Day 7) and CD38
773 and CD138 in PCs (Day 10) was assessed by flow cytometry with or without EPZ-
774 6438 (1 μ M) treatment. Results are mean values of the relative fluorescence intensity
775 (RFI) \pm SD of viable cells of 7 independent experiments. C) IgM, IgA and IgG
776 secretions by CD138+ PCs were assessed by ELISA and results are the mean
777 immunoglobulin production in micrograms per day and per 10⁶ cells determined in 3
778 separate experiments. Statistical significance between conditions was assessed
779 using Student paired t-test (*: pvalue<0.05).

780

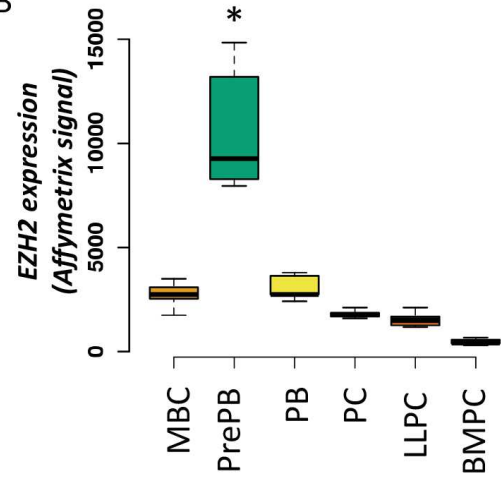
781 **Figure 8: EZH2 controls prePB proliferation and maturation through gene**
782 **regulation:** Chart synthesizing EZH2 role in PCD. After MBC activation, *EZH2*
783 expression is enhanced in prePBs. In this proliferative stage, EZH2 represses PC
784 maturation genes through H3K27me3, and activates genes involved in proliferation,
785 either directly or indirectly through H3K27me3-mediated inhibition of miRNA and
786 transcription factors targeting cell cycle regulators. EZH2 expression is lost at the
787 same rate as proliferation decreases and PC maturation occurs. We hypothesize that
788 the absence of EZH2 allows the activation of PC maturation genes and the
789 repression of genes involved in proliferation regulation.

Figure 1: EZH2 is overexpressed in preplasmablasts

A



B



C

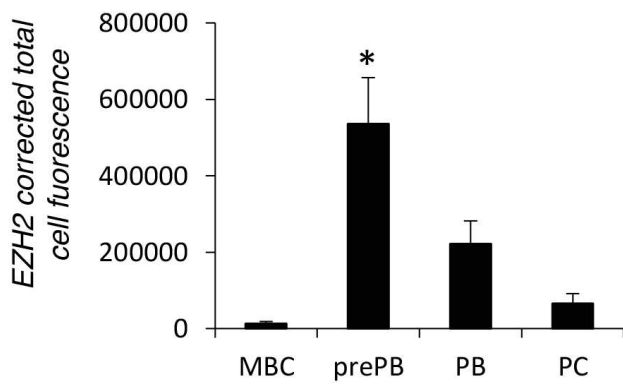
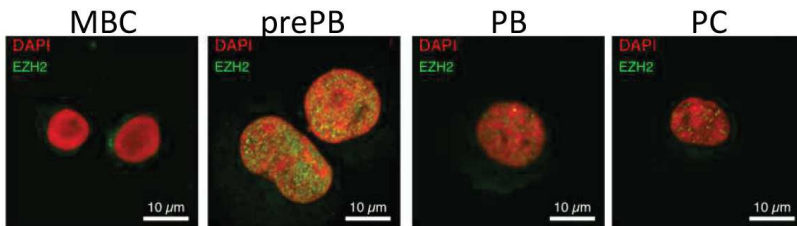


Figure 2 : EZH2 regulates memory B cell gene signature during PCD

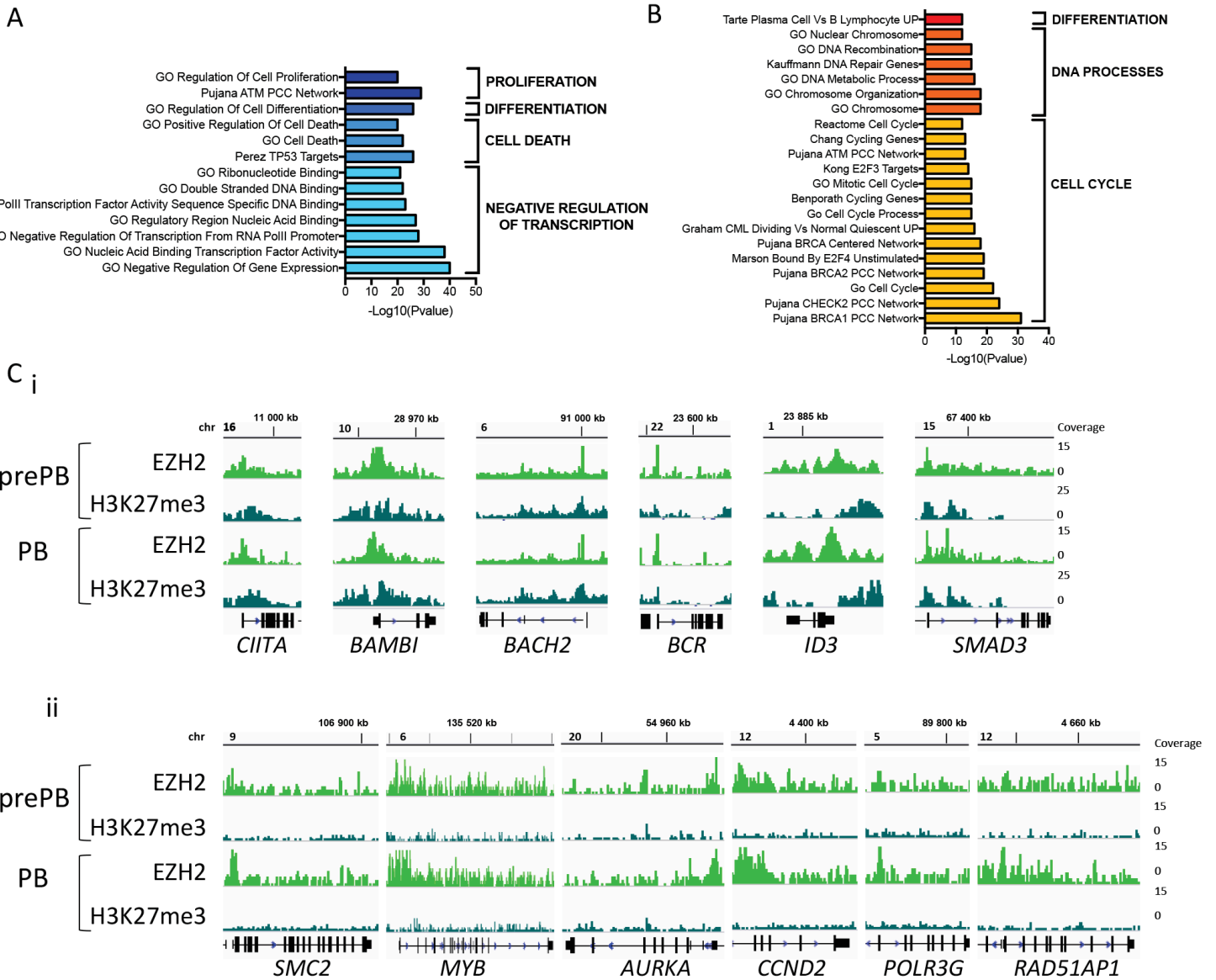


Figure 3 : EZH2 regulates plasma cell transcriptional program during PCD

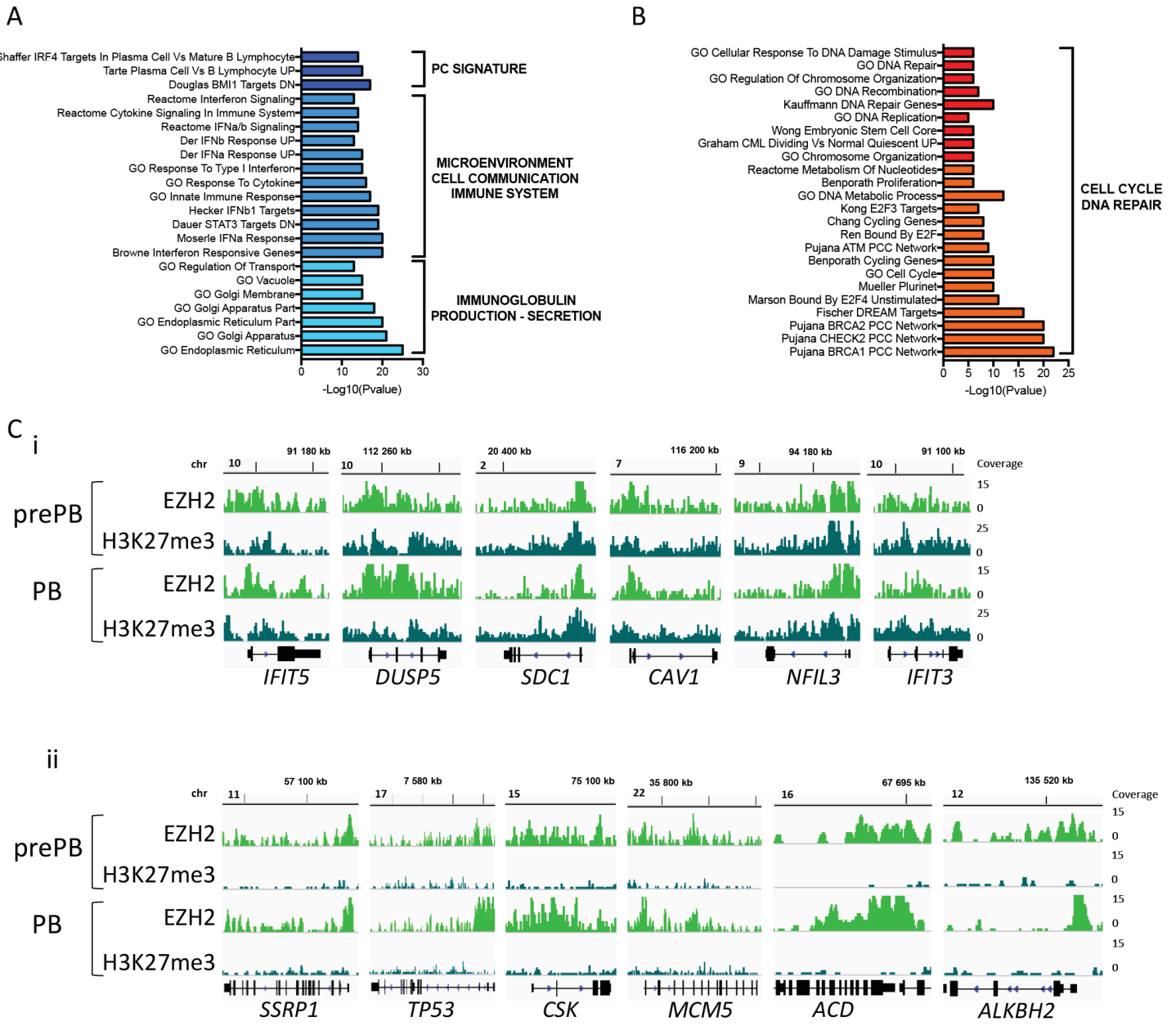


Figure 4 : EPZ-6438 treatment affects gene expression during PCD

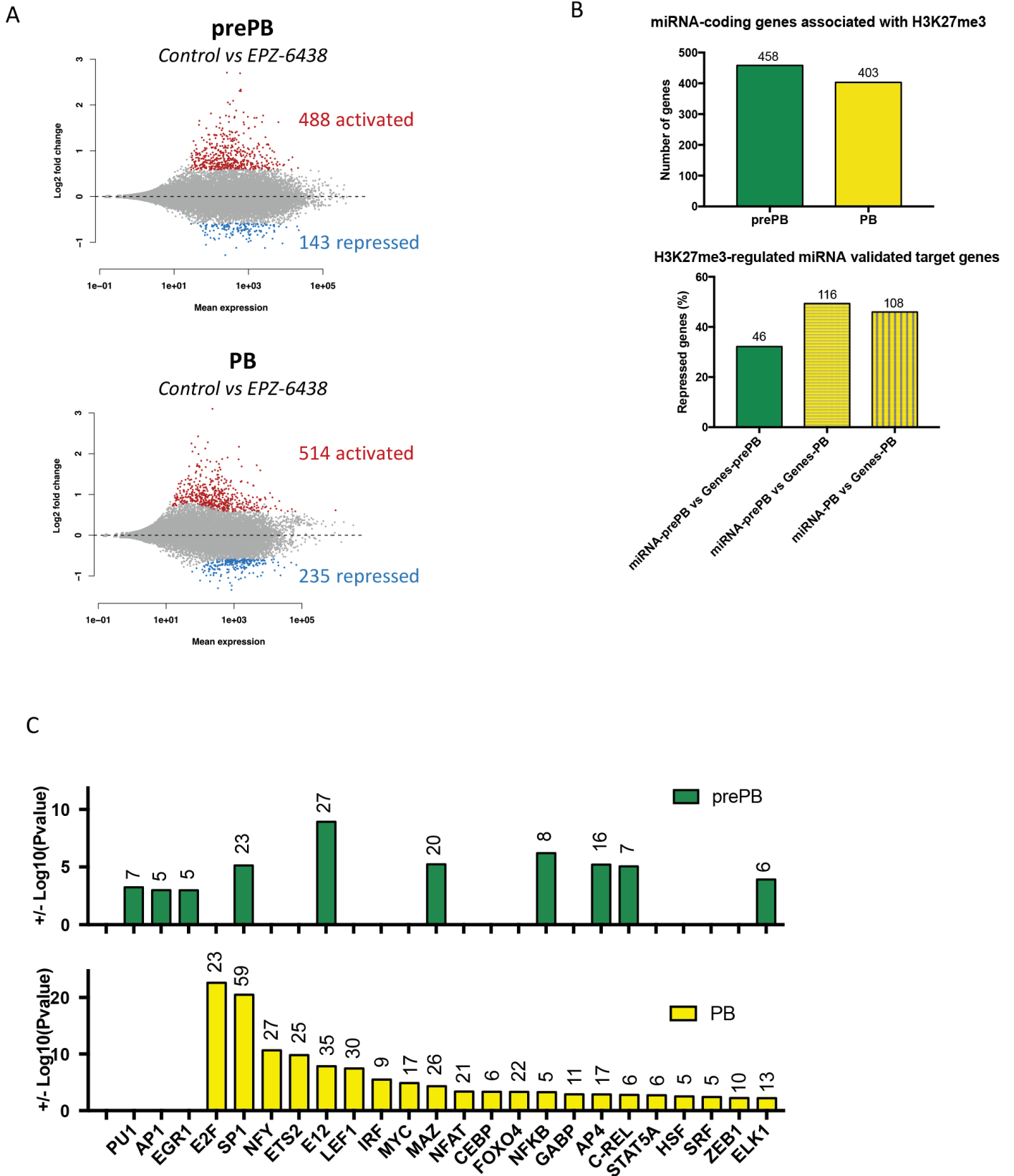


Figure 5: Function of EPZ-6438 target genes in preplasmablasts and plasmablasts

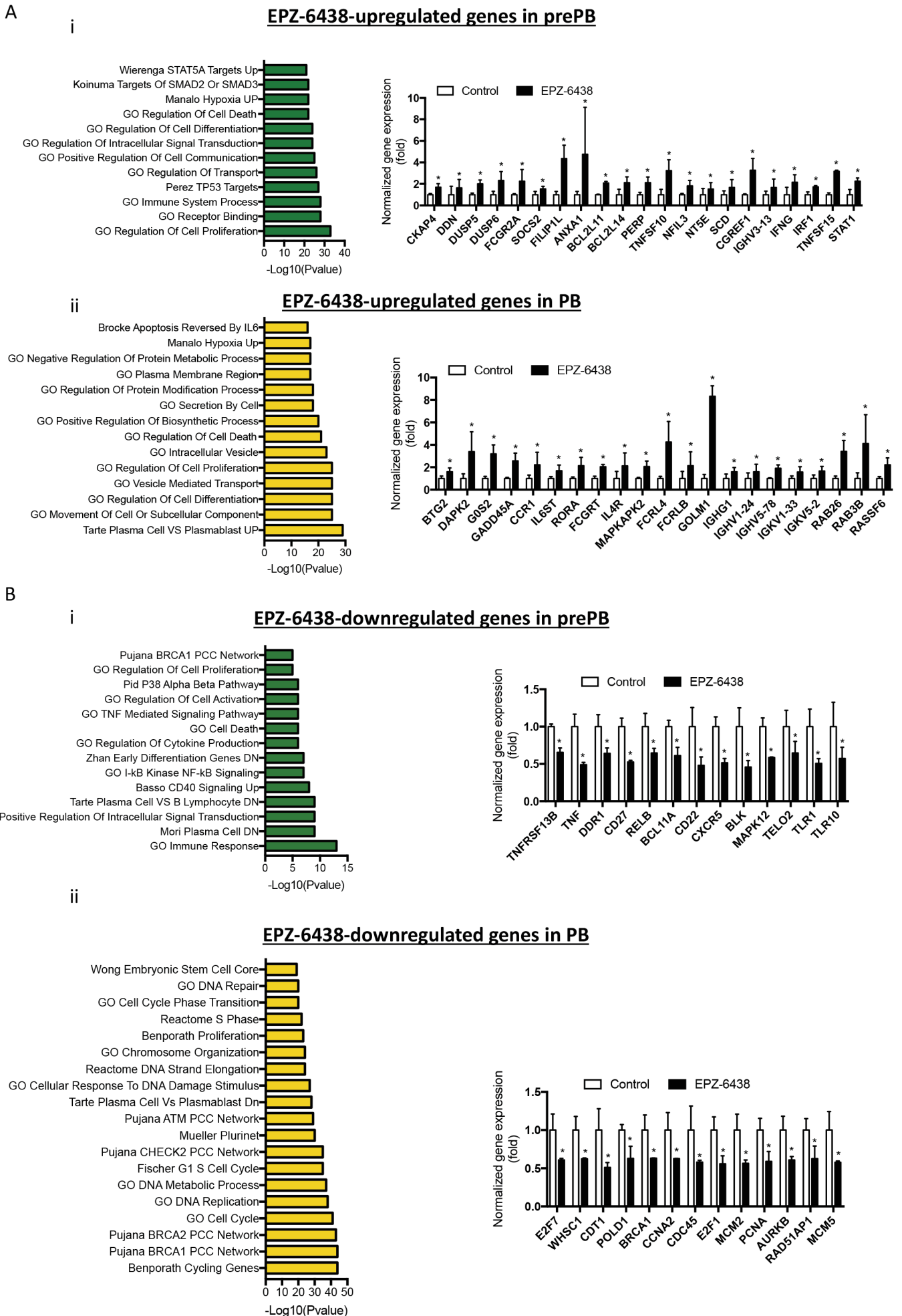


Figure 6 : EPZ-6438 alters preplasmablasts and plasmablasts viability and proliferation

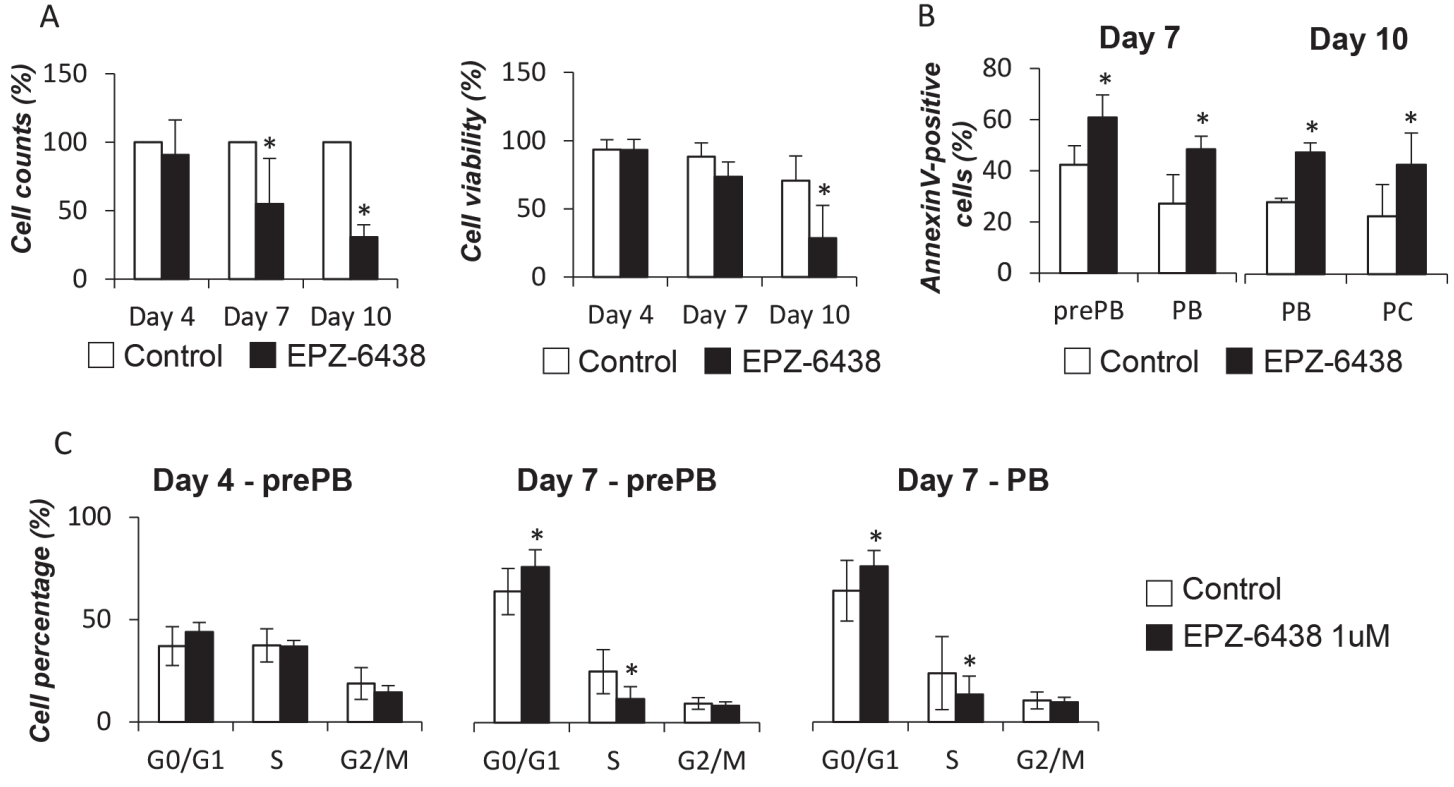


Figure 7 : EZH2 inhibition accelerates PCD through gene expression regulation

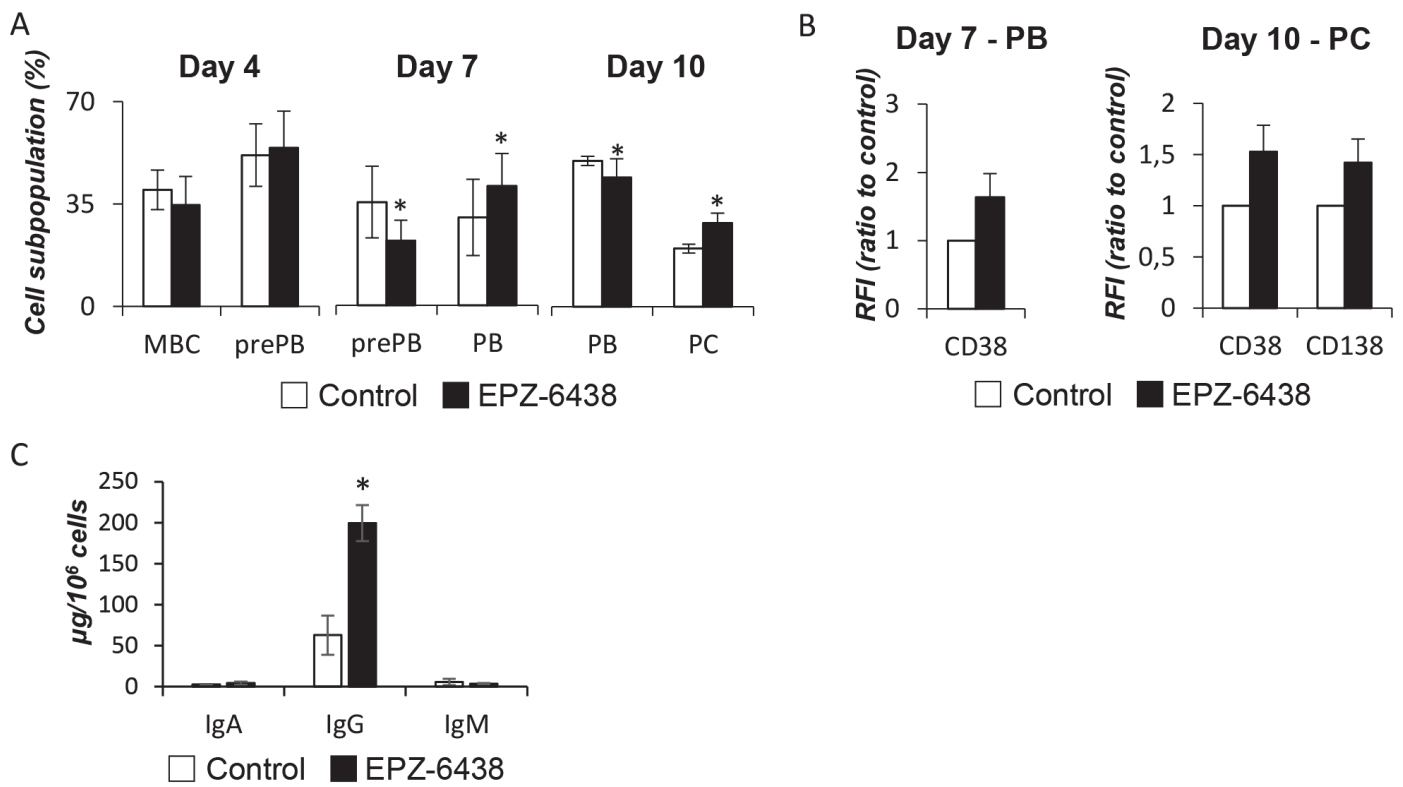
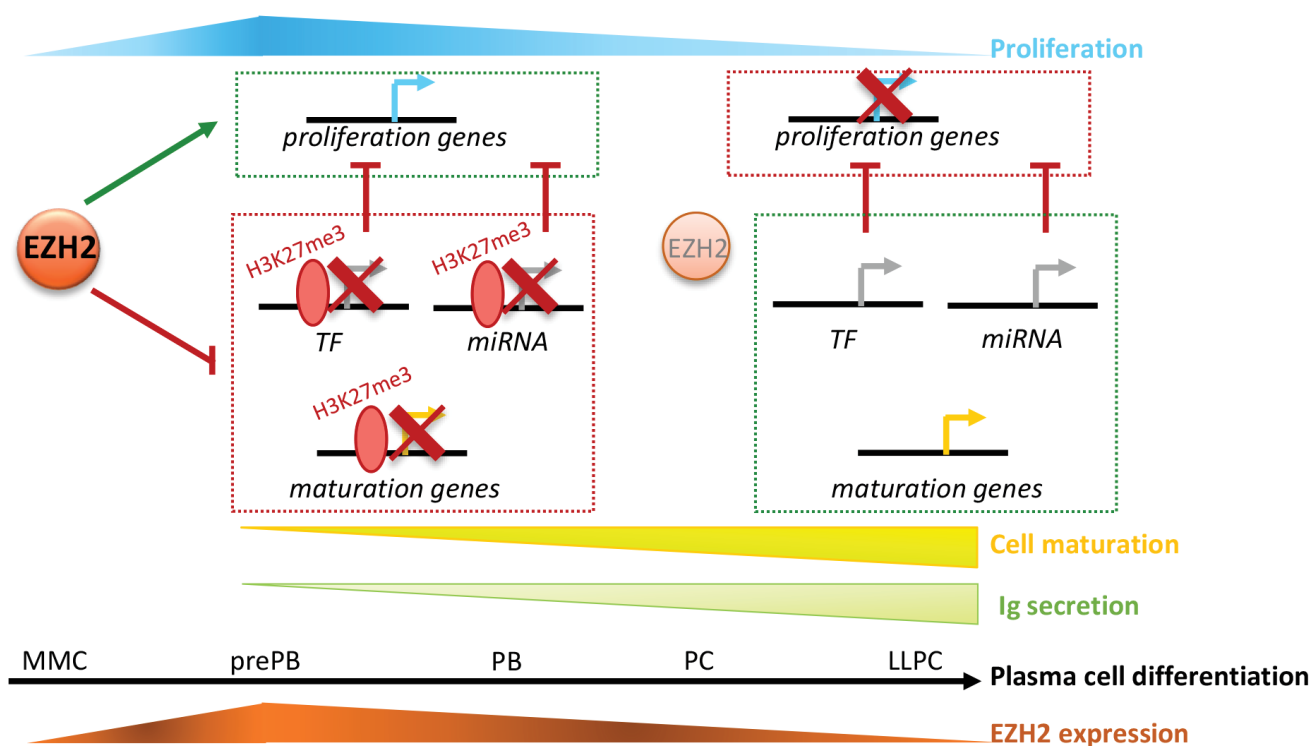


Figure 8: EZH2 controls prePB proliferation and maturation through gene regulation



1 **Supplementary figure legends**

2 **Supplementary Figure S1: *SUZ12* and *EED* are overexpressed in**
3 **preplasmablasts: *EED* and *SUZ12* Affymetrix microarrays expression signal during**
4 **PCD.**

5

6 **Supplementary Figure S2: Global H3K27me3 levels are stable during normal**
7 **PCD:** H3K27me3 global levels were assessed by immunofluorescence in MBCs (Day
8 0), prePBs (Day 4), PBs (Day 7) and PCs (Day 10), using an anti-H3K27me3 antibody.
9 Corrected total cell fluorescence (CTCF) was assessed using the ImageJ software
10 (mean number of cells counted: 40).

11

12 **Supplementary Figure S3: *EZH1* expression is anti-correlated with *EZH2***
13 **expression from MBCs to PCs: *EZH1* Affymetrix microarrays expression signal**
14 **during PCD. Spearman correlation test of *EZH1* and *EZH2* expression in MBC, prePB,**
15 **PB and PC shows a significant anti-correlation between the two methyltransferases (p-**
16 **value = 0.0035).**

17

18 **Supplementary Figure S4: Overall genomic distribution of *EZH2* and H3K27me3**
19 **ChIP-seq peaks in prePBs and PBs:** This analysis was performed using MACS2
20 peak caller and ChIPseeker annotation tool. Table shows the percentage of
21 H3K27me3 or *EZH2* recruitment at different genomic regions.

22

23 **Supplementary Figure S5: *EZH2* and H3K27me3 peak repartition around TSS in**
24 **prePBs and PBs:** This analysis was performed using MACS2 peak caller and
25 ChIPseeker annotation tool. Read count frequency was represented around genes
26 TSS (-3000bp; +3000bp) for each ChIP experiments.

27

28 **Supplementary Figure S6: Validated *EZH2* target genes and pathways:** GSEA
29 pathway analysis of genes associated with H3K27me3 in prePBs and PBs.
30 Log₁₀(pvalue) was assessed for each pathway (FDR≤0.05). *EZH2* and H3K27me3
31 peak distribution on *NEUROG1* gene and *HOXD* genomic locus in prePBs and PBs
32 was visualized using IGV software.

33

34 **Supplementary Figure S7: Prediction analysis of transcription factor binding**
35 **motif on EZH2o-bound genes in prePBs and/or PBs:** Transcription factors
36 predicted to recognize and regulate genes associated with EZH2o in prePBs and/or
37 PBs. Log₁₀(pvalue) was assessed for each transcription factors. Pearson correlation
38 test was performed on *EZH2* expression compared with *CREB1*, *E2F1*, *ETS2*,
39 *GABPB2*, *HIF1A*, *MYB*, *NFATC3*, *NRF1*, *RORA* and *YY1* expression during PCD.

40

41 **Supplementary Figure S8: EZH2 regulation of B cell gene expression program in**
42 **prePB and PB:** A) Heatmap representation of MBC upregulated genes expression
43 during PCD. These genes are associated with the H3K27me₃ repressive mark in
44 prePBs and/or PBs. B) Heatmap representation of MBC downregulated genes
45 expression during PCD. These genes are associated with EZH2o in prePB and/or PB.

46

47 **Supplementary Figure S9: EZH2 regulation of plasma cell transcriptional**
48 **program during PCD:** A) Heatmap representation of PC upregulated genes
49 expression during PCD. These genes are associated with the H3K27me₃ repressive
50 mark in prePBs and/or PBs. B) Heatmap representation of PC downregulated genes
51 expression during PCD. These genes are associated with EZH2o in prePB and/or PB.

52

53 **Supplementary Figure S10: EPZ-6438 treatment during PCD:** Diagram describing
54 the inhibition of EZH2 using the EPZ-6438 inhibitor in the previously described *in vitro*
55 model of PCD. The effect of EPZ-6438 on the different populations –MBCs, prePBs,
56 PBs and PCs – was assessed at the end of each differentiation steps (Day 4, Day 7
57 and Day 10). Each cell types were purified, according to previously described surface
58 markers, to perform RNA sequencing.

59

60 **Supplementary Figure S11: EPZ-6438-induced H3K27me₃ decrease:** H3K27me₃
61 global levels after EPZ-6438 treatment (1uM) were analyzed by flow cytometry.
62 Results are the mean value of the relative fluorescence intensity (RFI) ± SD of viable
63 cells of 3 independent experiments. Statistical significance between conditions was
64 assessed using Student paired t-test (*: pvalue<0.05).

65

66 **Supplementary Figure S12: EPZ-6438 treatment decreases global H3K27me₃**
67 **levels:** H3K27me₃ global levels were assessed by immunofluorescence in prePBs

68 (Day 4), PBs (Day 7) and PCs (Day 10) after EPZ-6438 treatment, using an anti-
69 H3K27me3 antibody.

70

71 **Supplementary Figure S13: EPZ-6438-upregulated genes during PCD:** Heatmap
72 representation of EPZ-6438-activated genes expression during PCD. Expression scale
73 shows highly expressed genes in red and poorly expressed genes in blue. Venn
74 diagram stressing commonly and uniquely upregulated genes in prePBs (green circle)
75 and PBs (yellow circle).

76

77 **Supplementary Figure S14: EPZ-6438-downregulated genes during PCD:**
78 Heatmap representation of EPZ-6438-repressed genes expression during PCD.
79 Expression scale shows highly expressed genes in red and poorly expressed genes in
80 blue. Venn diagram stressing commonly and uniquely downregulated genes in prePBs
81 (green circle) and PBs (yellow circle).

82

83 **Supplementary Figure S15: EPZ-6438 deregulated genes in PCs:** Scatterplot of
84 EPZ-6438-deregulated genes in PCs. Activated genes are represented in red, while
85 repressed genes are represented in blue.

86

87 **Supplementary Figure S16: Cell division under EPZ-6438:** Cells were labeled with
88 CFSE at the beginning of the culture and the decrease in CFSE staining due to cell
89 division was assessed at Day 4 and Day 7 for prePB and PB populations. Represented
90 histograms are representative of 3 independent experiments. Statistical significance
91 between conditions was assessed using Student paired t-test (*: pvalue<0.05).

92

93 **Supplementary Figure S17: EPZ-6438-induced DNA damage in PB and PC:**
94 53BP1 foci were observed in prePBs (Day 4), PBs (Day 7) and PCs (Day 10), with or
95 without EPZ-6438 treatment. Number of foci per cell was quantified using ImageJ
96 software (mean number of cells counted: 300). Presented charts are representative of
97 3 independent experiments. Statistical significance between conditions was assessed
98 using Student paired t-test (*: pvalue<0.05).

99

100 **Supplementary Figure S18: Hierarchical clustering of EPZ-6438-deregulated**
101 **genes during PCD:** EPZ-6438-deregulated genes based hierarchical clustering tree
102 of treated and untreated prePBs, PBs and PCs.

103

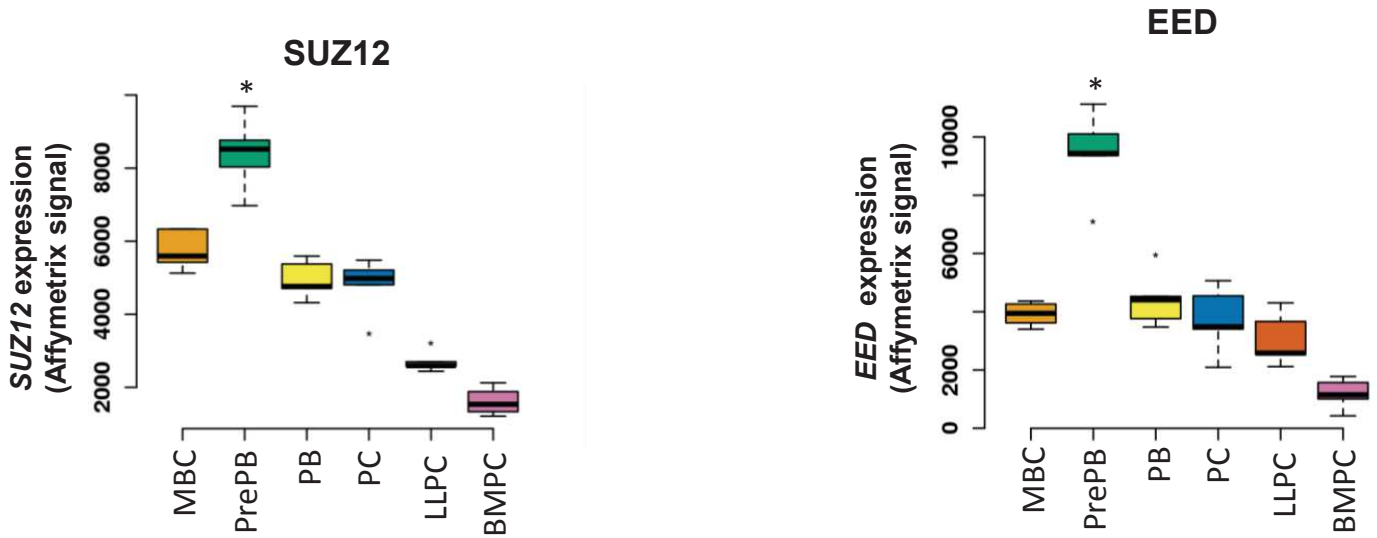
104 **Supplementary Figure S19: PCD key genes deregulated by EPZ-6438 treatment:**
105 Heatmap representation of the RNAseq expression of PCD key genes deregulated
106 under EPZ-6438 treatment in prePBs, PBs and PCs. Expression scale shows highly
107 expressed genes in red and poorly expressed genes in blue.

108

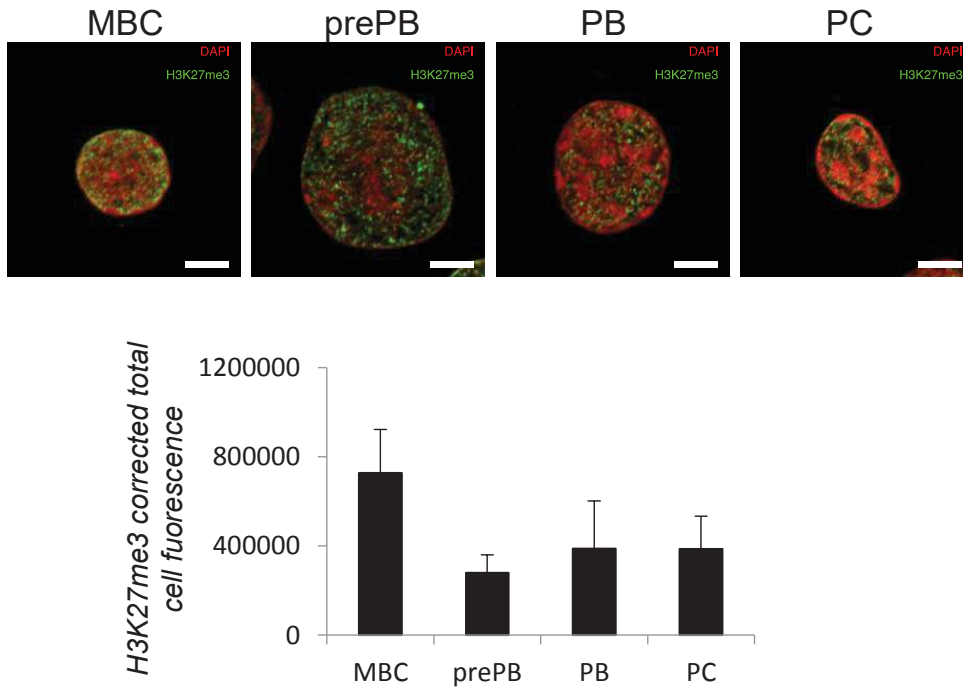
109 **Supplementary Figure S20: Immunoglobulin production by PC after EZH2**
110 **inhibition:** Percentage of CD138+ PC producing IgA, IgG and IgM in control and
111 treated conditions, assessed by flow cytometry in 3 independent experiments.

112

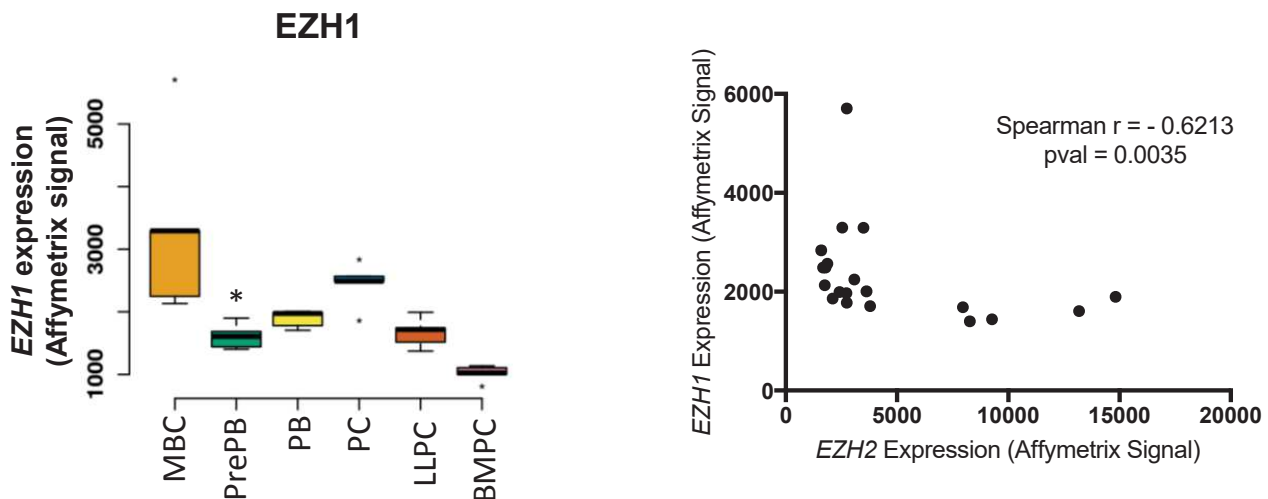
Supplementary Figure S1: SUZ12 and EED are overexpressed in preplasmablasts



Supplementary Figure S2: Global H3K27me3 levels are stable during normal PCD



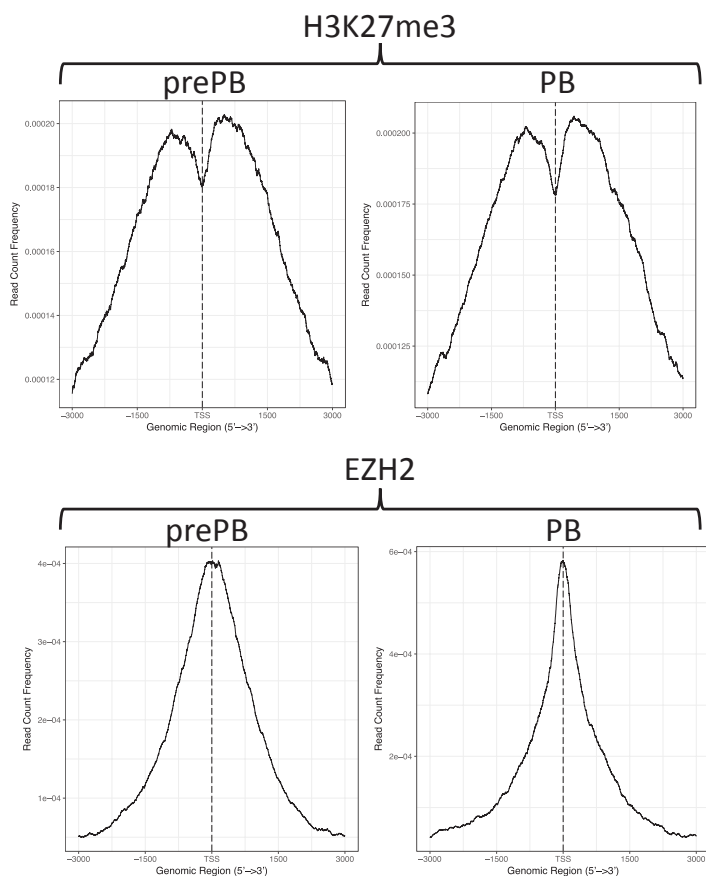
Supplementary Figure S3: EZH1 expression is anti-correlated with EZH2 expression from MBC to PC



Supplementary Figure S4: EZH2 and H3K27me3 peak repartition across the genome in prePB and PB

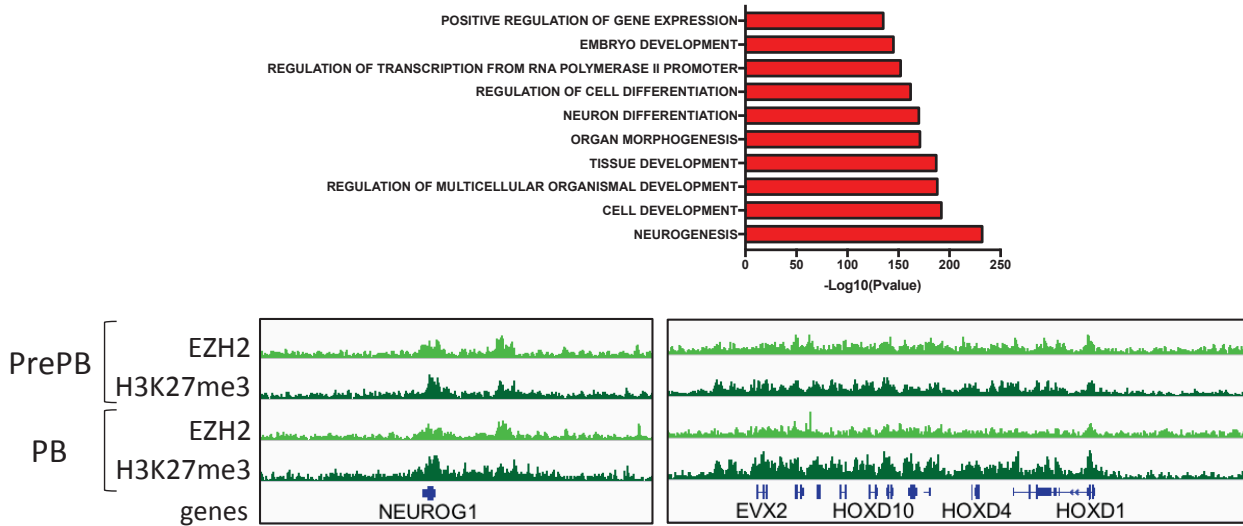
| | EZH2 | | H3K27me3 | |
|-------------------|--------|--------|----------|--------|
| | prePB | PB | prePB | PB |
| Promoter (<=1kb) | 31.43% | 26.7% | 6.28% | 7.79% |
| Promoter (1-2kb) | 7.39% | 5.47% | 3.85% | 4.44% |
| Promoter (2-3kb) | 4.14% | 3.02% | 3.46% | 3.99% |
| 5'UTR | 0.37% | 0.26% | 0.3% | 0.3% |
| 3'UTR | 1.61% | 1.39% | 1.1% | 1.12% |
| 1st Exon | 0.41% | 0.44% | 0.3% | 0.33% |
| Other Exon | 2.37% | 2.29% | 2.68% | 2.41% |
| 1st Intron | 4.1% | 4.25% | 6.32% | 6.1% |
| Other Intron | 15.05% | 17.79% | 21.55% | 20.25% |
| Downstream | 1.23% | 0.99% | 0.98% | 1.02% |
| Distal Intergenic | 31.89% | 37.38% | 53.18% | 52.25% |

Supplementary Figure S5: EZH2 and H3K27me3 peak repartition around TSS in prePB and PB

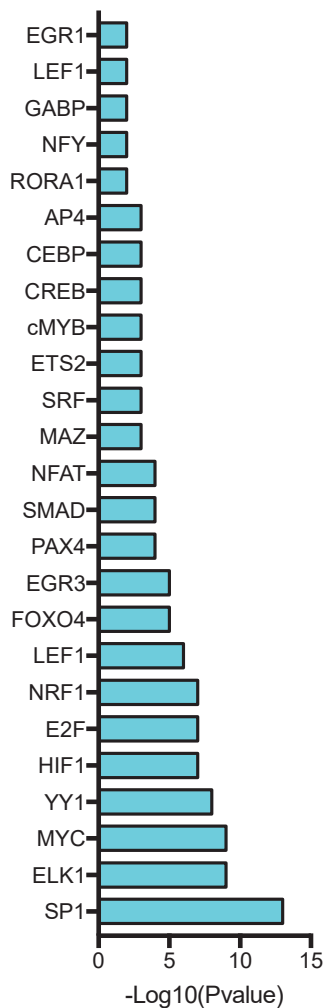


Supplementary Figure S6: Validated EZH2 target genes and pathways

GSEA: Genes repressed by EZH2/H3K27me3 in prePB and PB

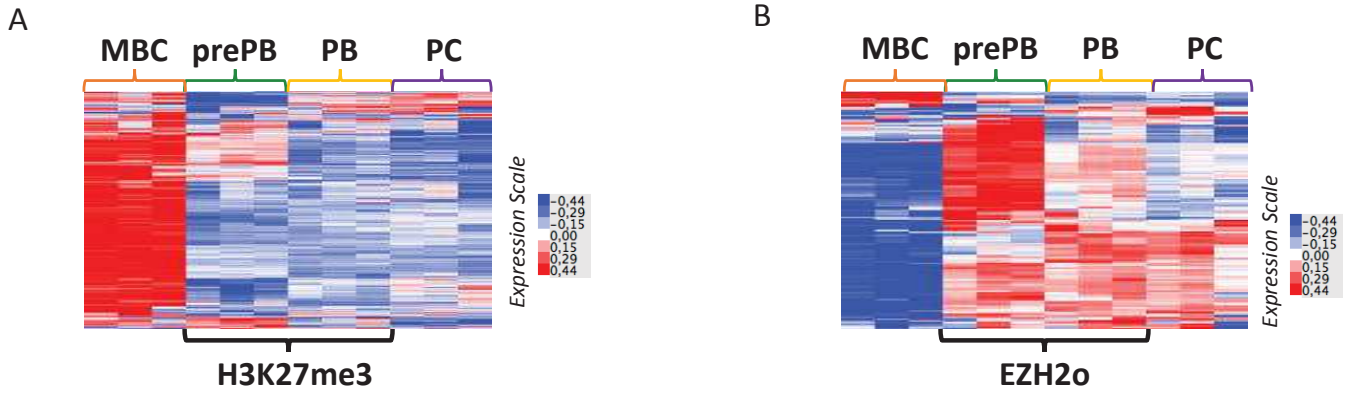


Supplementary Figure S7: Prediction analysis of transcription factor binding motif on EZH2o-bound genes in prePB and/or PB

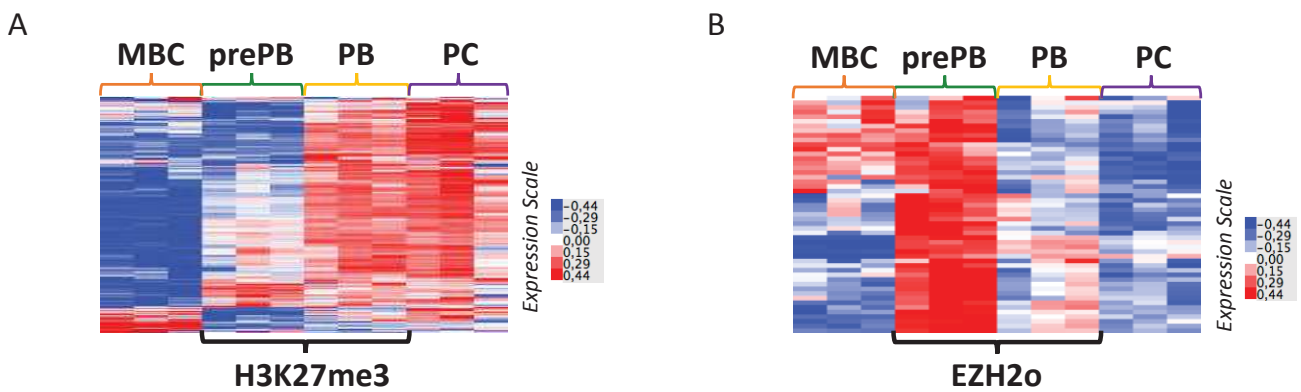


| EZH2 vs. | Pearson r | P-value (two-tailed) | Significant? (alpha = 0.05) | PCD |
|----------|-----------|----------------------|-----------------------------|-------------|
| CREB1 | 0,6687 | <0,0001 | Yes | MBC to BMPC |
| E2F1 | 0,7987 | <0,0001 | Yes | MBC to BMPC |
| ETS2 | -0,3838 | 0,0363 | Yes | MBC to BMPC |
| GABPB2 | 0,5575 | 0,0014 | Yes | MBC to BMPC |
| HIF1A | -0,4821 | 0,0313 | Yes | MBC to PC |
| MYB | 0,9344 | <0,0001 | Yes | MBC to BMPC |
| NFATC3 | 0,4351 | 0,0163 | Yes | MBC to BMPC |
| NRF1 | 0,5449 | 0,0019 | Yes | MBC to BMPC |
| RORA | -0,3621 | 0,0492 | Yes | MBC to BMPC |
| YY1 | 0,4073 | 0,0255 | Yes | MBC to BMPC |

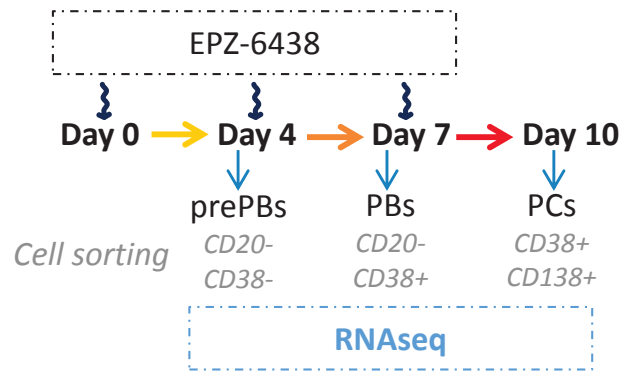
Supplementary Figure S8: EZH2 regulation of B cell gene expression program in prePB and PB



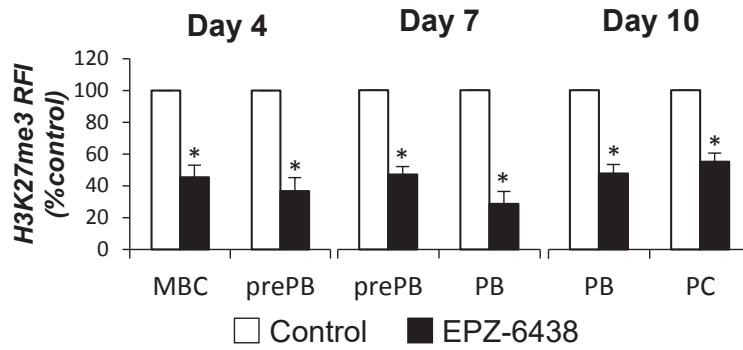
Supplementary Figure S9 : EZH2 regulation of plasma cell transcriptional program during PCD



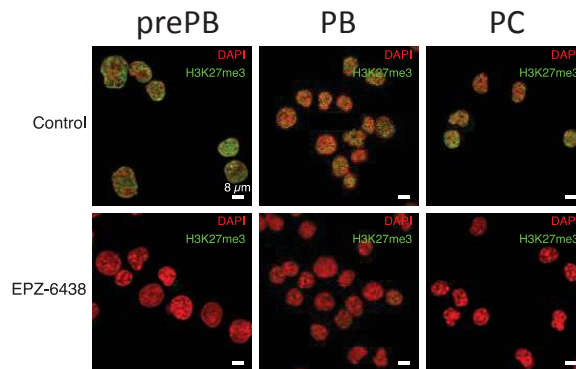
Supplementary Figure S10: EPZ-6438 treatment during PCD



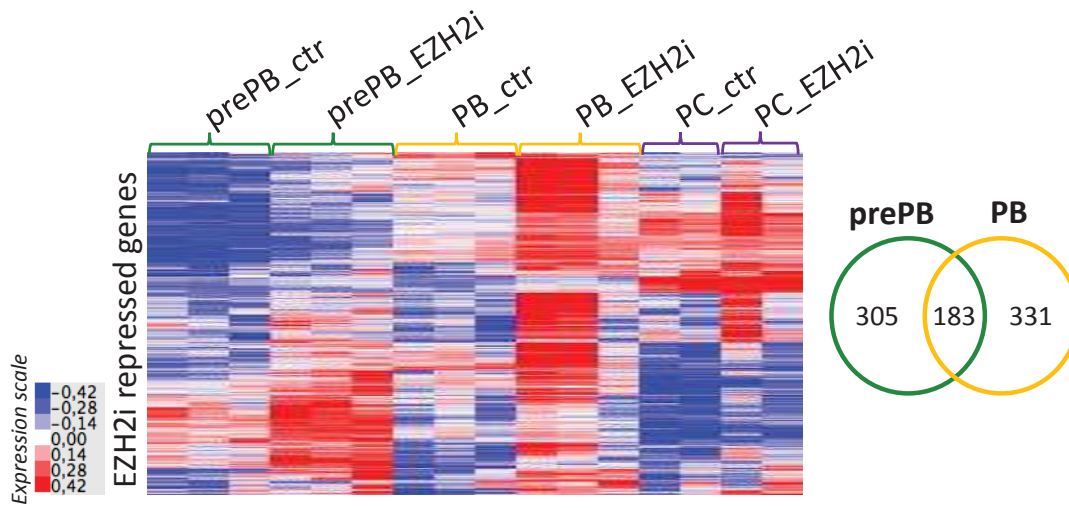
Supplementary Figure S11: EPZ-6438-induced H3K27me3 decrease



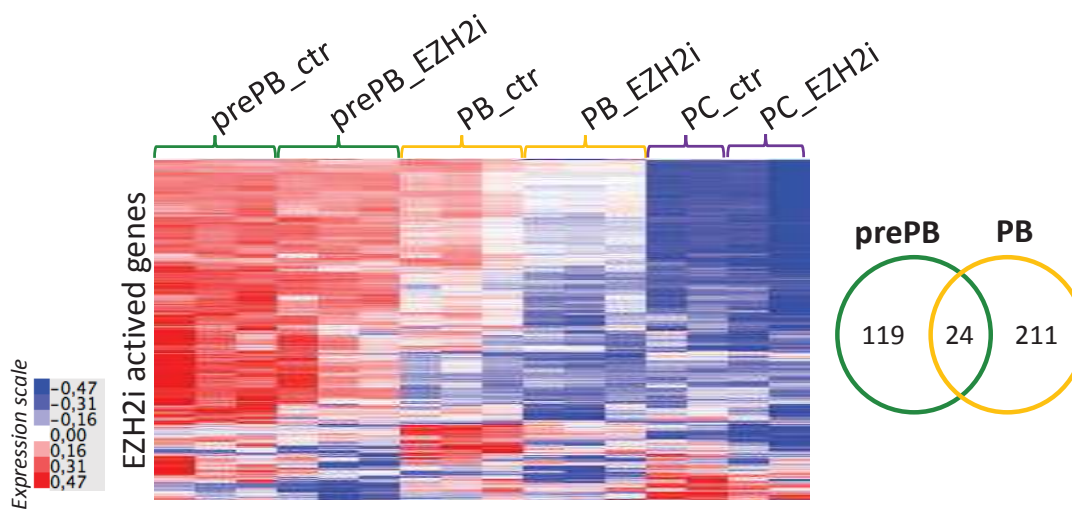
Supplementary Figure S12: EPZ-6438 decrease global H3K27me3 levels



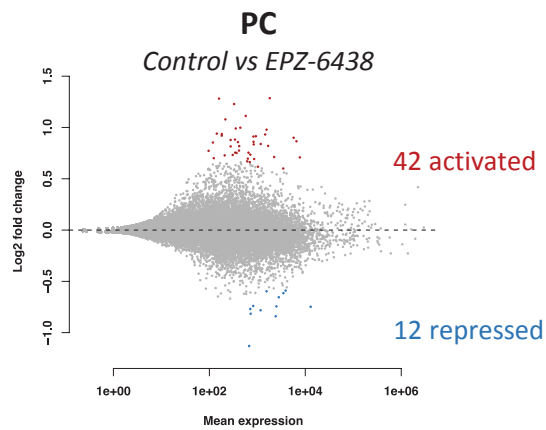
Supplementary Figure S13: EPZ-6438-upregulated genes during PCD



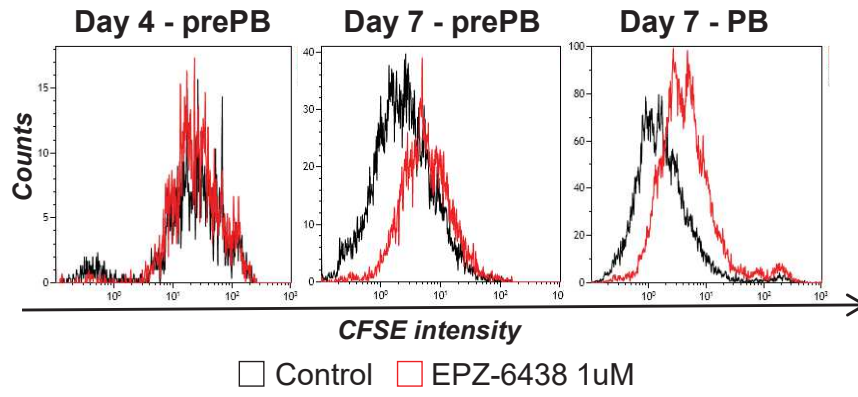
Supplementary Figure S14: EPZ-6438-downregulated genes during PCD



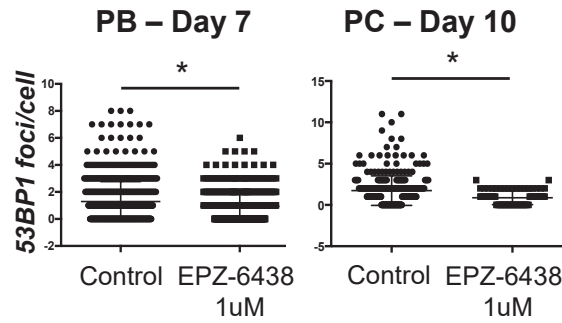
Supplementary Figure S15: EPZ-6438 deregulated genes in plasma cells



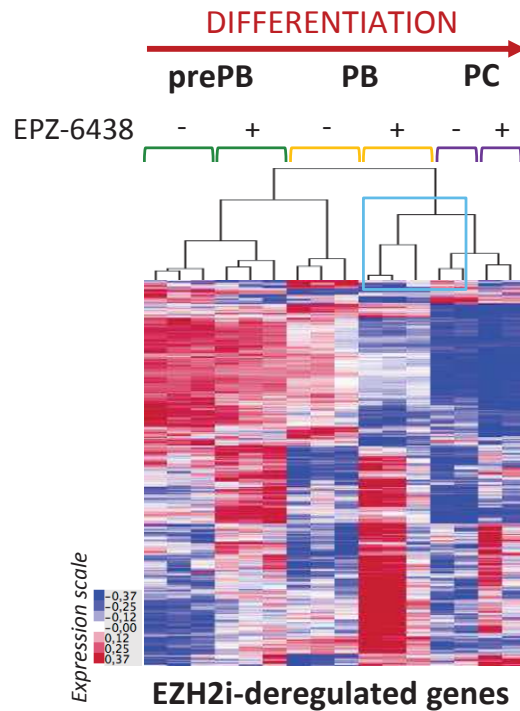
Supplementary Figure S16: Cell division under EPZ-6438



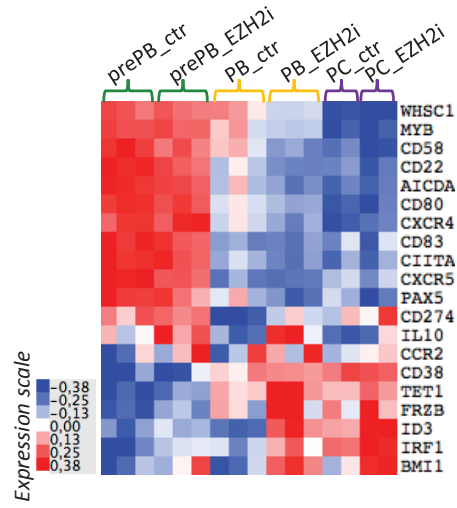
Supplementary Figure S17: EPZ-6438-induced DNA damage in PB and PC



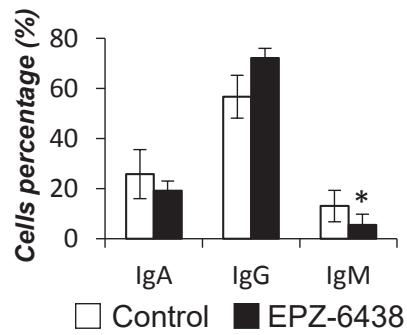
Supplementary Figure S18: Hierarchical clustering of EPZ-6438-deregulated genes during PCD



Supplementary Figure S19: PCD key genes deregulated by EPZ-6438 treatment



Supplementary Figure S20: Immunoglobulin production by PC after EZH2 inhibition



II. PRC2 targeting is a therapeutic strategy for EZ-score defined high-risk Multiple Myeloma patients and overcome resistance to IMiDs

Laurie Herviou², Alboukadel Kassambara^{1,2}, Stéphanie Boireau^{1,2}, Nicolas Robert^{1,2}, Guilhem Requirand^{1,2}, Carsten Müller-Tidow⁴, Laure Vincent⁶, Anja Seckinger^{4,5}, Hartmut Goldschmidt^{4,5}, Guillaume Cartron^{3,6,7}, Dirk Hose^{4,5}, Giacomo Cavalli², Jerome Moreaux^{1,2,3*}

1 CHU Montpellier, Department of Biological Hematology, Montpellier, France

2 IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

3 Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

4 Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

5 Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg, Germany

6 CHU Montpellier, Department of Clinical Hematology, Montpellier, France

⁷ Univ Montpellier, UMR CNRS 5235, Montpellier, France

Résumé:

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie caractérisée par l'accumulation de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Nos travaux ont notamment permis d'identifier une surexpression des membres du complexe Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) dans les cellules de MM, en association avec leur prolifération. Afin de comprendre le rôle de PRC2 dans le MM, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité méthyltransférase d'EZH2 (EPZ-6438). L'effet de l'inhibiteur d'EZH2 sur la prolifération et la survie des cellules de MM est très hétérogène. En effet, les cellules sensibles présentent un arrêt du cycle cellulaire et entrent en apoptose. De manière intéressante, la résistance des cellules de MM à l'inhibiteur d'EZH2 pourrait être médiée induite par la méthylation des promoteurs des gènes cibles de PRC2. Nous avons ainsi établi un score (EZ-score), basé sur l'expression des gènes, permettant d'identifier des patients de mauvais pronostic pouvant bénéficier d'un traitement avec un inhibiteur d'EZH2. Nous avons également mis en évidence un effet synergique de EPZ-6438 et du Lenalidomide, un agent immuno-modulateurs utilisé en traitement conventionnelle du MM. Cette inhibition de la croissance cellulaire est notamment due à l'induction de l'expression de facteurs de transcription, spécifiques des lymphocytes B, et des suppresseurs de tumeurs en association avec la répression de l'expression de MYC. Aussi, un prétraitement avec l'inhibiteur d'EZH2 permet de surmonter la résistance des cellules tumorales au Lenalidomide.

Ces données suggèrent que le ciblage de PRC2 pourrait avoir un intérêt thérapeutique chez les patients caractérisés par un mauvais pronostic et un fort EZ-score. Ainsi, l'inhibiteur d'EZH2 pourrait également permettre de resensibiliser les patients aux chimiothérapies basées sur des agents immuno-modulateurs.

Soumis au journal Clinical Epigenetics en avril 2018

1 **PRC2 targeting is a therapeutic strategy for EZ-score defined high-risk Multiple**
2 **Myeloma patients and overcome resistance to IMiDs**

3

4 Laurie Herviou², Alboukadel Kassambara^{1,2} Stéphanie Boireau^{1,2}, Nicolas Robert^{1,2},
5 Guilhem Requirand^{1,2}, Carsten Müller-Tidow⁴, Laure Vincent⁶, Anja Seckinger^{4,5},
6 Hartmut Goldschmidt^{4,5}, Guillaume Cartron^{3,6,7}, Dirk Hose^{4,5}, Giacomo Cavalli²,
7 Jerome Moreaux^{1,2,3*}

8

9 ¹ CHU Montpellier, Department of Biological Hematology, Montpellier, France

10 ² IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

11 ³ Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

12 ⁴ Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg,
13 Germany

14 ⁵ Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg, Germany

15 ⁶ CHU Montpellier, Department of Clinical Hematology, Montpellier, France

16 ⁷ Univ Montpellier, UMR CNRS 5235, Montpellier, France

17

18 Short title: EZH2i in combination with IMiDs targets MM cells

19

20 Scientific category: Lymphoid Neoplasia

21

22

23 Corresponding author :

24 Jerome MOREAUX,

25 Laboratory for Monitoring Innovative Therapies

26 Department of Biological Hematology

27 Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier

28 80, av. Augustin Fliche

29 34295 Montpellier Cedex 5

30 IGH - Institute of Human Genetics

31 UMR 9002, CNRS and University of Montpellier

32 <http://www.igh.cnrs.fr/>

33 phone: +33 (0)4 67 33 79 03

34 fax: +33 (0)4 67 33 70 36

35 mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

36

37

38

39

40

41 **ABSTRACT**

42 **Background:** Multiple Myeloma (MM) is a malignant plasma cell disease with a poor
43 survival, characterized by the accumulation of myeloma cells (MMCs) within the bone
44 marrow. Epigenetic modifications in MM are associated not only with cancer
45 development and progression, but also with drug resistance.

46 **Methods:** We identified a significant upregulation of the Polycomb Repressive
47 Complex 2 (PRC2) core genes in MM cells in association with proliferation. We used
48 EPZ-6438, a specific small molecule inhibitor of EZH2 methyltransferase activity, to
49 evaluate its effects on MM cells phenotype and gene expression profile.

50 **Results:** PRC2 targeting results in growth inhibition due to cell cycle arrest and
51 apoptosis together with polycomb, DNA methylation, TP53 and RB1 target genes
52 induction. Resistance to EZH2 inhibitor is mediated by DNA methylation of PRC2
53 target genes. We also demonstrate a synergistic effect of EPZ-6438 and Lenalidomide,
54 a conventional drug used for MM treatment, activating B cell transcription factors and
55 tumor suppressor gene expression in concert with MYC repression. We establish a
56 gene expression-based EZ-score allowing to identify poor prognosis patients that
57 could benefit from EZH2 inhibitor treatment.

58 **Conclusions:** These data suggest that PRC2 targeting in association with IMiDs could
59 have a therapeutic interest in MM patients characterized by high EZ-score values,
60 reactivating B cell transcription factors and tumor suppressor genes.

61

62 **Key words:** PRC2, multiple myeloma, predictive score, epigenetics

63

64

65

66 **BACKGROUND**

67 Epigenetic events are key mechanisms in the regulation of cell fate and cell identity.
68 DNA methylation, miRNA-associated gene repression and histone modifications have
69 been implicated in numerous diseases, including cancers and represent new
70 therapeutic targets[1].

71 Gene expression regulation through Polycomb-induced histone modifications is a well-
72 studied mechanism. The Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) contains three core
73 subunits: EED (embryonic ectoderm development), SUZ12 (suppressor of zeste 12
74 homolog) and EZH2 (enhancer of zeste homologue 2). PRC2 represses gene
75 transcription through tri-methylation of lysine 27 of histone 3 (H3K27me3) by its
76 catalytic subunit EZH2.

77 EZH2 deregulation has been described in many cancer types, including hematological
78 malignancies. Its overexpression or gain of function mutations lead to abnormal
79 H3K27me3 accumulation, repressing tumor suppressor genes, such as cell cycle
80 inhibitors, apoptotic activators and senescence and differentiation factors[1].

81 Multiple Myeloma (MM) is a neoplasia characterized by the accumulation of clonal
82 plasma cells within the bone marrow. Recent advances in treatment have led to an
83 overall survival of intensively-treated patients of 6-7 years and an event-free survival
84 of 3-4 years[2]. However, patients invariably relapse after multiple lines of treatment,
85 with shortened intervals between relapses, and finally become resistant to all
86 treatments, resulting in loss of clinical control over the disease. MM is a genetically
87 and clinically heterogeneous disease. Genome sequencing studies have revealed
88 considerable heterogeneity and genomic instability, a complex mutational landscape
89 and a branching pattern of clonal evolution[3, 4]. Epigenetic marks such as DNA

90 methylation or histone posttranslational modifications are also be involved in MM
91 pathophysiology and drug resistance[5, 6].

92 Global gene expression profiling indicated that, while *EZH2* is up-regulated, its target
93 genes are down-regulated in myeloma cells compared with normal plasma cells[7]. In
94 human MM cell lines (HMCL), *EZH2* expression has been correlated with increased
95 proliferation and an independence on growth factors[8]. Inhibition of EZH2 expression
96 and activity is associated with HMCL growth inhibition[9, 10] and decreased tumor load
97 in a mouse model of MM[7, 11]. One study shows that this effect is related to epithelial
98 tumor suppressor gene upregulation[11]. However, the use of specific EZH2 inhibitors
99 demonstrated that MM proliferation inhibition is time dependent and cell line specific,
100 indicating that EZH2 does not play a universal and monotonous role in promoting
101 MM[11]. Furthermore, the first genome-wide profiling of H3K27me3 and H3K4me3 in
102 MM patient samples was recently published, showing a unique epigenetic profile of
103 primary MM cells compared to normal bone marrow plasma cells[10]. EZH2 inhibition
104 was associated with upregulation of microRNAs with potential tumor suppressor
105 functions[12]. More recently, EZH2 overexpression was reported to be associated with
106 poor outcome and dysregulation of proliferation[13]. These data underscore an
107 oncogenic role of EZH2 in MM. EZH2 inhibitors are currently in phase 2 clinical
108 development in relapsed or refractory non Hodgkin lymphoma (NHL) and biomarkers
109 are needed for patient selection since neither EZH2 mutations nor H3K27me3 levels
110 are sufficient to predict NHL cell response to EZH2 inhibitors[1, 14].

111 Here, we identified that PRC2 core genes are overexpressed in MM cells in association
112 with proliferation activation. Treatment of MM cells with EPZ-6438, a specific small
113 molecule inhibitor of EZH2 methyltransferase activity, results in growth inhibition due
114 to cell cycle arrest and apoptosis. Resistance to EZH2 inhibitor is mediated by DNA

115 methylation of PRC2 target genes. We also observed a synergy between EPZ-6438
116 and Lenalidomide, a conventional drug used for MM treatment. More interestingly,
117 pretreatment of myeloma cells with EPZ-6438 significantly re-sensitizes drug-resistant
118 MM cells to Lenalidomide. EPZ-6438/Lenalidomide combination induced a significant
119 transcriptional reprogramming of MM cells targeting major B and plasma cell
120 transcription factors in association with MYC repression. RNA sequencing combined
121 with H3K27me3 ChIP analyses allowed us to build an EZ GEP-based score that is able
122 to predict HMCL and primary MM cell sensitivity to EZH2 inhibitors.

123

124 **METHODS**

125 **Human Myeloma Cell Lines (HMCLs)**

126 XG human myeloma cell lines were obtained as previously described[15]. JJN3 was
127 kindly provided by Dr Van Riet (Brussels, Belgium), JIM3 by Dr MacLennan
128 (Birmingham, UK) and MM1S by Dr S. Rosen (Chicago, USA). AMO-1, LP1, L363,
129 U266, OPM2, and SKMM2 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and
130 RPMI8226 from ATTC (Rockville, MD, USA). All HMCLs derived in our laboratory were
131 cultured in the presence of recombinant IL-6. HMCLs were authenticated according to
132 their short tandem repeat profiling and their gene expression profiling using Affymetrix
133 U133 plus 2.0 microarrays deposited in the ArrayExpress public database under
134 accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088[15].

135 **Primary multiple myeloma cells**

136 Bone marrow samples were collected after patients' written informed consent in
137 accordance with the Declaration of Helsinki and institutional research board approval
138 from Heidelberg and Montpellier University hospital. Bone marrow were collected from
139 206 patients treated with high dose Melphalan (HDM) and autologous stem cell

140 transplantation (ASCT) and this cohort is termed “Heidelberg-Montpellier” (HM)
141 cohort[16]. Patients’ MMCs were purified using anti-CD138 MACS microbeads
142 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and their gene expression profile
143 (GEP) obtained using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays as described[17]. The CEL
144 files and MAS5 files are available in the ArrayExpress public database (E-MTAB-372).
145 The structural chromosomal aberrations, as well as numerical aberrations were
146 assayed by fluorescence in situ hybridization (iFISH). We also used publicly available
147 Affymetrix GEP (Gene Expression Omnibus, accession number GSE2658) of a cohort
148 of 345 purified MMC from previously untreated patients from the University of Arkansas
149 for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, AR), termed in the following UAMS-TT2
150 cohort. These patients were treated with total therapy 2 including HDM and ASCT[18].
151 We also used Affymetrix data from total therapy 3 cohort (UAMS-TT3; n=158; E-TABM-
152 1138)[19] of 188 relapsed MM patients subsequently treated with bortezomib
153 (GSE9782) from the study by Mulligan *et al*[20].

154 **EZH2 inhibition in primary MM cells**

155 BM of patients presenting with previously untreated MM (n=7) at the university hospital
156 of Montpellier was obtained after patients’ written informed consent in accordance with
157 the Declaration of Helsinki and agreement of the Montpellier University Hospital Centre
158 for Biological Resources (DC-2008-417). Mononuclear cells were treated with or
159 without EPZ-6438 (370nM or 1 μ M) and/or lenalidomide (2 μ M) and MMC cytotoxicity
160 evaluated using anti-CD138-phycoerythrin monoclonal antibody (Immunotech,
161 Marseille, France) as described[6].

162 **Cell growth assay**

163 HMCLs were cultured for 15 days in RPMI 1640 medium, 10% FCS, and 2 ng/ml IL-6
164 (control medium) in the presence of EPZ-6438 (Selleckchem, Houston, TX, USA) and

165 or Decitabine. Cell concentration and viability were assessed using trypan blue dye
166 exclusion test. The number of metabolic-active cells was also determined using
167 intracellular ATP quantitation. For drug combination assay, HMCLs were cultured for
168 4 days in 96-well flat-bottom microtiter plates in RPMI 1640 medium, 10% FCS, and 2
169 ng/ml IL-6 (control medium) in the presence of Lenalidomide. Cell growth was
170 evaluated by quantifying intracellular ATP amount with a Cell Titer Glo Luminescent
171 Assay (Promega, Madison, WI, USA) using a Centro LB 960 luminometer (Berthold
172 Technologies, Bad Wildbad, Germany).

173 **Global H3K27me3 and IKZF1 immunofluorescence**

174 After deposition on slides using a Cytospin centrifuge, cells were fixed with 4% PFA,
175 permeabilized with 0.5% Triton in PBS and saturated with 5% bovine milk in PBS. The
176 rabbit anti-H3K27me3 (Active Motif, Rixensart, Belgium, #39156) and anti-IKZF1
177 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, H-100 sc-3039) antibodies were
178 diluted 1/500 and 1/250 respectively in 5% bovine milk in PBS and deposited on
179 cytospins for 60 minutes at room temperature. Slides were washed twice and anti-
180 rabbit alexa 555-conjugated antibodies (diluted 1/500 in 5% bovine milk in PBS) were
181 added for 60 minutes at room temperature. Slides were washed and mounted with
182 Vectashield and 1% DAPI. Images and fluorescence were captured with a ZEISS Axio
183 Imager Z2 microscope (X63 objective) (Oberkochen, Germany), analyzed with Omero
184 (omero.mri.cnrs.fr) server and ImageJ software.

185 **RNA sequencing**

186 HMCLs were cultured for 4 days without or with 1 μ M of EPZ6438. RNA samples were
187 collected as previously described. The RNA sequencing (RNA-seq) library preparation
188 was done with 150ng of input RNA using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library
189 Prep Kit. Paired-end RNA-seq were performed with illumina NextSeq sequencing

190 instrument (Helixio, Clermont-Ferrand, France). RNA-seq read pairs were mapped to
191 the reference human GRCh37 genome using the STAR aligner[21]. All statistical
192 analyses were performed with the statistics software R (version 3.2.3; available from
193 <https://www.r-project.org>) and R packages developed by BioConductor project
194 (available from <https://www.bioconductor.org/>)[22]. The expression level of each gene
195 was summarized and normalized using DESeq2 R/Bioconductor package[23].
196 Differential expression analysis was performed using DESeq2 pipeline. P values were
197 adjusted to control the global FDR across all comparisons with the default option of
198 the DESeq2 package. Genes were considered differentially expressed if they had an
199 adjusted p-value of 0.05 and a fold change of 1.5. Pathway enrichment analyses were
200 performed using the R package ReactomePA[24].

201 **Gene expression profiling and statistical analyses**

202 Gene expression data were normalized with the MAS5 algorithm and analyses
203 processed with GenomicScape (<http://www.genomicscape.com>)[25] the R.2.10.1 and
204 bioconductor version 2.5 programs[22]. Gene Set Expression Analysis (GSEA) was
205 used to identify genes and pathways differentially expressed between populations.
206 Univariate and multivariate analysis of genes prognostic for patients' survival was
207 performed using the Cox proportional hazard model. Difference in overall survival
208 between groups of patients was assayed with a log-rank test and survival curves
209 plotted using the Kaplan-Meier method (Maxstat R package)[26]. The EZ Score was
210 built using our previously published methodologies[27]. EZ score is the sum of the Cox
211 beta-coefficients of each of the 15 EPZ6438-deregulated genes with a prognostic
212 value, weighted by ± 1 if the patient MMC signal for a given gene is above or below the
213 Maxstat reference value of this gene[27].

214 **Cell Cycle Analysis**

215 HMCLs were cultured in 24-well, flat-bottomed microtiter plates at 10^5 cells per well in
216 RPMI1640–10% FCS or X-VIVO 20 culture medium with or without IL-6 (3ng/mL), and
217 EPZ-6438 (Selleckchem). The cell cycle was assessed using DAPI staining (Sigma-
218 Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and cells in the S phase using incubation with
219 bromodeoxyuridine (BrdU) for 1 hour and labeling with an anti-BrdU antibody (APC
220 BrdU flow kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's
221 instructions.

222 **Flow cytometry analysis**

223 Cells were fixed for 10min with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA,
224 USA) at 4°C. The overall expression of MYC, IKZF1, IRF4, H3K27me3 was evaluated
225 by incubating 10^5 cells with 5uL of an alexa 647-conjugated mouse anti-H3K27me3
226 antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 12158S), alexa 647- conjugated mouse
227 anti-EZH2 antibody (BD Biosciences, 563491) PE-conjugated mouse anti-IKZF1 (BD
228 Biosciences, 564476), rat anti-IRF4 (Biolegend, 646403), rabbit anti-MYC (Cell
229 Signaling, #12189) or anti-Ki67 antibodies in phosphate-buffered saline (PBS)
230 containing 2% FBS at 4°C for 20 minutes.

231 For primary samples, cells were double stained with APC or PE-conjugated anti-
232 CD138 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA). Flow cytometry analysis was done on a
233 Fortessa flow cytometer (BD, Mountain View, CA, USA).

234 **Study of apoptosis**

235 HMCLs were cultured in 24-well, flat-bottomed microtiter plates at 10^5 cells per well in
236 RPMI1640–10% FCS or X-VIVO 20 culture medium with or without IL-6 (3ng/mL),
237 EPZ-6438 (Selleckchem) and QVD. After 8 days of culture, cells were washed twice in
238 PBS and apoptosis was assayed with PE-conjugated Annexin V labeling (BD
239 Biosciences) using a Fortessa flow cytometer (BD).

240 **H3K27me3-associated genes in MM patients**

241 The list of H3K27me3 associated genes in MM patients was recovered from GEO
242 GSE53215 and used for the development of the EZ-score.

243 **RT-qPCR**

244 RNA was converted to cDNA using the Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit
245 (Qiagen, Hilden, Germany). The assays-on-demand primers and probes and the
246 TaqMan Universal Master Mix were used according to the user's manual (Biosystems,
247 Courtaboeuf, France). The measurement of gene expression was performed using the
248 Roche LC480 Sequence Detection System. For each primer, serial dilutions of a
249 standard cDNA were amplified to create a standard curve, and values of unknown
250 samples were estimated relative to this standard curve in order to assess PCR
251 efficiency. Ct values were obtained for *GAPDH* and the respective genes of interest
252 during log phase of the cycle. Gene expression was normalized to that of *b2M* ($dCt =$
253 $Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ } b2M$) and compared with the values obtained for a known
254 positive control using the following formula: $100/2^{ddCt}$ where $ddCt = dCt \text{ unknown} -$
255 $dCt \text{ positive control}$.

256 **Western-blot**

257 Cells were lysed in RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
258 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride immediately before use.
259 Lysates were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
260 (10% gels) and transferred to nitrocellulose membranes using an iBlot® Gel Transfer
261 Device (Invitrogen). Non-specific membrane sites were blocked by incubation at room
262 temperature in 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1% Tween 20
263 (tris-buffered saline Tween-20), 5% non-fat milk for 2 h, and then immunoblotted with
264 rabbit polyclonal antibodies against Ikaros (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX,

265 USA), cMyc (Cell Signaling Technology) or IRF4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas,
266 TX, USA). As a control for protein loading, a mouse monoclonal anti- β -actin antibody
267 (Sigma-Aldrich) was used. The primary antibodies were visualized with peroxidase-
268 conjugated goat anti-rabbit (Sigma-Aldrich) or goat anti-mouse (Jackson
269 ImmunoResearch, West grove, PA, USA) antibodies and an enhanced
270 chemiluminescence detection system. Western blots were quantified by densitometry
271 using the NIH ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and
272 protein levels were normalized according to those of β -actin.

273 **Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing**

274 Cells were cross-linked in formaldehyde at a final concentration of 1% for 8 minutes.
275 All experiments reagents were included in the Auto iDeal ChIP-seq kit for Histones
276 (Diagenode, Liege, Belgium). Sonication was performed using a Bioruptor Plus
277 sonication devise (Diagenode, Liege, Belgium) under the optimal conditions to shear
278 cross-linked DNA to fragments if 100-300 base pairs in length. ChIP was conducted
279 with the IPStar Compact Automated System (Diagenode, Liege, Belgium). ChIP were
280 performed starting from 1 million cells per IP, using the indirect method in 200uL final
281 volume. Crossed-linked DNA was incubated 13h with the antibody (H3K27me3 catalog
282 number C1540195 or H3K4me3 catalog number C15410003) and 3h with the beads.
283 After 5min washes, eluates were recovered and reverse cross-linked for 4h at 65°C.
284 Samples were treated for 1h with RNase at 37°C, prior to DNA purification with the
285 Auto IPure kit v2 (Diagenode, C03010010). Libraries were performed using NEBNext
286 Ultra Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Sequencing was performed
287 with Illumina NextSeq500 technology (Helixio, Clermont-Ferrand, France) using the
288 following parameters : single-read, 50bp, 40 millions reads.

289 **DNA methylation Analysis**

290 Methylation analysis was performed using the Illumina Infinium HumanMethylation450
291 BeadChip array (HM450K, Illumina Inc). The microarray raw intensities were
292 preprocessed using the R/Bioconductor package minfi[28]. The methylated CpGs
293 overlapping with genes promoter region were extracted using the R package
294 GenomicFeatures[29] implemented in Bioconductor. A CpG is defined as highly
295 methylated when the methylation beta level is above 0.8.

296

297 **RESULTS**

298 **PRC2 complex is overexpressed in malignant plasma cells in association with** 299 **cell cycle deregulation**

300 Using Affymetrix microarrays, we analyzed the expression of PRC2 core genes *EZH2*,
301 *SUZ12* and *EED* in normal bone marrow plasma cells (BMPCs, n = 5), primary
302 myeloma cells from patients (MMCs, n = 206) and human myeloma cell lines (HMCLs,
303 n = 26). PRC2 core genes are significantly overexpressed in MM cells (Figure 1A) and
304 their expression are significantly correlated (Supplementary Figure S1). At the
305 opposite, PRC1 core genes were significantly downregulated in MM cells compared to
306 normal plasma cells underlining polycomb complex deregulation in MM
307 (Supplementary Figure S2).

308 Investigating the prognostic value of *EZH2*, *SUZ12* and *EED* expression in
309 independent cohorts of previously-untreated MM patients, using Maxstat R
310 algorithm[30], only *EZH2* expression was found to be associated with MM patient's
311 outcome as recently reported[13] (Supplementary Figure S3). *EZH2* is significantly
312 overexpressed in patients with del17p and 1q21 gain (Supplementary Figure S4A and
313 B). *EZH2* expression is significantly correlated with MMC plasma cell labeling index
314 (PCLI) in a cohort of 101 newly diagnosed patients ($P < 0.005$; Figure 1B) underlining

315 a link between PRC2 expression and deregulation of cell cycle in MM cells.
316 Furthermore, GSEA analysis of patients with high *EZH2* expression identified a
317 significant enrichment for genes involved in cell cycle, upregulated in proliferating
318 plasmablasts compared to mature BMPCs, and *EZH2* targets ($P < 0.0001$) (Figure 1C).
319 Altogether, these data underline that PRC2 complex is overexpressed in MMCs in
320 association with a proliferative plasmablastic gene signature and a poor prognosis.
321 To investigate the therapeutic interest of *PRC2* deregulation to target MM cells, XG1,
322 XG12, XG19, LP1, XG25 and XG7 HMCLs were treated with clinically relevant doses
323 of *EZH2* inhibitor EPZ-6438 (370nM and 1 μ M)[14, 31]. EPZ-6438 treatment induced a
324 significant decrease of global H3K27me3 in all the HMCLs tested ($P < 0.01$)
325 (Supplementary Figures S5 and S6) and inhibited MM cell growth together with
326 proliferation inhibition and apoptosis induction in 3 out of the 6 HMCLs tested (Figure
327 2A and Supplementary Figure S7). The inhibitory effect appeared at day 6, suggesting
328 that it is mediated by epigenetic reprogramming (Figure 2A). *EZH2* inhibitor induced
329 apoptosis was partially rescued by the QVD pan-caspase inhibitor, suggesting a
330 caspase-dependent mechanism (Supplementary Figure S7). LP1 and XG7 were more
331 resistant to *EZH2* inhibitor whereas XG25 HMCL was completely resistant. Primary
332 MM cells co-cultured with their bone marrow microenvironment and recombinant IL-6
333 were also treated with EPZ-6438 as previously described[6]. *EZH2* targeting
334 significantly reduced the median number of viable myeloma cells by 35% ($P = 0.004$)
335 in 9/17 patients whereas MM cells of 8 patients were not significantly affected by the
336 *EZH2* inhibitor (Figure 2B and Supplementary Figure S8). As described in HMCLs,
337 EPZ-6438 induced a significant global H3K27me3 decrease in all the patients (Figure
338 2C) and the effect of *EZH2* inhibitor was not correlated with *EZH2* expression,
339 H3K27me3 levels or UTX/JMJD3 demethylases mutation status (Supplementary

340 Figure S9 and Supplementary Table S1).

341 We therefore conclude that MM cell growth could be affected by PRC2 targeted
342 therapy which present a therapeutic interest in a subgroup of MM patients.

343

344 **Genes deregulated by PRC2 targeted inhibition in myeloma cells**

345 To better understand the molecular mechanisms associated with PRC2 deregulation
346 in MM, six HMCLs were treated with 1 μ M of EPZ-6438 for 4 days and GEP were
347 analyzed using RNA sequencing. 263 genes are significantly upregulated in EPZ-6438
348 treated MMC compared to untreated cells (Fold change \geq 2, 1000 permutations, FDR
349 $<$ 0.05, Supplementary Table S2). Notably, no gene was significantly downregulated
350 after EPZ-6438 treatment. EZH2-regulated genes are significantly enriched in
351 Polycomb target genes, genes enriched in H3K27me3 histone mark, genes described
352 to be associated with DNA methylation in MM, TP53 and RB1 target genes (Figure 3A
353 and Supplementary Table S3). Interestingly, a set of these genes is overexpressed in
354 non-cycling mature normal plasma cells compared to proliferating plasmablasts
355 (Figure 3A and Supplementary Table S3). Among these 263 genes deregulated after
356 EPZ-6438 treatment, 174 were also associated with H3K27me3 mark in XG7 HMCL
357 including 160 bivalent genes with H3K4me3 and H3K27me3 (Figure 3B and
358 Supplementary Table S4).

359

360 **Resistance to EZH2 inhibitor is mediated by DNA methylation of PRC2 target** 361 **genes**

362 Since PRC2 target genes were associated with a significant enrichment of genes
363 presenting DNA methylation in MM, we analyzed the methylation status at the
364 promoter region of EZH2 inhibitor target genes using 450k microarrays. Interestingly,

365 155 out the 263 EZH2 inhibitor target genes were associated with significant CpG
366 methylation in their promoter (Figure 3C). Furthermore, 111 of these 155 genes were
367 also significantly upregulated after HMCL treatment with Decitabine (ratio >1.5) (Figure
368 3D). A significant difference in CpG methylation status of EZH2 inhibitor target genes
369 were identified between sensitive and resistant HMCLs ($p < 0.01$) (Figure 3C).
370 Interestingly, combination of a sublethal dose of Decitabine (100nM, IC₁₀) with EPZ-
371 6438 (1 μ M) allowed to sensitize XG7 and XG25 EPZ-6438-resistant HMCLs. After 8
372 and 11 days of treatment, we observed a significant cell growth inhibition in both cell
373 lines (67.4% and 62.4% respectively, $P < 0.01$ in XG7, and 72.2% and 85.2%
374 respectively in XG25), compared to Decitabine or EPZ-6438 used alone ($P < 0.05$)
375 (Figure 3E).

376 These data demonstrate that PRC2 target genes could be associated with DNA
377 methylation underlying an overlap between epigenetic silencing mechanisms on potent
378 key MM tumor suppressor genes.

379

380 **PRC2 inhibition sensitizes myeloma cells to lenalidomide**

381 We investigated whether EZH2 inhibition could enhance the anti-myeloma activity of
382 melphalan, bortezomib and lenalidomide treatment. EPZ-6438 pretreatment does not
383 significantly enhance the effect of melphalan and bortezomib treatment on MMCs *in*
384 *vitro* (data not shown). However, EPZ-6438 pretreatment significantly sensitized
385 HMCLs to lenalidomide treatment. Treatment for 4 days with 1 μ M of EPZ-6438 prior
386 to lenalidomide treatment significantly enhanced toxicity on LP1 and XG19 HMCLs (P
387 < 0.05) (Figure 4A). Furthermore, EZH2 inhibition was able to overcome lenalidomide
388 resistance in XG7 and XG25 cell lines (Figure 4A). These data strongly suggest that
389 combination of EZH2 inhibitor and IMiDs could be of therapeutic interest in MM.

390 These results were validated using primary MMCs from patients[6, 27]. The median
391 percentage of viable MMCs was reduced of 43.4%, 26.9% and 75.1% when cells were
392 treated with lenalidomide, EPZ-6438 or the combination EPZ-6438/lenalidomide
393 respectively ($P = 0.003$; $n = 5$) (Figure 4B). Global H3K27me3 levels showed a
394 tendency toward decrease under combination treatment, although the difference was
395 not significant.

396

397 **PRC2 targeting combined with Lenalidomide induced MM cell transcriptional**
398 **reprogramming.**

399 Using RNA sequencing GEP data, we then compared MM cell lines treated by EPZ-
400 6438, lenalidomide or EPZ-6438/lenalidomide combination. 31 genes were commonly
401 upregulated by the EPZ-6438 and EPZ-6438/lenalidomide combination (Figure 4C).
402 67% of the genes deregulated by lenalidomide in MM are also deregulated by the EPZ-
403 6438/lenalidomide combination (Figure 4C and Supplementary Table S6).
404 Furthermore, EPZ-6438/lenalidomide induced a significantly higher deregulation of
405 EPZ-6438 or Lenalidomide target genes including *PARP9*, *RGS1*, *DKK1*, *SEZ6L2*,
406 *CAV2*, *ANTXR1*, *EMP1* and *ANXA1* (ratio > 1.5, $P < 0.05$; Figure 4D and
407 Supplementary Tables S6 and S7).

408 76% of EPZ-6438/lenalidomide deregulated genes were not affected by EPZ-6438 or
409 lenalidomide alone, suggesting a synergy between EZH2 inhibitor and IMiDs in
410 transcriptional regulation. Among the 231 genes significantly upregulated uniquely
411 after EPZ-6438/lenalidomide treatment, we found a significant enrichment of PRC2
412 and RB1 target genes, of genes downregulated by MYC, and genes silenced by DNA
413 methylation (Figure 4E and Supplementary Table S8). GSEA analysis of the 82
414 specifically downregulated genes by EPZ-6438/lenalidomide revealed a significant

415 enrichment of MYC target genes in association to genes involved in proliferation and
416 replicative stress response (Figure 4F and Supplementary Table S8). Altogether, these
417 data indicate that EPZ-6438/lenalidomide induced a significant upregulation of PRC2,
418 RB1 and DNA methylation target genes in association with a significant downregulation
419 of MYC target genes and cell proliferation gene program.

420 IMiDs promote Ikaros and Aiolos transcription factors binding to the E3 ubiquitin ligase
421 cereblon (CRBN) leading to their ubiquitination and proteasomal degradation[32].
422 Ikaros and Aiolos degradation is associated with a downregulation of Interferon
423 regulatory factor 4 (IRF4) and MYC which, in turn, reduces MMCs survival[33].
424 Investigating the effect of EPZ-6438/lenalidomide combination in MMCs, we found that
425 Ikaros (IKZF1), IRF4 and MYC protein levels were significantly more inhibited by the
426 combination treatment (65.5%, 63.9% and 14.8% respectively) compared with
427 lenalidomide (51.5%, 43% and 2.2%) or EPZ-6438 (45.2%, 38.7% and 6.2%) alone
428 (Figure 5A). These data were validated by western blot and immunofluorescence
429 (Supplementary Figures S10 and S11). Furthermore, EPZ-6438/lenalidomide
430 combination strongly upregulated *PAX5*, *BACH2* and *BCL6* B cell transcription factors
431 in association with downregulation of PRDM1 and IRF4 key plasma cell transcription
432 factor (Figures 5B). These data were validated by q-RT-PCR (Supplementary Figure
433 S12). Interestingly, ChIP-seq analysis showed the bivalence of *PAX5* gene. *PAX5*
434 expression could be directly regulated by EZH2 through H3K27me3 (Supplementary
435 Figure S13). EPZ-6438/lenalidomide mediated transcriptional deregulation resulted in
436 significant MMC proliferation inhibition and quiescence induction characterized by a
437 significant increase in the percentage of G0/G1 cells and ki67 negative cells together
438 with E2F1 downregulation and CDKN1A induction (Figure 5 C, D, and E).

439

440 **EZ-GEP-based score allows to predict sensitivity of MMCs to EZH2 inhibitor**
441 **treatment**

442 Since the sensitivity of MMC to EZH2 inhibition is heterogeneous, we searched to
443 define a biomarker allowing the identification of MM patients that could benefit from
444 EZH2 inhibitor treatment. We built a GEP-based score (EZ-score), using the prognostic
445 information of 15 genes deregulated by EPZ-6438 and associated with H3K27me3 and
446 a prognostic value in newly-diagnosed MM patients (Figure 6A and Supplementary
447 TableS5). The EZ-score is defined by the sum of the beta coefficients of the Cox model
448 for each prognostic gene, weighted by -1 according to the patient MMC signal above
449 or below the probe set Maxstat value as previously described[16]. EZ-score levels in
450 normal, premalignant, or malignant plasma cells are displayed in Figure 6B. MMCs of
451 patients had a significantly higher EZ-score than normal BMPCs or plasma cells from
452 MGUS patients ($P < 0.01$). HMCLs present an even higher EZ-score compared with
453 primary MMCs ($P < 0.001$; Figure 6B), demonstrating an association between EZ-
454 score and the progression of the disease.

455 Using patient's HM and UAMS-TT2 cohorts, the EZ-score had prognostic value when
456 used as a continuous variable or by splitting patients into 2 groups using the Maxstat
457 R function[16]. The EZ-score split patients in a high-risk group (EZ-score > 0.686) and
458 a low-risk group (EZ-score < 0.686) in the HM and UAMS-TT2 cohorts ($P < 0.0001$)
459 (Figure 6C).

460 We then sought to identify whether the EZ-score could predict for the sensitivity of
461 HMCLs to EPZ-6438. Using our large cohort of HMCLs[15], we analyzed the response
462 of 5 HMCLs with the highest EZ-score and 5 HMCLs with the lowest EZ-score to EZH2
463 inhibitor treatment. The 5 HMCLs with the highest EZ-score exhibit a significant 20-
464 fold median higher sensitivity to EPZ-6438 compared with the 5 HMCLs with low EZ-

465 score ($P = 0.04$) (Figure 6D).

466 To determine whether the EZ-score could predict the sensitivity of primary MMCs to
467 EPZ-6438, we analyzed the correlation between its toxicity on MMCs and the EZ-score
468 value in a panel of 14 patients. Primary MMCs were cultured together with their bone
469 marrow environment, recombinant IL-6, and 1 μ M of EPZ-6438 for 8 days. As identified
470 in HMCLs, a significant correlation between EZ-score and EZH2 inhibitor activity on
471 primary MMCs was observed ($r = -0.68$; $P = 0.005$) (Figure 6E). A high EZ-score value
472 is associated with a higher toxicity of EZH2 inhibitor in MMCs. The EZ-score allows the
473 identification of a subgroup of MM patients with a poor outcome that could benefit from
474 EZH2 inhibitor treatment.

475

476

477 **DISCUSSION**

478 Our results underline a significant deregulation of PRC1 and PRC2 complex in MM
479 and extend recent studies which pointed out a role of EZH2 in MM biology [7–11, 13].
480 We demonstrated that PRC2 deregulation is associated with cell cycle deregulation
481 and a proliferative plasmablastic gene expression signature. Our data suggest that
482 PRC2 deregulation could support MM physiopathology, dissemination and
483 progression. EZH2 inhibitors have been reported to induce expression of miRNA and
484 decrease expression of oncogenes[12, 34]. PRC2 targeting, using EZH2 inhibitor,
485 represents a potent therapeutic strategy in a subgroup of MM patients resulting in a
486 significant induction of Polycomb target genes, genes associated with DNA
487 methylation, TP53 and RB1 target genes. As reported in diffuse large B cell
488 lymphoma[35], we found that H3K27me3 global levels are potently reduced after EPZ-
489 6438 treatment in all HMCLs and primary MM samples tested. However, no link with

490 EZH2 inhibitor sensitivity was identified. Even if UTX loss was recently reported to
491 sensitize MM cell lines to EZH2 inhibition[34], neither EZH2 gene expression nor UTX
492 mutation status was predictive of MM cell response to PRC2 targeting in our collection
493 of MM cell lines representative of molecular heterogeneity. However, we identified a
494 significant overlap between H3K27me3 and DNA methylation of EPZ-6438 target
495 genes in MM cells resistant to EZH2 inhibitor. These two epigenetic repression
496 systems are mechanistically linked. Indeed, EZH2, as part of PRC2 complex, is
497 required for its target gene promoter methylation[36]. These data underline that PRC2
498 target genes could comprise key MM tumor suppressor genes silenced by different
499 epigenetic silencing. Interestingly, sublethal doses of DNMTi allows to sensitize EPZ-
500 6438 resistant MM cell lines to EZH2 inhibitor. A major stake remains the identification
501 of biomarkers that can quickly identify the subset patients who could benefit from EZH2
502 inhibitor treatment.

503 We developed an EZ-score based on 15 EPZ-6438 target genes associated with
504 H3K27me3 and prognostic value in primary MMCs. Our results demonstrate that the
505 EZ-score allows the identification of MM patients with a high EZ-score value, an
506 adverse prognosis and who could benefit from treatment with EZH2 inhibitors. The
507 expression of 12 out of the 15 genes building the EZ-score is associated with favorable
508 outcome in MM. However, their biological functions in MM remain to be characterized.
509 Several of those genes are known tumor suppressors that are hypermethylated in solid
510 cancers (*CACNA1G*, *IRF6*, *ITGA9* and *PPP2R2C*) and used as biomarkers related to
511 adverse outcome[37–50]. In MM, *SORL1*, a member of the low-density lipoprotein
512 receptor family, is significantly hypermethylated at relapse compared to diagnosis in
513 MM[51, 52]. *SLC5A1* encodes a member of the sodium-dependent glucose transporter

514 (SGLT) family. *SLC5A1* is a good prognosis biomarker in cervical tumors. *SLC5A1*
515 activation through MAP17 increases ROS production[53].
516 *FBLIM1* is a widely expressed protein presenting a role in cellular shape modulation,
517 motility and differentiation[54]. Interestingly, *FBLIM1* expression is reduced in breast
518 cancer and has also been shown to sensitize glioma cells to cisplatin-induced
519 apoptosis[55, 56]. Members of beta-arrestin such as *ARRB1* participate in the
520 sensitization/desensitization of G-protein-coupled receptors. The loss of *ARRB1* is
521 related to a poor outcome in NSCLC patients[57]. *ARRB1* can regulate apoptosis and
522 DNA repair and its overexpression induced DNA damage in NSCLC cells[58]. *THY1*
523 (CD90) is a cell surface glycoprotein involved in cell adhesion and cell communication.
524 In nasopharyngeal carcinoma, *THY1* is poorly expressed due to its promoter
525 hypermethylation. *THY1* overexpression in this cell type induces a G0/G1 cell cycle
526 arrest[59]. These data emphasize that EZH2 inhibitor induces transcriptional activation
527 of potential MM tumor suppressor genes.

528 Given that monotherapy remains inefficient in MM, a particular association of drugs is
529 usually used to treat MM disease. Unfortunately, despite rising advances in drug
530 development and patient care, MM patients often relapse[60, 61]. By combining EPZ-
531 6438 with MM conventional drugs, we uncovered its synergistic activity with
532 Lenalidomide. Furthermore, pre-treatment of MMCs with EZH2 inhibitor was able to
533 overcome Lenalidomide resistance (Figure 4). Transcriptome analysis of cells treated
534 with EPZ-6438/lenalidomide showed a combination-specific deregulated set of genes
535 enriched in GSEA signature related to MYC targeting and genes involved in
536 proliferation and replicative stress response. Furthermore, PRC2 inhibition and most
537 significantly EPZ-6438/lenalidomide combination upregulated *PAX5*, *BACH2* and
538 *BCL6* B cell transcription factors. Recently, EZH2i have been shown to induce *BCL6*

539 expression in MM cell lines in association with cell death[34]. PAX5, BCL6 and BACH2
540 repress PRDM1 plasma cell transcription factor. PRDM1 is known to repress BCL6
541 and PAX5[62–65] but epigenetic mechanisms may play a major role in B cell
542 transcription factor silencing during plasma cell differentiation as underlined by the
543 bivalent domain of PAX5, including H3K4me3 and H3K27me3 marks, identified in MM
544 cells (Supplementary Figure S13). Accordingly, EPZ-6438/lenalidomide treatment
545 resulted in downregulation of PRDM1 and IRF4 expression. By binding to Cereblon
546 (CRBN), the IMiD enhances Ikaros and Aiolos proteosomal degradation, thus leading
547 to IRF4 and MYC downregulation[32]. These two factors have been shown to be critical
548 for MMCs survival and disease progression[33]. Our data revealed that EPZ-6438 and
549 Lenalidomide combination interfere with MYC transcriptional activity and significantly
550 decreased Ikaros, IRF4 and MYC expression compared with Lenalidomide alone.
551 Finally, we discovered in this study that EZH2 inhibition and IMiDs activity act
552 synergistically to alter gene transcription in MM cells, specifically targeting MM
553 oncogenes and cell cycle genes. The deregulation of B and plasma cell transcription
554 factors mediated by PRC2 targeting and IMiDs results in a significant shift between
555 proliferation and quiescence with a significant increase in the percentage of ki67
556 negative MM cells and a significant induction of quiescent cell features including
557 repression of E2F1 and higher level of p21 Cdk inhibitor[66–69]. Since MYC activates
558 E2F expression and represses p21[68], this reprogramming may be explained by the
559 dual targeting of MYC-IRF4 axis by EPZ-6438/lenalidomide combination.

560

561 **Conclusion**

562 Altogether, our data demonstrate a deregulation of PRC profiles in MM cells
563 contributing to malignant phenotype. The transcriptional deregulation mediated by

564 PRC2 represent a therapeutic target in MM and a synergy was identified with IMiDs.
565 PRC2 targeting in association with IMiDs could have a therapeutic interest in high-risk
566 MM patients characterized by high EZ-score values, reactivating B cell transcription
567 factors and tumor suppressor genes.

568

569 **List of abbreviations**

570 DNMTi : DNA methyltransferases inhibitor

571 EZH2 : Enhancer of zeste homologue 2

572 EZH2i : EZH2 inhibitor

573 HMCL : Human myeloma cell line

574 IMiDs : Immunomodulatory Drugs

575 MM : Multiple myeloma

576 MMC : Multiple myeloma cells

577 PRC : Polycomb Repressive Complex

578

579 **Declarations**

580

581 **Acknowledgment**

582 We thank the Microarray Core Facility of IRMB, CHU Montpellier.

583

584 **Funding**

585 This work was supported by grants from French INCA (Institut National du Cancer)
586 Institute (2012-109/087437 and PLBIO15-256), Languedoc Roussillon CRLR
587 (R14026FF), LR-FEDER Hemodiag, Fondation de France (201400047510), ITMO
588 Cancer (MM&TT), SIRIC Montpellier (INCa-DGOS-Inserm 6045), the German Federal
589 Ministry of Education (BMBF) "CAMPSIMM" (01ES1103) and within the framework of

590 the e:Med research and funding concept “CLIOMMICS” (01ZX1309), and the
591 Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TRR79; subproject B1). LH is supported by
592 a grant from Labex EpiGenMed.

593

594 **Availability of data and materials**

595 HMCLs gene expression profiling using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays are
596 deposited in the ArrayExpress public database under accession numbers E-TABM-
597 937 and E-TABM-1088[15]. Bone marrow were collected from 206 patients treated
598 with high dose Melphalan (HDM) and autologous stem cell transplantation (ASCT) and
599 this cohort is termed “Heidelberg-Montpellier” (HM) cohort[16]. Patients’ MMCs were
600 purified using anti-CD138 MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
601 Germany) and their gene expression profile (GEP) obtained using Affymetrix U133
602 plus 2.0 microarrays as described[17]. The CEL files and MAS5 files are available in
603 the ArrayExpress public database (E-MTAB-372). The other datasets generated
604 and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author
605 on reasonable request.

606

607 **Ethics approval and consent to participate**

608 BM of patients presenting with previously untreated MM at the university hospital of
609 Montpellier was obtained after patients’ written informed consent in accordance with
610 the Declaration of Helsinki and agreement of the Montpellier University Hospital Centre
611 for Biological Resources (DC-2008-417).

612

613 **Consent for publication**

614 Not Applicable

615 **Conflict of interest statement**

616 The authors declare that they have no competing interests.

617

618 **Author contributions**

619 LH performed research and participated in the writing of the paper.

620 GR, NR, SB participated in the research.

621 AK participated in GEP data analyses and bioinformatics.

622 HG, AS, GCartron, LV, CMT and DH participated in clinical data analysis and

623 participated in the writing of the paper.

624 GCavalli participated in the research and in the writing of the paper.

625 JM supervised the research and the writing of the paper.

626

627 **REFERENCES**

- 628 1. Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B, Moreaux J. EZH2 in normal hematopoiesis
629 and hematological malignancies. *Oncotarget*. 2016;7:2284.
- 630 2. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing
631 myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood*. 2014;124:3043–
632 51.
- 633 3. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al.
634 Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted
635 Therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:91–101.
- 636 4. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et
637 al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma.
638 *Nat Commun*. 2014;5. doi:10.1038/ncomms3997.
- 639 5. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET
640 Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell*.
641 2011;146:904–17.
- 642 6. Moreaux J, Reme T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al.
643 Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase
644 inhibitors. *Br J Cancer*. 2013;109:676–85.
- 645 7. Kalushkova A, Fryknäs M, Lemaire M, Fristedt C, Agarwal P, Eriksson M, et al.
646 Polycomb Target Genes Are Silenced in Multiple Myeloma. *PLoS ONE*.
647 2010;5:e11483.
- 648 8. Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste
649 homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant
650 ras phenotype. *Oncogene*. 2005;24:6269–6280.
- 651 9. Zhao F, Chen Y, Li R, Liu Y, Wen L, Zhang C. Triptolide alters histone H3K9 and
652 H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis
653 in multiple myeloma in vitro. *Toxicology*. 2010;267:70–9.
- 654 10. Agarwal P, Alzrigat M, Párraga AA, Enroth S, Singh U, Ungerstedt J, et al.
655 Genome-wide profiling of histone H3 lysine 27 and lysine 4 trimethylation in multiple
656 myeloma reveals the importance of Polycomb gene targeting and highlights EZH2 as
657 a potential therapeutic target. *Oncotarget*. 2016;7:6809.
- 658 11. Hernando H, Gelato KA, Lesche R, Beckmann G, Koehr S, Otto S, et al. EZH2
659 Inhibition Blocks Multiple Myeloma Cell Growth through Upregulation of Epithelial
660 Tumor Suppressor Genes. *Mol Cancer Ther*. 2016;15:287–98.
- 661 12. Alzrigat M, Párraga AA, Agarwal P, Zureigat H, Österborg A, Nahi H, et al. EZH2
662 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and
663 upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *OncoTarget*. 2016.
664 [https://www.researchgate.net/profile/Mohammad_Alzrigat/publication/312021585_EZ
665 H2_inhibition_in_multiple_myeloma_downregulates_myeloma_associated_oncogene
666 s_and_upregulates_microRNAs_with_potential_tumor_suppressor_functions/links/58
667 694b7008ae8fce4917d807.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mohammad_Alzrigat/publication/312021585_EZH2_inhibition_in_multiple_myeloma_downregulates_myeloma_associated_oncogenes_and_upregulates_microRNAs_with_potential_tumor_suppressor_functions/links/58694b7008ae8fce4917d807.pdf). Accessed 6 Apr 2017.
- 668 13. Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, Stein CK, Walters Z, Aronson LI, et al.
669 Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and
670 dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J*. 2017;7:e549.
- 671 14. Kurmasheva RT, Sammons M, Favours E, Wu J, Kurmashev D, Cosmopoulos K,
672 et al. Initial testing (stage 1) of tazemetostat (EPZ-6438), a novel EZH2 inhibitor, by
673 the Pediatric Preclinical Testing Program: Kurmasheva et al. *Pediatr Blood Cancer*.
674 2016. doi:10.1002/pbc.26218.

675 15. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maiga S, Hose D, et al. A high-risk
676 signature for patients with multiple myeloma established from the molecular
677 classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011;96:574–82.

678 16. Hose D, Reme T, Hielscher T, Moreaux J, Messner T, Seckinger A, et al.
679 Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and
680 risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica*. 2011;96:87–95.

681 17. Hose D, Rème T, Meissner T, Moreaux J, Seckinger A, Lewis J, et al. Inhibition of
682 aurora kinases for tailored risk-adapted treatment of multiple myeloma. *Blood*.
683 2009;113:4331–4340.

684 18. Barlogie B. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1:
685 role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood*.
686 2006;107:2633–8.

687 19. Pineda-Roman M, Zangari M, van Rhee F, Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A,
688 et al. VTD combination therapy with bortezomib–thalidomide–dexamethasone is highly
689 effective in advanced and refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22:1419–27.

690 20. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, et al. Gene
691 expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome
692 inhibitor bortezomib. *Blood*. 2007;109:3177–3188.

693 21. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR:
694 ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15–21.

695 22. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al.
696 Bioconductor: open software development for computational biology and
697 bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5:1.

698 23. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion
699 for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15. doi:10.1186/s13059-014-
700 0550-8.

701 24. Yu G, He Q-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway
702 analysis and visualization. *Mol BioSyst*. 2016;12:477–9.

703 25. Kassambara A, Rème T, Jourdan M, Fest T, Hose D, Tarte K, et al.
704 GenomicScape: An Easy-to-Use Web Tool for Gene Expression Data Analysis.
705 Application to Investigate the Molecular Events in the Differentiation of B Cells into
706 Plasma Cells. *PLOS Comput Biol*. 2015;11:e1004077.

707 26. Küffner R, Zach N, Norel R, Hawe J, Schoenfeld D, Wang L, et al. Crowdsourced
708 analysis of clinical trial data to predict amyotrophic lateral sclerosis progression. *Nat*
709 *Biotechnol*. 2014;33:51–7.

710 27. Moreaux J, Reme T, Leonard W, Veyrone J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al.
711 Development of Gene Expression-Based Score to Predict Sensitivity of Multiple
712 Myeloma Cells to DNA Methylation Inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:2685–92.

713 28. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD,
714 et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of
715 Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30:1363–9.

716 29. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al.
717 Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput Biol*. 2013;9.
718 doi:10.1371/journal.pcbi.1003118.

719 30. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank
720 statistics. *Comput Stat Data Anal*. 2003;43:121–137.

721 31. Cummin TE, Araf S, Du M, Barrans S, Bentley MA, Clipson A, et al. PROGNOSTIC
722 SIGNIFICANCE AND CORRELATION TO GENE EXPRESSION PROFILE OF EZH2
723 MUTATIONS IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA (DLBL) IN 2 LARGE
724 PROSPECTIVE STUDIES. *Hematol Oncol*. 2017;35:158–159.

725 32. Guirguis AA, Ebert BL. Lenalidomide: deciphering mechanisms of action in
726 myeloma, myelodysplastic syndrome and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;37:61–7.
727 33. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, et al. Rate
728 of CRL4CRBN substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of
729 lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and
730 IRF4. *Blood Cancer J.* 2015;5:e354.
731 34. Ezponda T, Dupéré-Richer D, Will CM, Small EC, Varghese N, Patel T, et al.
732 UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and
733 Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. *Cell Rep.* 2017;21:628–40.
734 35. Garapaty-Rao S, Nasveschuk C, Gagnon A, Chan EY, Sandy P, Busby J, et al.
735 Identification of EZH2 and EZH1 Small Molecule Inhibitors with Selective Impact on
736 Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Growth. *Chem Biol.* 2013;20:1329–39.
737 36. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb
738 group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2005;439:871–4.
739 37. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa J-PJ. Inactivation of CACNA1G,
740 a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human
741 tumors. *Cancer Res.* 1999;59:4535–4541.
742 38. Cha Y, Kim K-J, Han S-W, Rhee YY, Bae JM, Wen X, et al. Adverse prognostic
743 impact of the CpG island methylator phenotype in metastatic colorectal cancer. *Br J*
744 *Cancer.* 2016;115:164–71.
745 39. Ohkubo T. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is
746 involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer
747 cells. *Int J Oncol.* 2012. doi:10.3892/ijo.2012.1422.
748 40. Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen
749 N. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in
750 retinoblastoma. *Exp Eye Res.* 2008;86:201–6.
751 41. Bailey CM, Abbott DE, Margaryan NV, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJC. Interferon
752 Regulatory Factor 6 Promotes Cell Cycle Arrest and Is Regulated by the Proteasome
753 in a Cell Cycle-Dependent Manner. *Mol Cell Biol.* 2008;28:2235–43.
754 42. Zengin T, Ekinci B, Kucukkose C, Yalcin-Ozuysal O. IRF6 Is Involved in the
755 Regulation of Cell Proliferation and Transformation in MCF10A Cells Downstream of
756 Notch Signaling. *PLOS ONE.* 2015;10:e0132757.
757 43. Mostovich LA, Prudnikova TY, Kondratov AG, Loginova D, Vavilov PV, Rykova VI,
758 et al. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast
759 tumors. *Cell Adhes Migr.* 2011;5:395–401.
760 44. Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS,
761 Kudryavtseva AV, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3
762 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics.* 2013;8:409–20.
763 45. Nawaz I, Hu L-F, Du Z-M, Moumad K, Ignatyev I, Pavlova TV, et al. Integrin α 9
764 gene promoter is hypermethylated and downregulated in nasopharyngeal carcinoma.
765 *Oncotarget.* 2015;6:31493.
766 46. Mumby M. PP2A: Unveiling a Reluctant Tumor Suppressor. *Cell.* 2007;130:21–4.
767 47. Bluemn EG, Spencer ES, Mecham B, Gordon RR, Coleman I, Lewinshtein D, et
768 al. PPP2R2C Loss Promotes Castration-Resistance and Is Associated with Increased
769 Prostate Cancer-Specific Mortality. *Mol Cancer Res.* 2013;11:568–78.
770 48. Bi D, Ning H, Liu S, Que X, Ding K. miR-1301 promotes prostate cancer
771 proliferation through directly targeting PPP2R2C. *Biomed Pharmacother.* 2016;81:25–
772 30.

773 49. Wu A-H, Huang Y, Zhang L-Z, Tian G, Liao Q-Z, Chen S-L. MiR-572 prompted cell
774 proliferation of human ovarian cancer cells by suppressing PPP2R2C expression.
775 Biomed Pharmacother. 2016;77:92–7.
776 50. Fan Y, Chen L, Wang J, Yao Q, Wan J. Over expression of PPP2R2C inhibits
777 human glioma cells growth through the suppression of mTOR pathway. FEBS Lett.
778 2013;587:3892–7.
779 51. Sugita Y, Ohwada C, Kawaguchi T, Muto T, Tsukamoto S, Takeda Y, et al.
780 Prognostic impact of serum soluble LR11 in newly diagnosed diffuse large B-cell
781 lymphoma: A multicenter prospective analysis. Clin Chim Acta. 2016;463:47–52.
782 52. Krzeminski P, Corchete LA, García JL, López-Corral L, Fermián E, García EM, et
783 al. Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in
784 multiple myeloma reveals alterations related to relapse. Oncotarget. 2016.
785 doi:10.18632/oncotarget.13025.
786 53. Guijarro MV, Leal JFM, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Fominaya J, Lleonart M, et
787 al. MAP17 enhances the malignant behavior of tumor cells through ROS increase.
788 Carcinogenesis. 2007;28:2096–104.
789 54. Wu C. Migfilin and its binding partners: from cell biology to human diseases. J Cell
790 Sci. 2005;118:659–64.
791 55. Fan J, Ou Y, Wu C, Yu C, Song Y, Zhan Q. Migfilin sensitizes cisplatin-induced
792 apoptosis in human glioma cells in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2012;33:1301–1310.
793 56. Gkretsi V, Papanikolaou V, Zacharia LC, Athanassiou E, Wu C, Tsezou A. Mitogen-
794 inducible Gene-2 (MIG2) and migfilin expression is reduced in samples of human
795 breast cancer. Anticancer Res. 2013;33:1977–1981.
796 57. Ma H, Wang L, Zhang T, Shen H, Du J. Loss of β -arrestin1 expression predicts
797 unfavorable prognosis for non-small cell lung cancer patients. Tumor Biol.
798 2016;37:1341–7.
799 58. Shen H, Wang L, Zhang J, Dong W, Zhang T, Ni Y, et al. ARRB1 enhances the
800 chemosensitivity of lung cancer through the mediation of DNA damage response.
801 Oncol Rep. 2016. doi:10.3892/or.2016.5337.
802 59. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in
803 cancer. Tumor Biol. 2016;37:11611–22.
804 60. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, Moreau P, Orłowski R, Blade J, et al.
805 International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of
806 multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell
807 transplantation. Blood. 2011;117:6063–73.
808 61. Anderson KC. The 39th David A. Karnofsky Lecture: Bench-to-Bedside Translation
809 of Targeted Therapies in Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2012;30:445–52.
810 62. Méndez A, Mendoza L. A Network Model to Describe the Terminal Differentiation
811 of B Cells. PLOS Comput Biol. 2016;12:e1004696.
812 63. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. *PRDM1* /BLIMP1: a tumor suppressor gene
813 in B and T cell lymphomas. Leuk Lymphoma. 2015;56:1223–8.
814 64. Alinikula J, Nera K-P, Junttila S, Lassila O. Alternate pathways for Bcl6-mediated
815 regulation of B cell to plasma cell differentiation. Eur J Immunol. 2011;41:2404–13.
816 65. Inagaki Y, Hayakawa F, Hirano D, Kojima Y, Morishita T, Yasuda T, et al. PAX5
817 tyrosine phosphorylation by SYK co-operatively functions with its serine
818 phosphorylation to cancel the PAX5-dependent repression of BLIMP1: A mechanism
819 for antigen-triggered plasma cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun.
820 2016;475:176–81.
821 66. Yao G. Modelling mammalian cellular quiescence. Interface Focus.
822 2014;4:20130074–20130074.

823 67. Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, et
824 al. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent
825 interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*. 2003;22:351–60.
826 68. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys*
827 *Acta BBA - Gene Regul Mech*. 2015;1849:506–16.
828 69. Fecteau J-F, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futralan D, Bharati IS, et al.
829 Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21WAF1/Cip1-
830 dependent mechanism independent of functional p53. *Blood*. 2014;124:1637–44.

831

832 **Table 1 : EZ-score genes**

| Probeset | Name | Maxstat_Cutpoint | Chisq | pvalue | Hazard_Ratio | Prognostic |
|--------------|---------|------------------|-------|---------|--------------|------------|
| 210841_s_at | NRP2 | 702 | 4,3 | 0,038 | 1,6 | Bad |
| 204364_s_at | REEP1 | 226 | 13 | 0,00028 | 2 | Bad |
| 205551_at | SV2B | 53 | 4,6 | 0,032 | 1,5 | Bad |
| 43511_s_at | ARRB1 | 293 | 3,9 | 0,047 | 0,61 | Good |
| 211802_x_at | CACNA1G | 302 | 4,4 | 0,035 | 0,5 | Good |
| 1555480_a_at | FBLIM1 | 73 | 5,1 | 0,024 | 0,66 | Good |
| 207822_at | FGFR1 | 240 | 5 | 0,026 | 0,51 | Good |
| 1552477_a_at | IRF6 | 111 | 4,4 | 0,035 | 0,55 | Good |
| 227297_at | ITGA9 | 34 | 13 | 0,00029 | 0,51 | Good |
| 235560_at | NOVA2 | 85 | 3,9 | 0,049 | 0,67 | Good |
| 228140_s_at | PPP2R2C | 131 | 5,8 | 0,016 | 0,55 | Good |
| 206628_at | SLC5A1 | 175 | 4,3 | 0,038 | 0,63 | Good |
| 212560_at | SORL1 | 29 | 9,1 | 0,0026 | 0,52 | Good |
| 1559956_at | SYT7 | 65 | 5,8 | 0,016 | 0,64 | Good |
| 213869_x_at | THY1 | 110 | 4,2 | 0,039 | 0,67 | Good |

833

834 **FIGURE LEGENDS**

835 **Figure 1.** PRC2 complex is deregulated in MM in association with cell proliferation

836 A- EZH2, SUZ12 and EED gene expression in BMPCs, patients' MMCs and HMCLs.

837 Data are MAS5-normalized Affymetrix signals (U133 plus 2.0 microarrays). Statistical

838 difference was assayed using a t-test.

839 B- Correlation between EZH2 expression and malignant plasma cell labeling index.

840 Plasma cell labeling index was investigated using Brdu incorporation and flow

841 cytometry in 101 patients at diagnosis.

842 C- Top gene sets significantly associated with high EZH2 expression in MM using
843 GSEA.

844

845 **Figure 2.** EZH2 inhibition differentially affects MMCs survival.

846 A- EPZ-6438 treatment leads to MM cell growth inhibition and apoptosis induction.
847 HMCLs were exposed to different doses of EPZ-6438 and cell viability was analyzed.
848 Results are the mean absolute counts \pm SD of viable myeloma cells of 5 independent
849 experiments. Cell cycle of EPZ-6438-treated MM cell lines was analyzed by flow
850 cytometry. Results are representative of four independent experiments. Apoptosis
851 induction was analyzed with Annexin V PE staining by flow cytometry. The shown data
852 are the mean values \pm SD of 4 separate experiments. * indicates a significant
853 difference compared to control cells using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq 0.05$).

854 B - EZH2 inhibition induces mortality of primary MMCs from patients. At day 8 of
855 culture, the viability and total cell counts were assessed and the percentage of CD138
856 viable PC was determined by flow cytometry. Results are median values of the
857 numbers of myeloma cells in the culture wells.

858 C - Global H3K27me3 status was also assessed by flow cytometry. Results are median
859 values of the H3K27me3 staining index in CD138 viable PC. * indicates a significant
860 difference compared to control cells using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq 0.05$).

861

862 **Figure 3.** EZH2i-target genes promoters are methylated in EPZ-6438-resistant cells

863 A – EZH2i-target genes molecular signature was investigated using GSEA (FDR q-
864 value ≤ 0.05)

865 B – Venn Diagram presenting EZH2i-target genes compared to genes associated with
866 H3K27me3 or H3K4me3 in XG7 HMCL.

867 C – Methylation status of CpGs overlapping with PRC2 target genes promoter region
868 in EZH2i sensitive and resistant myeloma cell lines.

869 D – Heatmap presenting 111 EZH2i-target genes that are deregulated by Decitabine
870 using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays.

871 E - HMCLs were exposed to 1 μ M of EPZ-6438 and/or 100nM of Decitabine. Cell
872 viability was analyzed by trypan blue assay after 4, 8 and 11 days of treatment. Results
873 are the percentage \pm SD of viable myeloma cells of 3 independent experiments. *
874 indicates a significant difference compared to control using a Wilcoxon test for pairs (P
875 \leq 0.05).

876

877 **Figure 4.** EZH2 inhibition sensitizes HMCLs and primary MMCs to Lenalidomide.

878 A - HMCLs were treated 4 days with 1 μ M EPZ-6438 and then cultured 4 days with
879 graded Lenalidomide concentrations. Data are mean values \pm standard deviation (SD)
880 of five experiments determined on sextuplet culture wells. * indicates a significant
881 difference compared to control cells using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq$ 0.05).

882 B - After a 4-day pre-treatment with EPZ-6438 (1 μ M), mononuclear cells from 5
883 patients with MM were treated for four days with 2 μ M Lenalidomide. The viability and
884 total cell counts were assessed and the percentage of CD138 viable PC and non-
885 malignant bone marrow cells was determined by flow cytometry. Results are median
886 values of the numbers of myeloma cells in the culture wells. Results were compared
887 with a Wilcoxon test for pairs.

888 C – EPZ-6438, Lenalidomide and EPZ-6438/Lenalidomide combination deregulated
889 genes in MM. XG7 and LP1 HMCLs were treated with 2 μ M Lenalidomide (2days) with
890 (Combination) or without (Lenalidomide) prior 4days-treatment with 1 μ M EPZ-6438.
891 Venn-diagram showing overlap of genes deregulated by EPZ-6438, Lenalidomide or

892 EPZ-6438/Lenalidomide combination.

893 D – Heatmaps of RNA-seq analysis presenting expression profiles of EPZ-6438,
894 Lenalidomide or combination target genes in XG7 and LP1 HMCLs

895 E and F – Molecular signature of EPZ-6438 and Lenalidomide combination
896 deregulated genes compared to control was investigated using GSEA Database (all
897 curated gene sets), and relevant pathways were presented (FDR q-value ≤ 0.05).

898

899 **Figure 5.** EPZ-6438/lenalidomide combination targets key B cell transcription factors
900 and induces MMCs quiescence.

901 A - The expression of Ikaros (IKZF1), c-Myc and IRF4 of HMCLs was evaluated by
902 flow cytometry using PE-conjugated anti-IKZF1, anti-MYC and anti-IRF4 mAb and
903 isotype matched PE-conjugated mAb. Data are mean values \pm standard deviation of
904 three experiments.

905 B – Heatmap presenting RNA-seq GEP expression of E2F1, PRDM1, IRF4, MYC,
906 BCL6, CDKN1A, BACH2, PAX5 in XG7 HMCL treated with EPZ-6438 and
907 Lenalidomide, alone or in combination.

908 C –Cell cycle was analyzed by flow cytometry using DAPI, BrdU incorporation and
909 labelling with an anti-BrdU antibody. Results are representative of four independent
910 experiments.

911 D – The percentage of Ki67 negative cells was analyzed by flow cytometry using anti-
912 Ki67 antibody. Data are the mean values \pm SD of 3 separate experiments. * indicates
913 a significant difference compared to control cells using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq$
914 0.05).

915 E – Model of EPZ-6438/Lenalidomide combination action in MMCs.

916

917 **Figure 6.** EZ-score can predict for sensitivity of poor prognosis MM patients to EZH2i.
918 A – Chart explaining the process of the EZ-score creation
919 B - EZ-score in normal BMPCs (N = 7), in premalignant PCs of patients with MGUS (
920 N = 5), in MMCs of patients (N = 206) and in HMCLs (N = 40). Results were compared
921 with a Student t-test.
922 C - Prognostic value of the EZ-score in MM. Patients of the HM cohort were ranked
923 according to increased EZ-score and a maximum difference in OS was obtained with
924 EZ-score of 0.686 splitting patients into high-risk (N=153) and low-risk (N=53) groups.
925 EZ-score also had a prognostic value of an independent cohort of 345 patients (UAMS-
926 TT2 cohort). The parameters to compute the EZ-score of patients of UAMS-TT2 cohort
927 and the proportions delineating the two prognostic groups were those defined with HM
928 cohort.
929 D - HMCLs with high EZ-score (N = 5) exhibit significant higher EPZ-6438 sensitivity
930 compared with HMCLs with low EZ-score (N = 5). Data are mean values \pm standard
931 deviation of five experiments determined.
932 E - EZ-score predicts for EPZ-6438 sensitivity of primary myeloma cells of patients.
933 Mononuclear cells from tumor samples of 14 patients with MM were cultured for 8 days
934 in the presence of IL-6 (2 ng/ml) with or without 1uM EPZ-6438. At day 8 of culture,
935 the count of viable MMCs was determined using CD138 staining by flow cytometry.

Figure 1

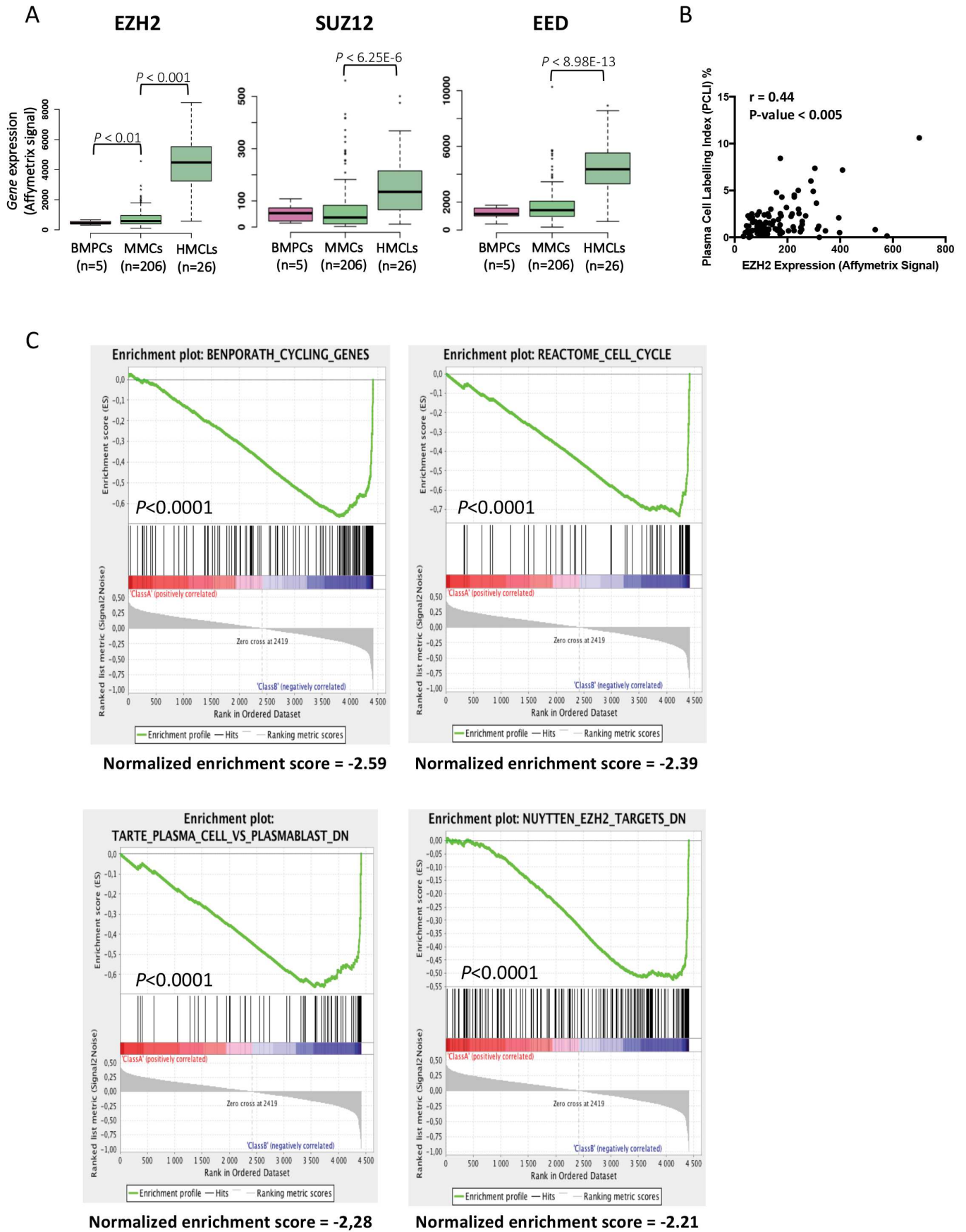


Figure 2

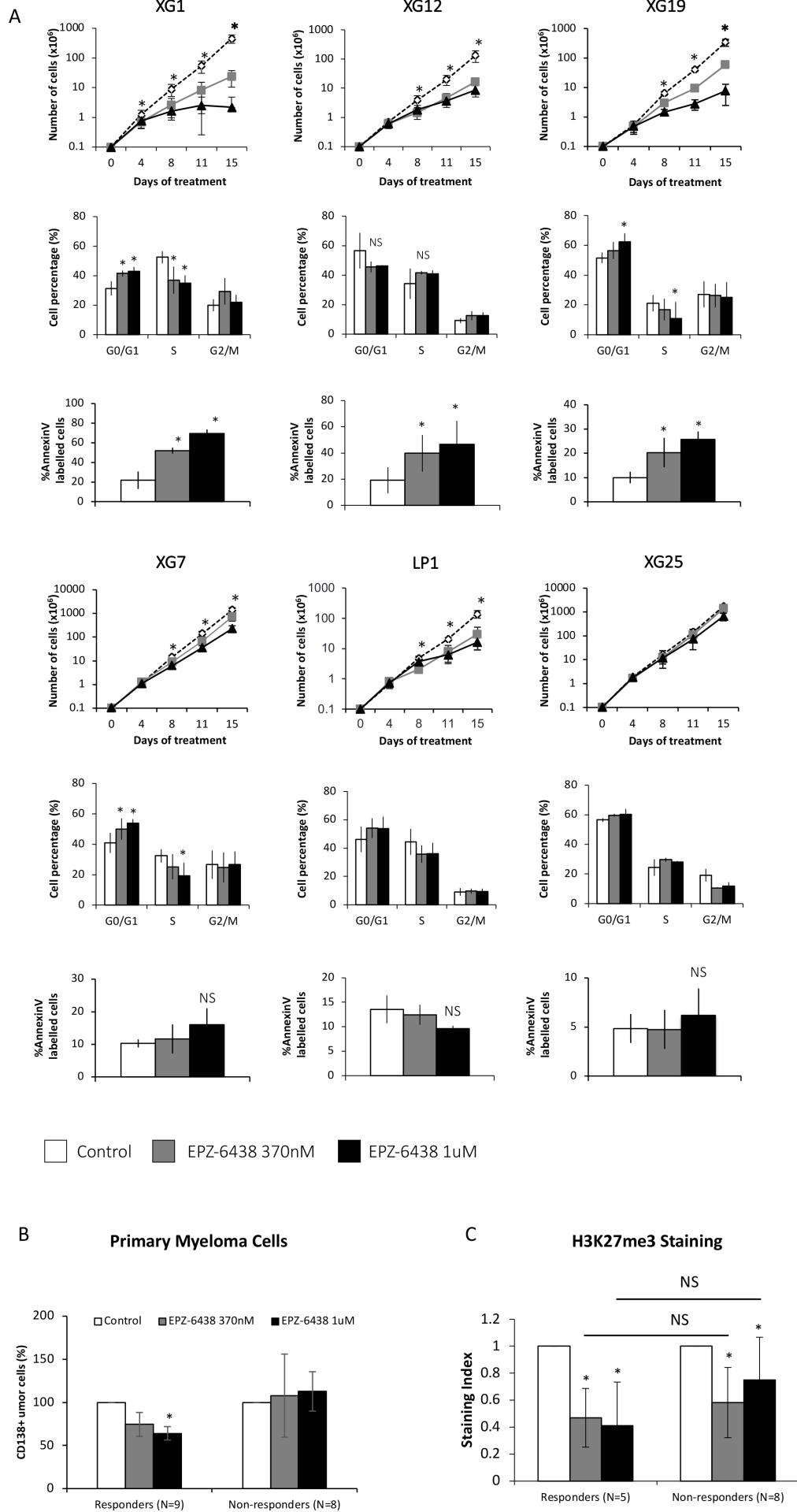
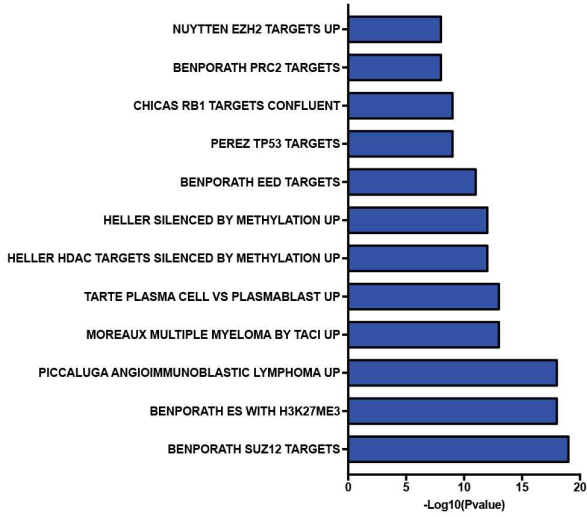
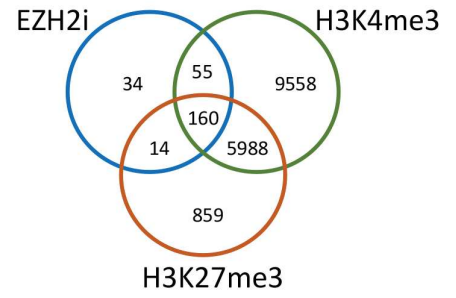


Figure 3

A

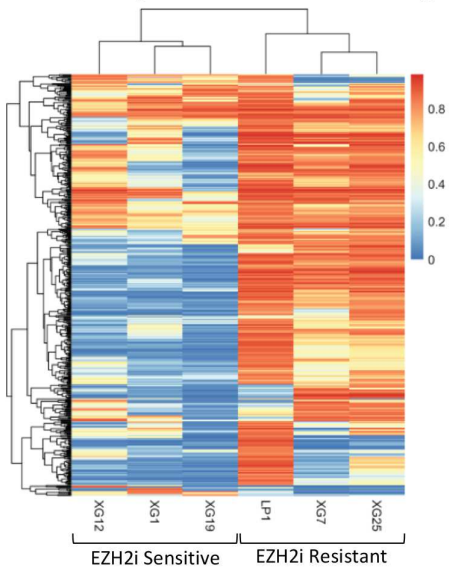


B



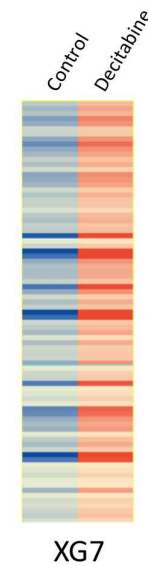
C

Promoter methylation status of EZH2i-target genes



D

111 EZH2i-target genes are also deregulated by Decitabine



E

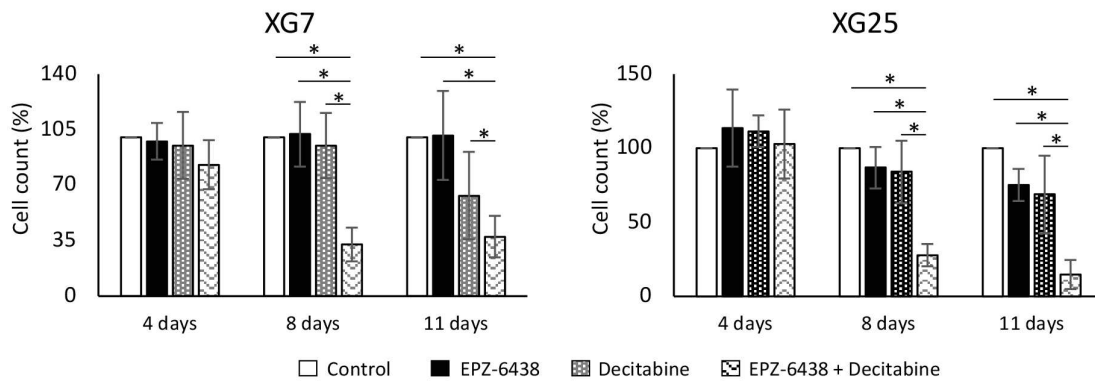


Figure 4

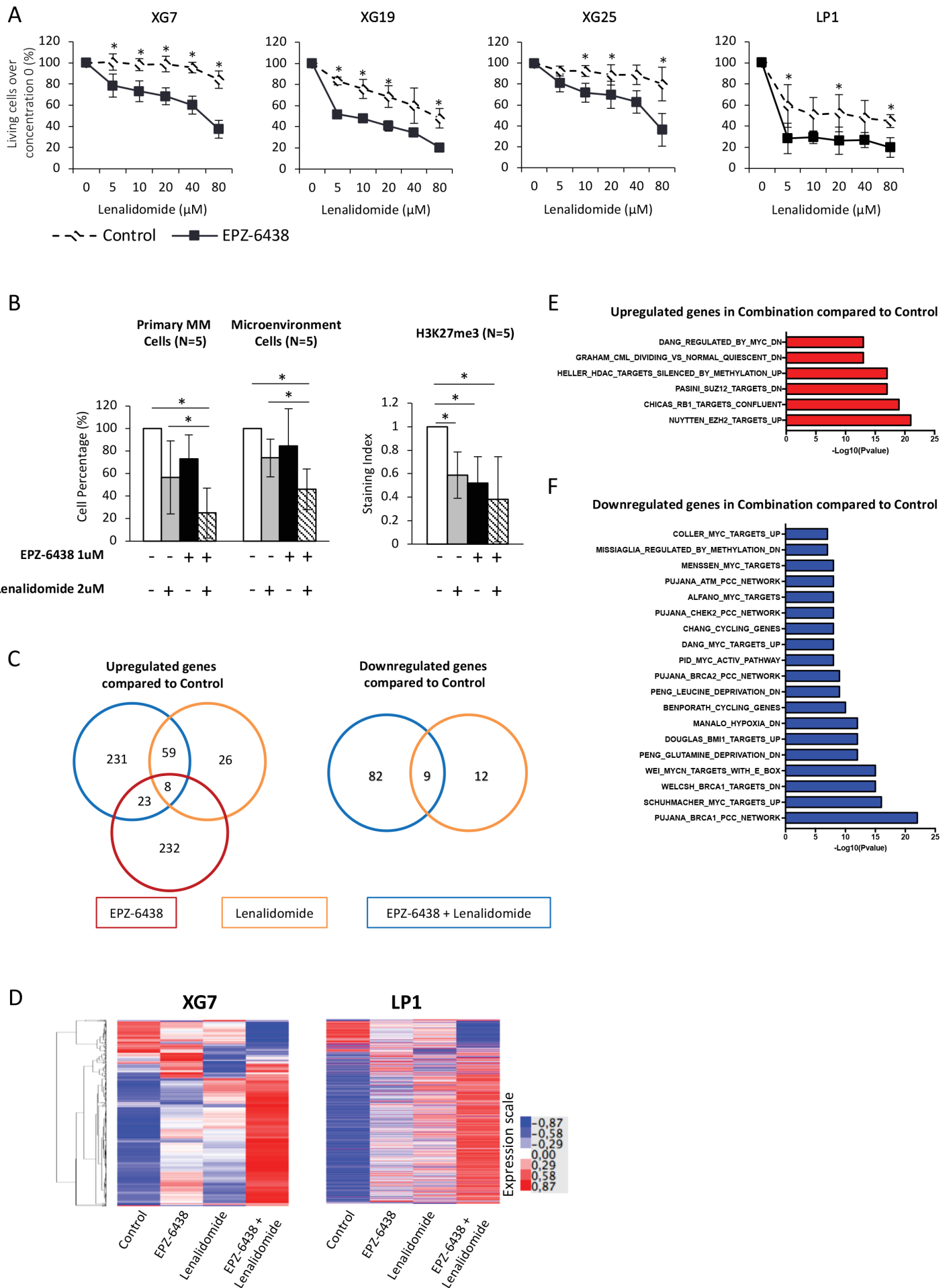


Figure 5

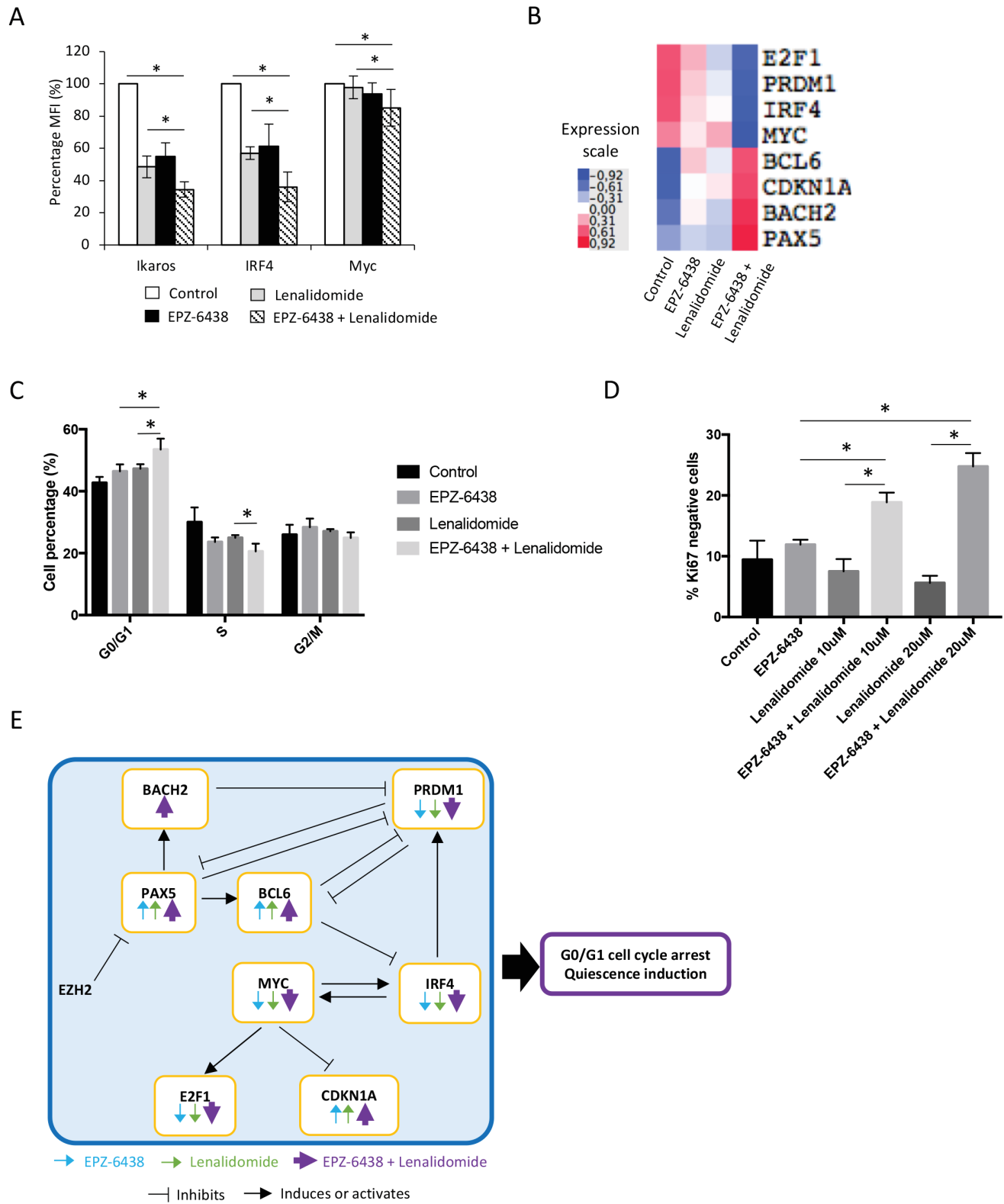
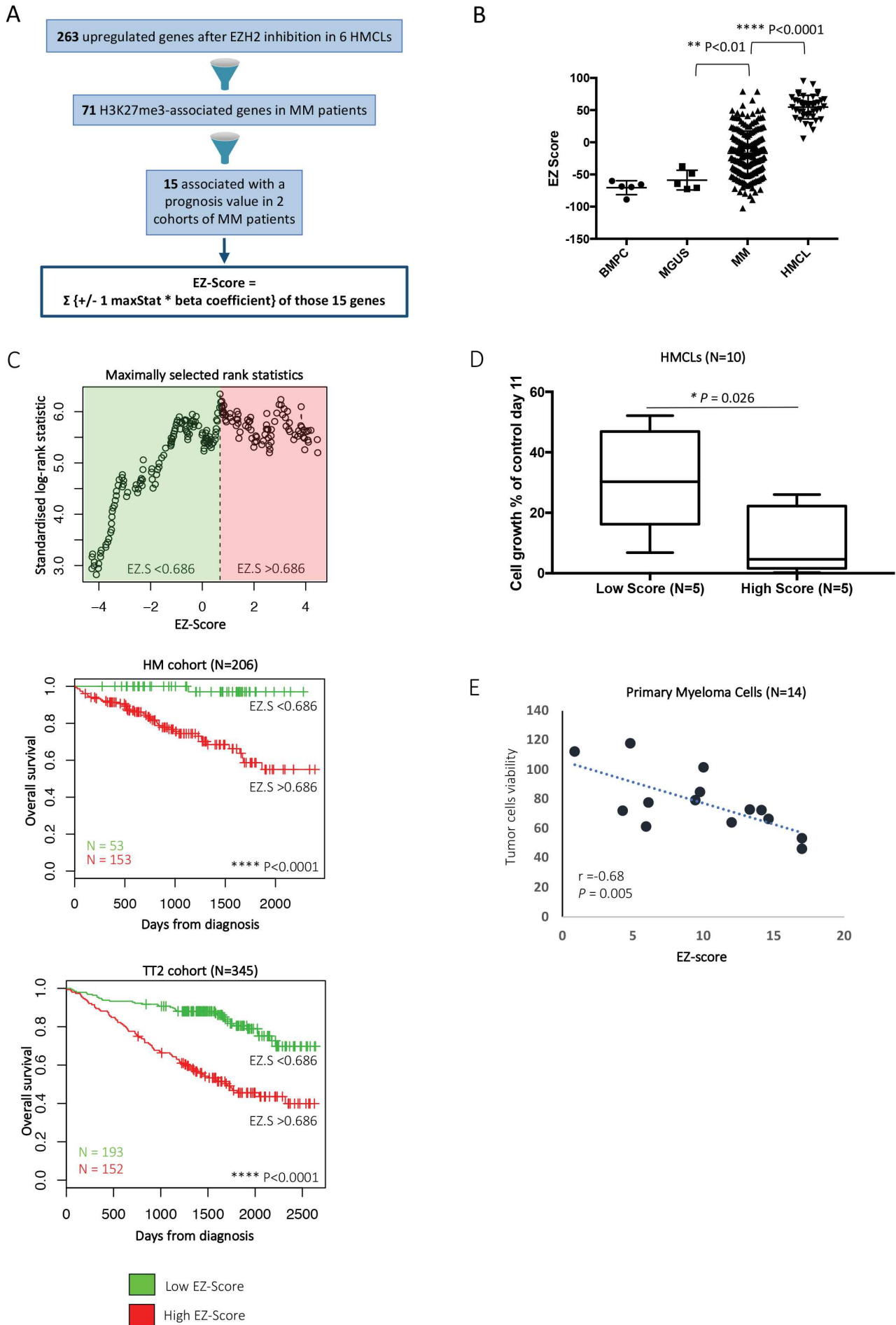
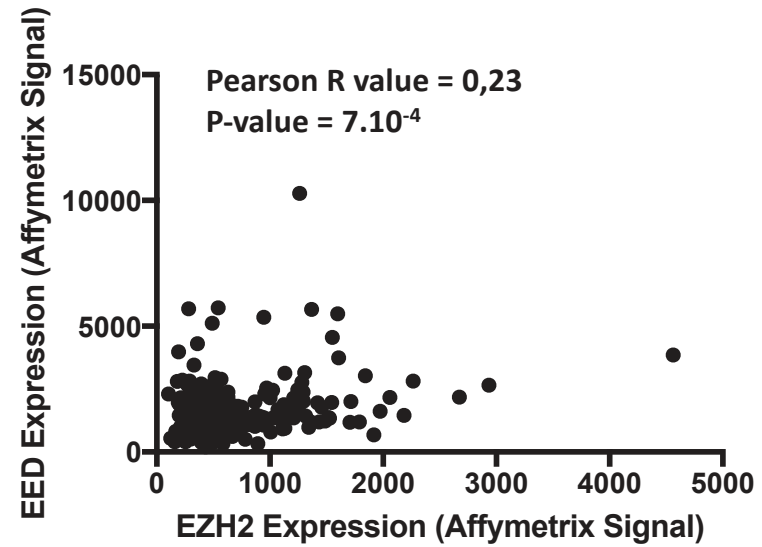
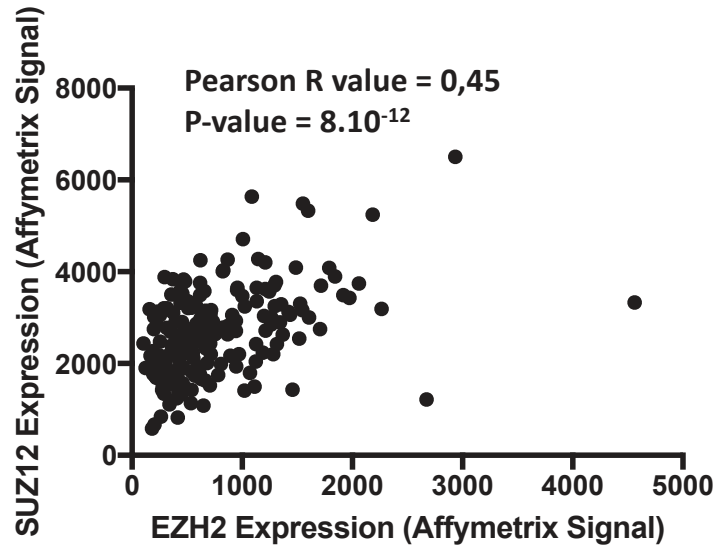


Figure 6



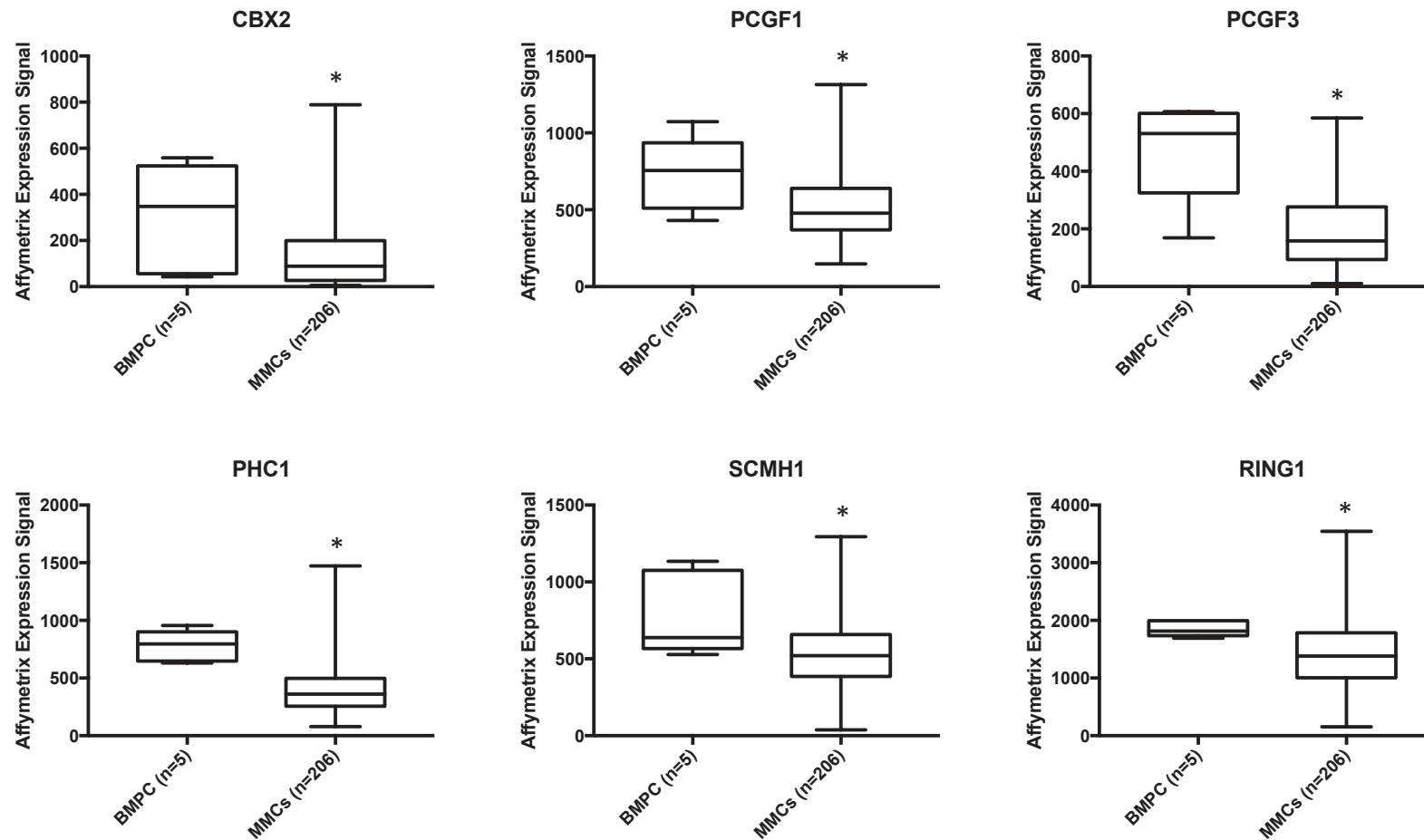
Supplementary Figure S1



EZH2 expression is correlated with EED and SUZ12 expression

Gene expression was determined using Heidelberg-Montpellier cohort (Affymetrix data). A Pearson correlation test was performed to compare SUZ12 or EED to EZH2 expression in patients MM cells.

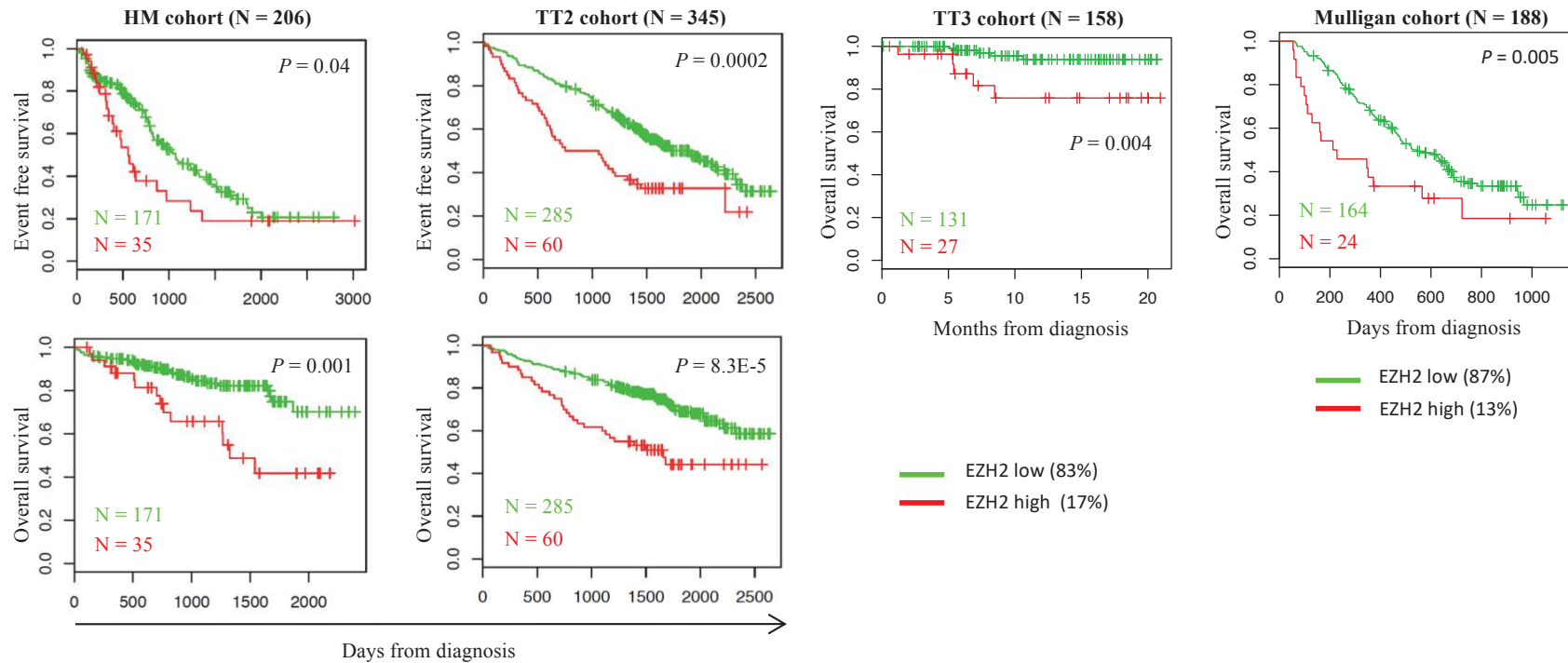
Supplementary Figure S2



PRC1 members are significantly downregulated in primary MM cells compared with normal bone marrow plasma cells

CBX2, PCGF1, PCGF3, PHC1, SCM1 and RING1 gene expression in BMPCs, patients' MMCs and HMCLs. Data are MAS5-normalized Affymetrix signals (U133 plus 2.0 microarrays). Statistical difference was assayed using a t-test.

Supplementary Figure S3

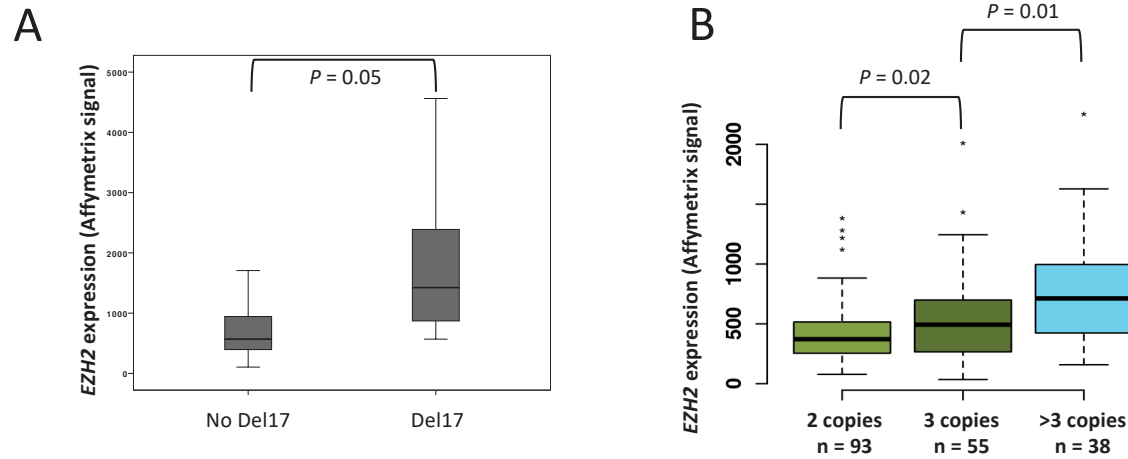


EZH2 is associated with a poor prognosis in MM.

Lower event free and overall survival of newly diagnosed MM patients (HM cohort, N=206) who's MMCs highly expressed EZH2 gene. The splitting of the patients into two groups according to EZH2 expression in MMCs was done using the Maxstat algorithm.

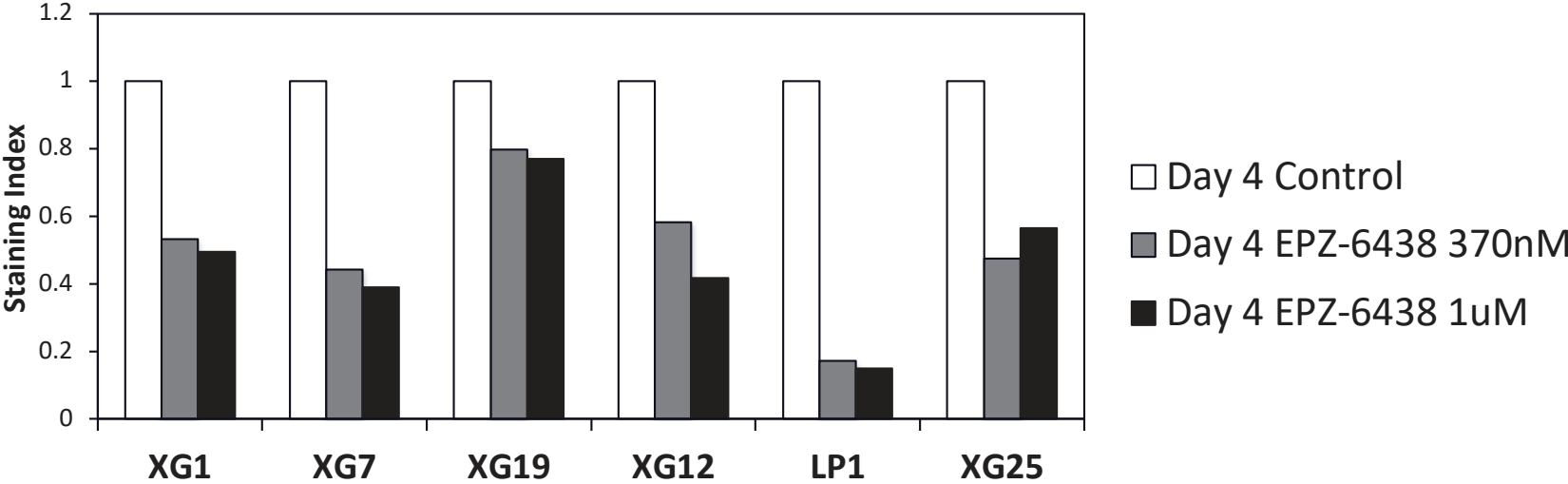
High EZH2 expression is associated with a poor prognosis (EFS and OS) in an independent cohort of 345 patients (UAMS-TT2), in UAMS-TT3 cohort (N=158) and in a cohort a patients at relapse treated by bortezomib monotherapy (Mulligan cohort, N=188)

Supplementary Figure S4



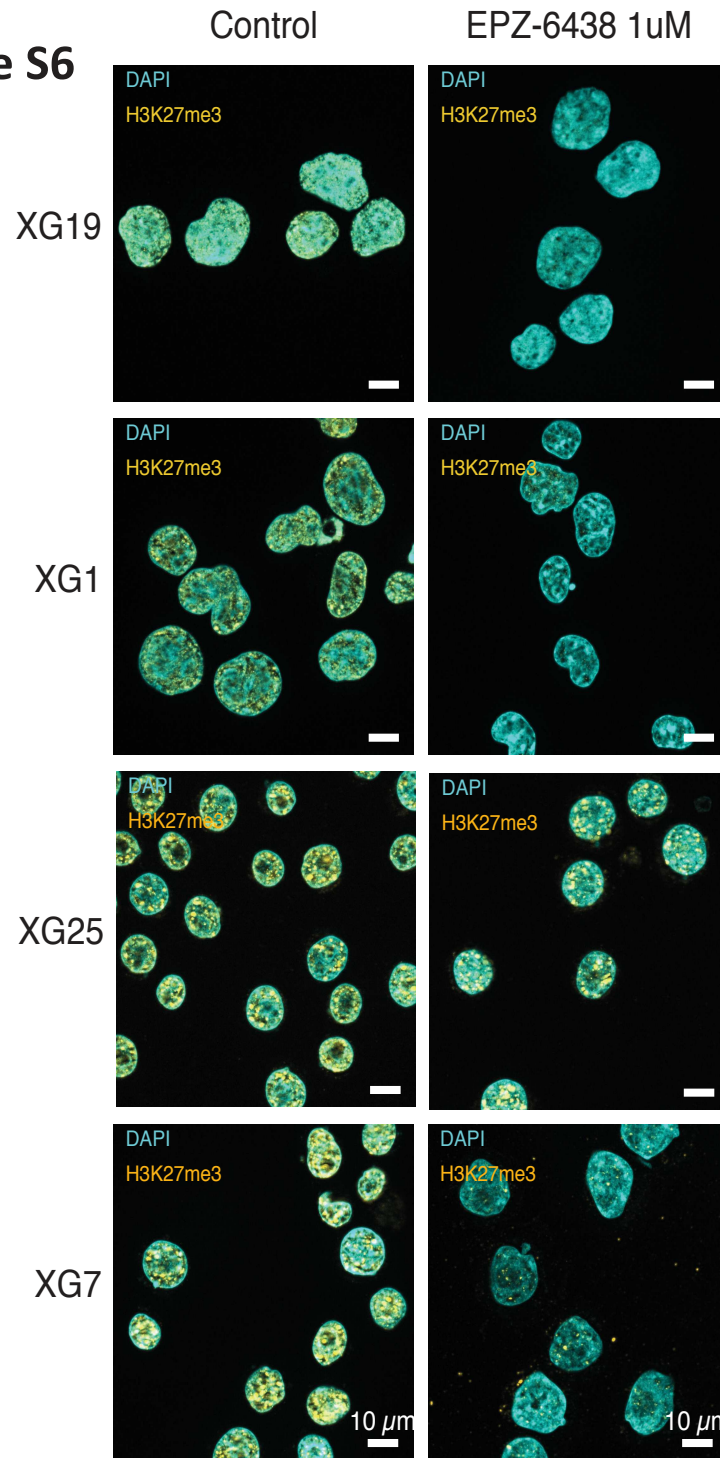
Association between EZH2 expression and patients' genetic abnormalities. Interphase-FISH-analysis was performed on CD138-purified plasma cells of 153 to 169 patients of the HM cohort, depending on the gene abnormality. Statistical significance was tested using a student t test.

Supplementary Figure S5



EPZ-6438 leads to H3K27me3 loss in HMCLs. The H3K27me3 status of HMCLs after EPZ-6438 treatment (370nm and 1 μ M) was analyzed by flow cytometry using AlexaFluor-647 (AF-647)-conjugated anti-H3K27me3 mAb and isotype matched AF-647-conjugated mAb (control). The relative fluorescence was represented by the staining index.

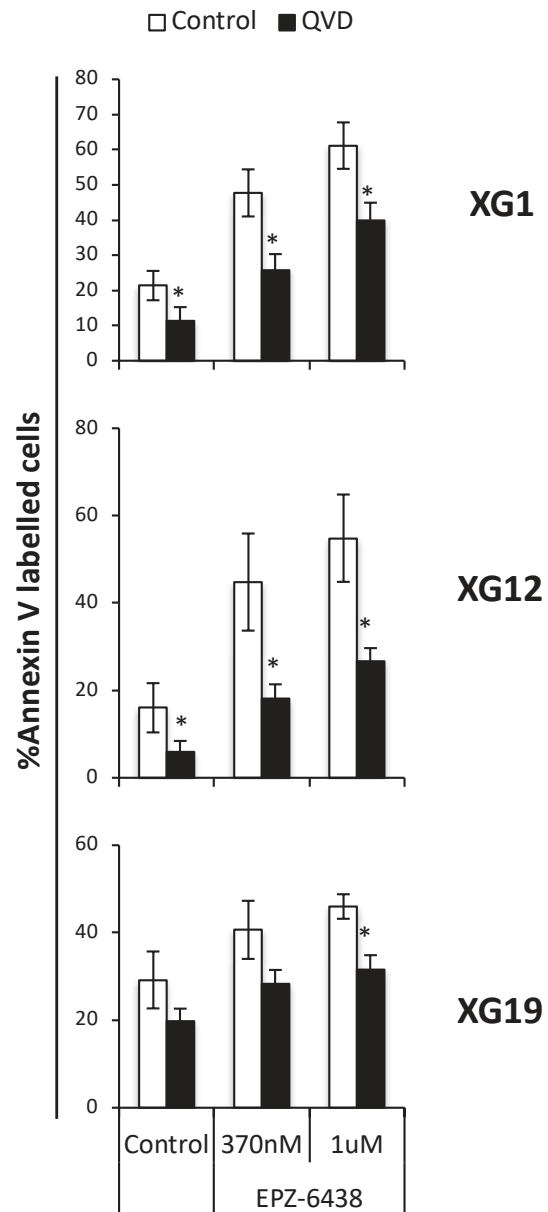
Supplementary Figure S6



EPZ-6438 leads to H3K27me3 loss in HMCLs

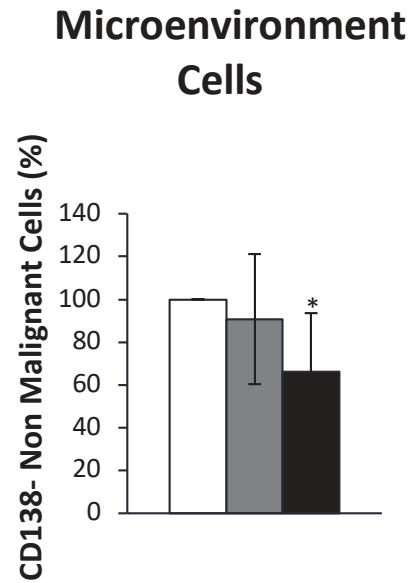
The H3K27me3 status of HMCLs after EPZ-6438 treatment (370nm and 1uM) was evaluated by immunofluorescence using a rabbit anti-human primary antibody against H3K27me3 and AF-555-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody.

Supplementary Figure S7



EPZ-6438-induced apoptosis is partially rescued by QVD pan caspase inhibitor. The cells were treated for 8 days with 20 μ M QVD associated or not with 370nM or 1 μ M of EZH2 inhibitor EPZ-6438. Apoptosis induction was analyzed using Annexin V PE staining by flow cytometry. Data are mean values \pm standard deviation (SD) of five experiments. * indicates a significant difference compared to control using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq 0.05$).

Supplementary Figure S8

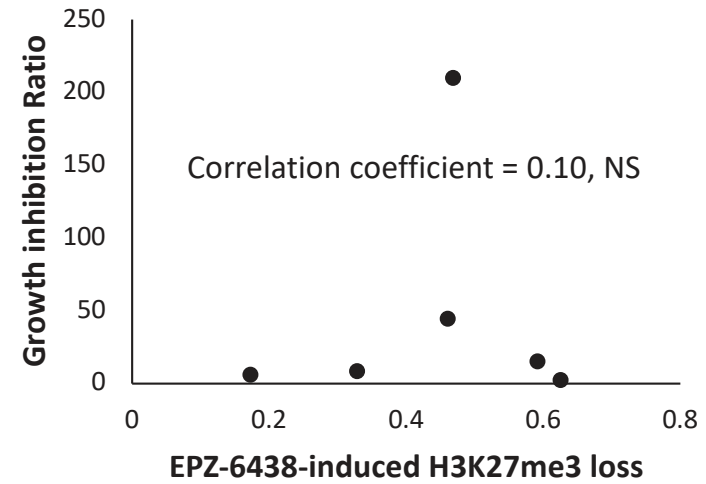
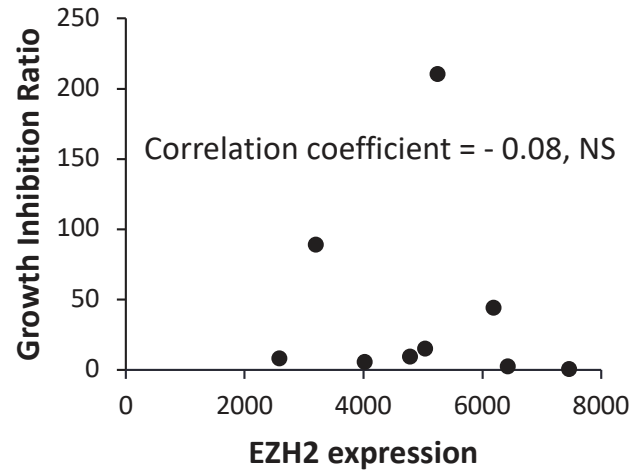


EZH2 inhibition induces mortality of primary MM cells from patients. Mononuclear cells from 17 patients with MM were treated with EZH2 inhibitor EPZ-6438. At day 8 of culture, the viability and total cell counts were assessed and the percentage of bone marrow non-myeloma cells was determined by flow cytometry. Results are median values of the numbers of myeloma cells in the culture wells. * indicates a significant difference compared to control using a Wilcoxon test for pairs ($P \leq 0.05$).

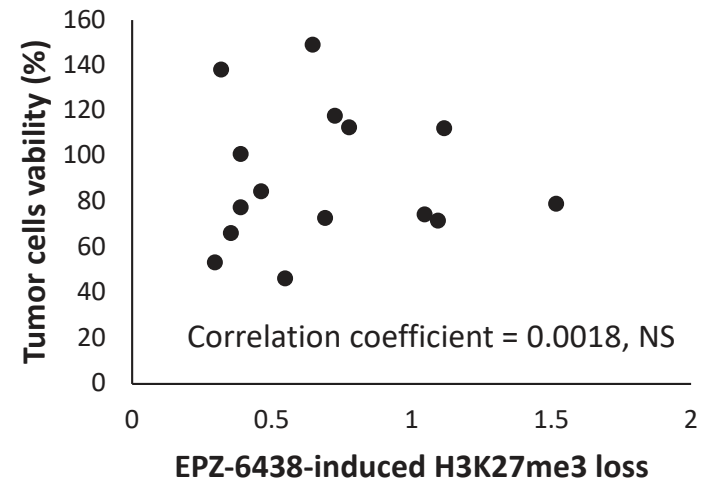
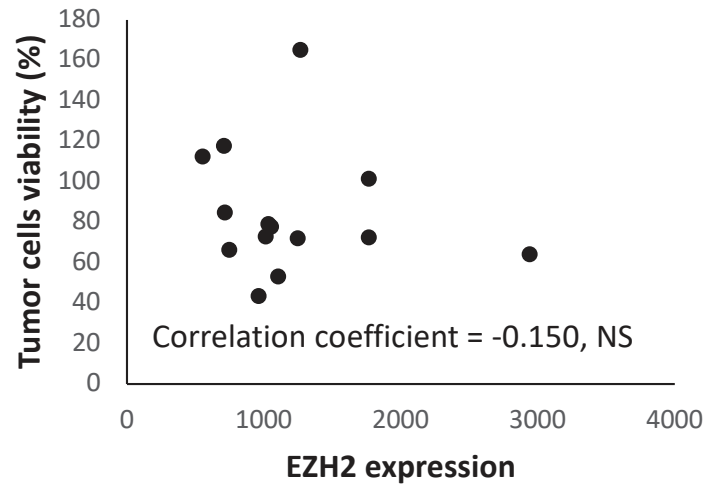
□ Control ■ EPZ-6438 370nM ■ EPZ-6438 1uM

Supplementary Figure S9

HMCLs

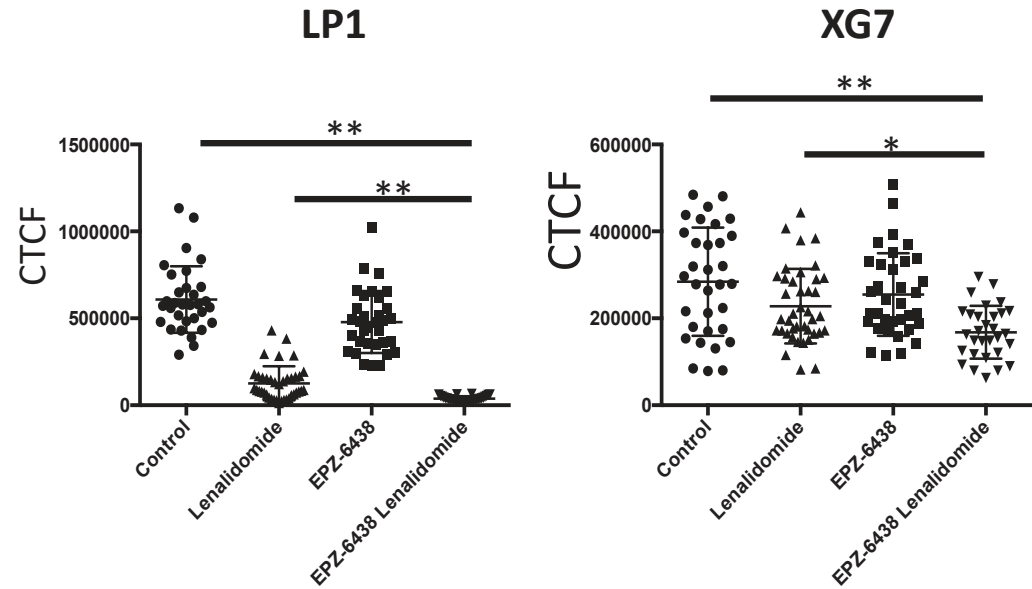
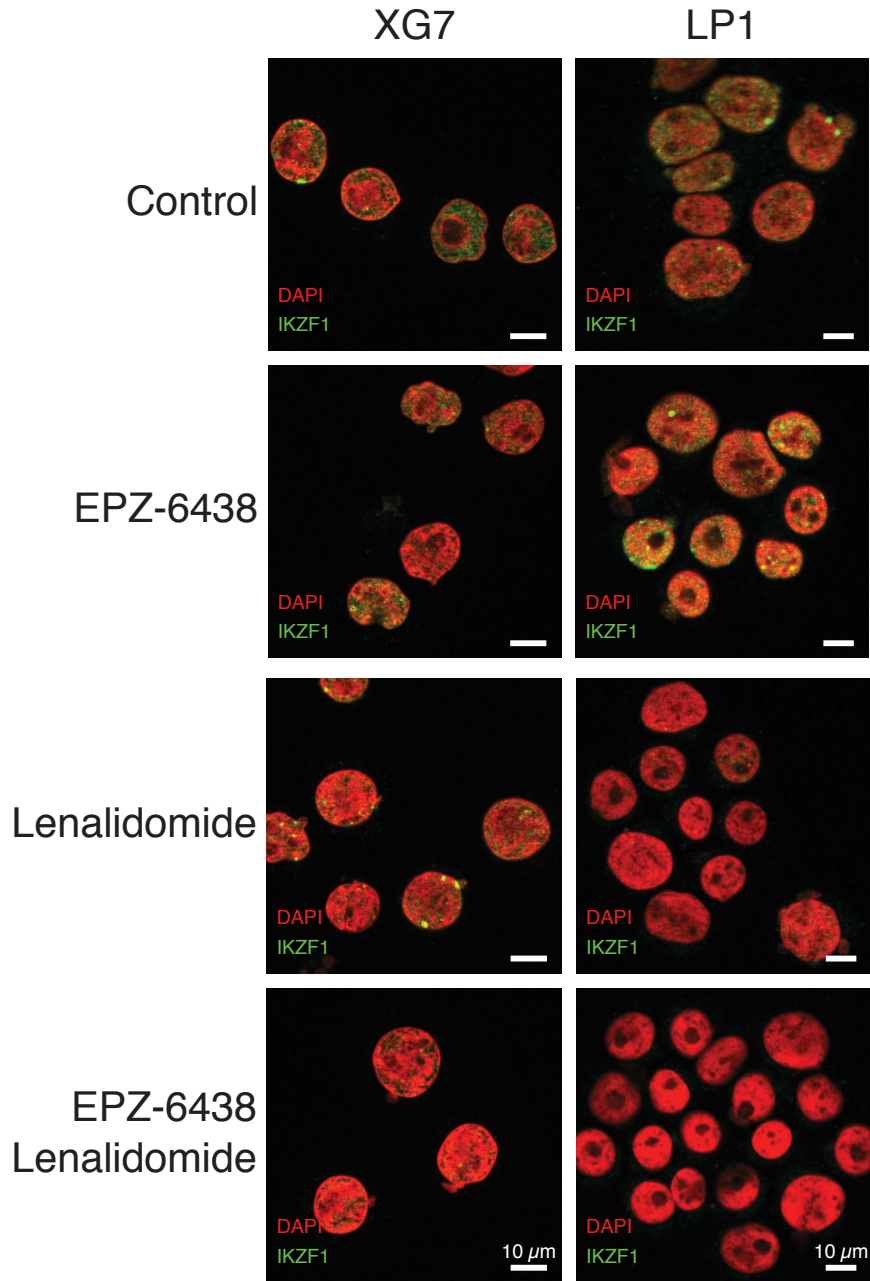


Patients



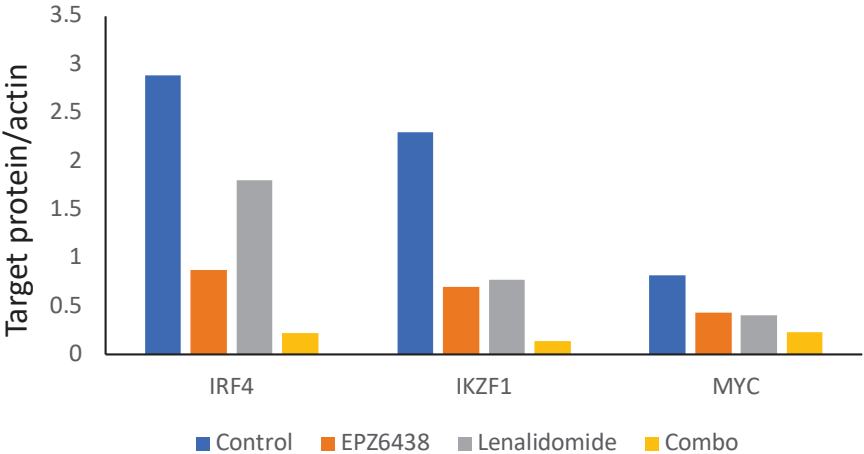
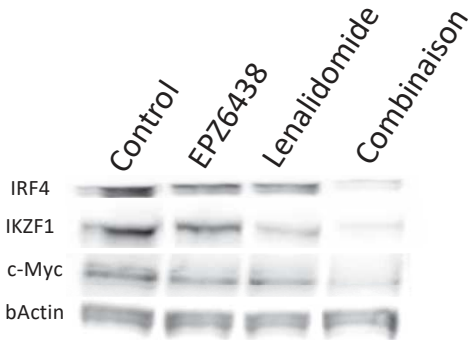
Correlation between EZH2 expression/H3K27m3 staining and drug response to EZH2 inhibitor in HMCLs and patients. HMCLs : Growth inhibition ratio at day 15 compared with EZH2 expression or EPZ-6438-induced H3K27me3 loss at day 8 of treatment. Patients : Tumor cells viability compared with H3K27me3 global staining index or EPZ-6438-induced H3K27me3 loss at day 8 of treatment. NS = Non significant

Supplementary Figure S10



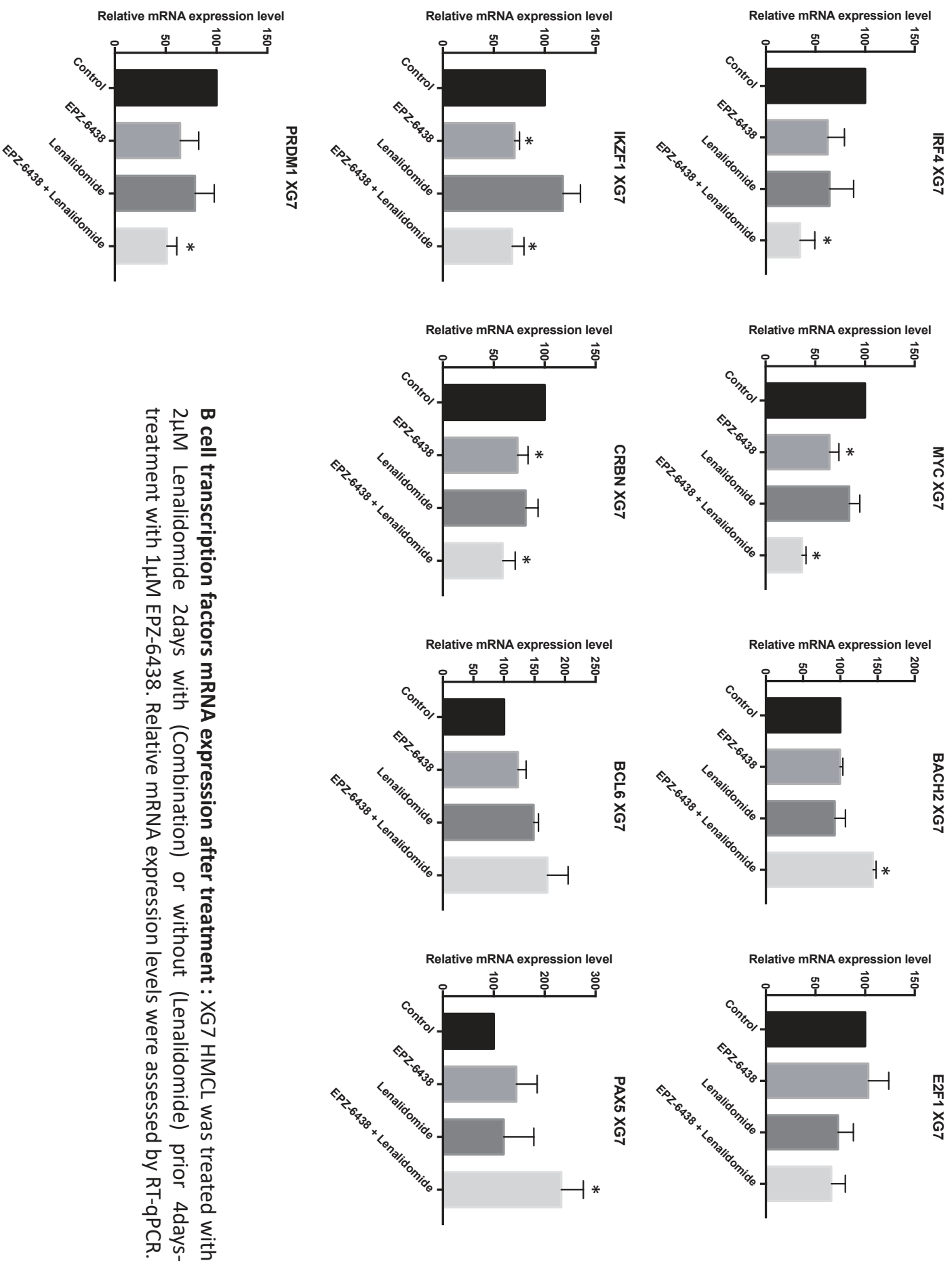
IKZF1 protein level decreases after HMCLs were treated with EPZ-6438 and Lenalidomide combination. IKZF1 expression was assessed by immunofluorescence using an anti-IKZF1 primary antibody and an AF555-conjugated secondary antibody. Corrected total cell fluorescence was measured (CTCF)

Supplementary Figure S11



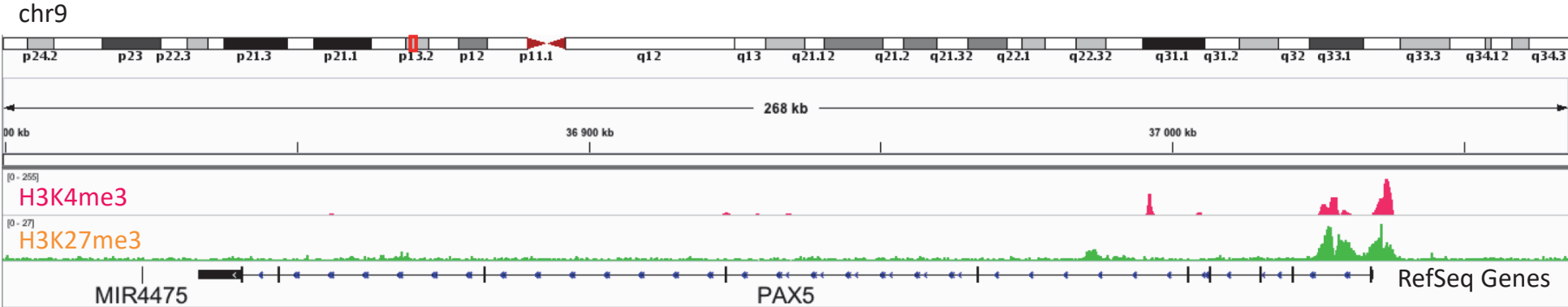
Lenalidomide targets protein levels after treatment : XG7 HMCL was treated with 2 μ M Lenalidomide 2days with (Combination) or without (Lenalidomide) prior 4days-treatment with 1 μ M EPZ-6438. Protein levels was assessed by western blot.

Supplementary Figure S12



B cell transcription factors mRNA expression after treatment : XG7 HMCL was treated with 2 μ M Lenalidomide 2days with (Combination) or without (Lenalidomide) prior 4days-treatment with 1 μ M EPZ-6438. Relative mRNA expression levels were assessed by RT-qPCR.

Supplementary Figure S13



PAX5 is a bivalent gene in XG7 HMCL: H3K4me3 and H3K27me3 profile on PAX5 was assessed by ChIP-seq

Discussion

Plusieurs études ont décrit le rôle d'EZH2 dans la réponse immunitaire humorale primaire dans le modèle murin. En effet, *EZH2* est surexprimé dans les centroblastes du centre germinatif (GC), dans lesquels il régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la survie et la différenciation. Le modèle murin est largement utilisé pour l'étude du système immunitaire (SI). Cet organisme modèle présente en effet de nombreux avantages : il permet 1) d'avoir accès à une quantité importante de cellules permettant des analyses moléculaires poussées, 2) de moduler l'expression de gènes dans un type cellulaire donné grâce au génie génétique, 3) d'étudier le SI de manière systémique, en prenant en compte les interactions entre les différentes populations cellulaires et le microenvironnement et enfin 4) d'étudier le développement et le traitement de différentes pathologies humaines impliquant le SI. Aussi, de nombreuses découvertes observées chez la souris ont pu être confirmées *a posteriori* chez l'homme. En revanche, plusieurs divergences entre ces deux organismes ont également été mises en évidence, notamment la localisation des cellules immunitaires, leurs fonctions, leur activation, l'expression de différents marqueurs à leur surface ainsi que leur transcriptome^{382,383}. Aussi, et par conséquent, l'étude de plusieurs pathologies, impliquant notamment les cellules du SI, connues chez l'homme et les traitements associés dans le modèle murin, s'est avérée peu fructueuse. L'une des raisons des différences observées repose inévitablement sur les millions d'années d'évolution entre les deux organismes. Des études plus récentes ont également mis en évidence que les souris reproduites en laboratoire présentaient un SI similaire à celui d'un nouveau-né humain du fait de l'absence de stimulation antigénique au cours de leur vie. Au contraire, des souris « sauvages » élevées dans un environnement moins hygiénique possèdent un SI plus mature se rapprochant significativement du SI d'humains adultes³⁸⁴⁻³⁸⁷. Notre laboratoire a préalablement développé et décrit au niveau phénotypique et transcriptionnel un modèle *in vitro* de différenciation plasmocytaire normale (PCD)^{171,193,199,207}. Grâce à ce modèle, il serait ainsi intéressant de valider et de compléter les découvertes faites sur le modèle murin à propos du rôle d'EZH2 dans la différenciation plasmocytaire, sur des cellules humaines. L'étude de la réponse immune humorale secondaire (activation de lymphocytes B mémoire) nous permet, en outre, d'apprécier les mécanismes mis en jeu dans ce processus, et d'obtenir un plus grand nombre de plasmocytes en fin de différenciation (moins/pas de sélection post-GC).

Notre étude montre dans un premier temps une surexpression d'EZH2, de *SUZ12* et de *EED* dans les pré-plasmablastes (prePBs), une population cellulaire transitoire hautement proliférative, par rapport aux autres étapes de la PCD. De manière surprenante, le taux global de H3K27me3 ne corrèle pas avec l'expression d'EZH2 au cours de la PCD. Une hypothèse

expliquant ce résultat est que la surexpression d'*EZH2* dans les prePBs pourrait, en partie, être associée à son rôle dans le maintien de la marque répressive H3K27me3 au cours des nombreux cycles cellulaires observés dans ce stade^{92,93}. Dans des cellules ayant une capacité proliférative moindre, une expression plus faible d'*EZH2* pourrait être suffisante pour assurer le turnover de H3K27me3. Aussi, alors que le complexe PRC2 contenant *EZH2* est plus particulièrement présent dans les cellules prolifératives, celui contenant l'enzyme *EZH1* a été majoritairement rapporté dans les cellules différenciées non prolifératives^{117,120}. Plusieurs études ont montré le rôle important de cet échange d'enzyme au sein du complexe PRC2 au cours de divers processus de différenciation cellulaire. Nous avons montré que l'expression d'*EZH1* était anti-corrélée à celle d'*EZH2* au cours de la différenciation de lymphocytes B mémoires (MBC) en plasmocytes (PC). Ainsi, le taux global stable de la marque répressive H3K27me3 dans les cellules non-prolifératives de la PCD pourrait aussi être maintenu grâce à l'enzyme *EZH1*. Afin de répondre à ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier le rôle d'*EZH1* dans la PCD en altérant l'activité/l'expression respectives d'*EZH2* et/ou *EZH1* dans les différents stades cellulaires. Cette approche permettrait notamment de répondre aux questions suivantes : 1) Une surexpression d'*EZH1* dans les prePBs pourrait-elle compenser une délétion d'*EZH2* dans ces cellules ? 2) L'inhibition de l'activité d'*EZH1* dans les cellules non-prolifératives est-elle capable d'altérer la PCD ou la fonction des différents stades cellulaires ? Cette expérience pourrait également permettre de comparer les rôles d'*EZH2* et *EZH1* dans un modèle de différenciation, et ainsi de déterminer si *EZH1* joue un rôle compensatoire/additif (mêmes gènes cibles) et/ou complémentaire (gènes cibles différents) par rapport à *EZH2*.

Le rôle d'*EZH2* dans les prePBs va au-delà du maintien de H3K27me3 au cours du cycle cellulaire. En effet, *EZH2*, via H3K27me3, réprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'identité cellulaire et dans la fonction des lymphocytes B et des PCs dans les prePBs, et participe ainsi au maintien du statut transitionnel de ce stade pendant la PCD. En effet, parmi les gènes associés à H3K27me3 dans les prePBs et PBs, nous avons identifié des gènes cibles des facteurs de transcription B (TFs) *PAX5*, *IRF4*, *BLIMP1* ou encore *BCL6*. Il serait intéressant de vérifier l'accessibilité chromatinienne de ces gènes au cours de la PCD et de déterminer les mécanismes de recrutement de PRC2 impliqués dans leur régulation spécifiquement dans les prePBs (ARN long non codant, TFs, marques histones...). De manière surprenante, *EZH2* est également capable de se fixer au niveau de promoteurs de gènes actifs dans les prePBs, non régulés par H3K27me3 (*EZH2o*). Ces gènes sont notamment impliqués dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, et sont réprimés dans

les MBCs et les PCs. Comme il a été décrit dans d'autres études, il est possible qu'EZH2 joue un rôle d'activateur de la transcription, indépendamment de son activité enzymatique, en s'associant à différents TFs, comme par exemple E2F1^{104,105}. En effet, différentes séquences motifs reconnues pas des TFs sont significativement enrichies au niveau des promoteurs des gènes cibles d'EZH2o. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions dépléter *EZH2* par shARN afin de déterminer si les gènes associés à EZH2o sont dérégulés, et si le recrutement de différents TFs est altéré. Nous pourrions également définir les partenaires d'EZH2 au niveau de ces promoteurs, par immuno-précipitation d'EZH2 suivi de spectrométrie de masse et/ou par reChIP (EZH2 + TFs potentiels). Aussi, la déplétion des TFs partenaires induirait potentiellement la perte du recrutement d'EZH2 au niveau des gènes cibles. Étant donné que les gènes cibles d'EZH2o sont réprimés dans les MBCs et les PCs, et activés seulement dans les prePBs, l'activité enzymatique d'EZH2 pourrait par ailleurs être réprimée au niveau de ces gènes seulement au stade prePB. EZH2 serait alors présent, en état de pause transitoire, sur ces promoteurs dans les prePBs, en attendant de retrouver sa fonction répressive via H3K27me3 dans les PCs. Ainsi, l'activité d'EZH2 pourrait être inhibée soit via son interaction avec une autre protéine, soit via une modification post-traductionnelle réversible¹¹⁰. Si tel est le cas, le shARN anti-EZH2 n'induirait pas l'inhibition de la transcription des gènes cibles d'EZH2o dans les prePBs, mais empêcherait leur répression dans les PCs. Aussi, afin de valider cette hypothèse, nous étudions actuellement la répartition de H3K27me3 au niveau de ces gènes au cours de la PCD. En effet, leur absence d'expression dans les MBCs et PCs n'est pas obligatoirement indicative d'une répression par H3K27me3.

L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2, au cours de la PCD, induit une accélération du processus de PCD, caractérisé par une surexpression de gènes associés à H3K27me3 impliqués dans les fonctions des PCs, et une sous-expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'activation des lymphocytes B. L'expression de la majorité des gènes EZH2o n'est pas dérégulée après l'inhibition de l'enzyme, suggérant une action d'EZH2 partiellement indépendante de son activité méthyltransférase dans la PCD. Les gènes réprimés après inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 pourraient être des cibles de miARNs ou de TFs induits, associés à H3K27me3. Nous pourrions valider cette hypothèse dans notre modèle en vérifiant le recrutement de tels TFs au niveau du promoteur des gènes réprimés par l'inhibiteur d'EZH2 (EZH2i). Aussi, nous pourrions déterminer la liste des miARNs dérégulés par l'EZH2i dans la PCD et valider leurs cibles prédites parmi les gènes réprimés via la surexpression ou l'inhibition de ces miARNs.

D'un point de vue phénotypique, il est possible d'observer une diminution de la prolifération des prePBs et PBs, une augmentation de la mort cellulaire, une augmentation du pourcentage de PCs ainsi qu'une sécrétion plus importante d'IgG par les PCs. L'augmentation de la mort cellulaire après inhibition d'EZH2 pourrait s'expliquer par l'accélération de la PCD. En effet, dans notre modèle, nous observons une augmentation de l'apoptose au cours de la PCD, liée à la génération majoritaire de PC à courte durée de vie¹⁹³.

L'engagement des lymphocytes B vers un phénotype de PC augmente exponentiellement avec et est dépendante de la division cellulaire³⁸⁸. Notre étude montre que, malgré la diminution de la prolifération induite par l'inhibition d'EZH2 dans les prePBs et PBs, ces derniers réussissent à se différencier en PCs matures. Les divisions cellulaires liées à l'activation des lymphocytes B pourraient donc être essentielles d'une part pour permettre une reprogrammation transcriptionnelle médiées par des modifications épigénétiques, et d'autre part pour l'amplification des cellules nécessaire à la production d'un nombre suffisant de PCs permettant une réponse immune efficace. En effet, la diminution de la prolifération ainsi que l'apoptose due à l'accélération de la différenciation induites par l'inhibition d'EZH2 au cours de la PCD résulte en la production d'un plus fort pourcentage de PCs par rapport aux cellules non traitées, mais un nombre final plus faible de PCs produits. Ces données suggèrent que la régulation transcriptionnelle médiée par EZH2 pourrait être importante pour l'amplification des prePBs, au détriment de la différenciation en PCs. Cela est en accord avec la diminution rapide de l'expression d'*EZH2* observée dans les stades PB et PC moins prolifératifs et plus matures.

Ainsi, de manière générale, les résultats de notre étude nous indiquent qu'EZH2 joue un rôle important dans le maintien de l'état immature, prolifératif et transitionnel des prePBs au cours de la PCD.

Nous avons observé que l'effet de l'inhibiteur d'EZH2 sur le taux global d'H3K27me3 était réversible. En effet, lorsque l'inhibition de l'enzyme n'était pas maintenue à chaque étape de la PCD, la tri-méthylation de H3K27 était globalement restaurée (analyse par cytométrie en flux). Une expérience intéressante serait d'analyser le temps de restauration de la marque épigénétique ainsi que la spécificité du ciblage génique d'EZH2 après retrait de l'inhibiteur à un niveau moléculaire (ChIP-seq). En effet, EZH2 est-elle capable d'apposer H3K27me3 *de novo* au niveau des gènes cibles lorsque l'activité enzymatique a été altérée puis rétablie en cours de PCD ? Le déterminisme cellulaire préétabli permet-il de guider l'action d'EZH2 vers ses gènes cibles dans ce contexte ? La réponse à ces questions paraît

primordiale dans une aire thérapeutique utilisant des inhibiteurs d'EZH2 de façon systémique, afin de prédire d'éventuels effets secondaires sur les cellules saines sur le long terme.

Un autre aspect intéressant des résultats obtenus dans cette étude est le fait qu'EZH2 réprime des gènes identitaires des lymphocytes B dans les prePBs, mais également des gènes impliqués dans le développement ou dans d'autres types cellulaires. En revanche, l'inhibition de l'enzyme induit, de manière précoce, un programme transcriptionnel de PC et non une dédifférenciation ou une trans-différenciation des cellules. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. D'une part, l'apoptose induite par l'inhibition d'EZH2 dans tous les stades cellulaires de la PCD, pourrait être due à des mécanismes de protection mis en place par les cellules en cas d'acquisition d'une identité ou d'un état cellulaire anormal, ou encore un processus non-physiologique. En revanche, cette suggestion n'explique pas pourquoi certaines cellules progressent vers une destinée plasmocytaire. Il a été proposé, dans plusieurs études, que le rôle de PRC2 au cours du développement ou de processus de différenciation serait de maintenir et de transmettre une identité cellulaire au cours des divisions et du temps, induite par l'expression de TFs clés. Aussi, le fait que la transformation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes soit médiée par l'induction de l'expression de TFs souches, et non de facteurs épigénétiques, démontre le rôle essentiel et nécessaire des TFs dans l'identité et le déterminisme cellulaire. Plusieurs études ont également montré la difficulté de reprogrammation de lymphocytes B matures par rapport aux immatures²²⁶. Dans un contexte physiologique non tumoral, il est possible que plus les lymphocytes B tendent vers un phénotype différencié, plus ils mettent en place des mécanismes de « non-retour » les protégeant d'une dédifférenciation ou d'une reprogrammation en cas de perturbation génique ponctuelle.

L'un des points faibles de notre modèle d'étude est que l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur l'activation des MBC ne peut pas être évalué. En effet, la perte de H3K27me3 induite par l'inhibiteur chimique d'EZH2 n'apparaît que quelques jours après traitement, en particulier dans des cellules non prolifératives. Aussi, le nombre de jours pendant lesquels des MBCs primaires peuvent être cultivés sans être activés est très limité. Notre stratégie a donc été d'induire la différenciation des MBCs et de traiter les cellules avec l'inhibiteur d'EZH2 au même moment, puis de maintenir l'inhibition en traitant à chaque étape du processus. Ainsi, il est très probable que l'activation des MBCs, la perte d'expression de TFs clés impliqués dans l'identité B et le processus de différenciation soient déclenchés avant que l'inhibition d'EZH2 n'ait pu avoir un effet sur la tri-méthylation de H3K27 ni sur l'expression des gènes. L'engagement des cellules B dans le processus de différenciation pourrait donc empêcher les

prePBs et PBs de se dédifférencier après inhibition d'EZH2, du fait de l'absence de TFs associés au type cellulaire B. Il serait intéressant d'évaluer la plasticité des PCs obtenus après inhibition d'EZH2 au cours de la PCD, et de déterminer s'ils sont plus facilement reprogrammables. Pour cela, nous pourrions notamment induire l'expression de TFs essentiels à l'identité des lymphocytes B (tels que PAX5 ou BCL6) dans des PCs, ayant été produits en absence d'EZH2. Les gènes associés au phénotype de lymphocytes B présentant un défaut de H3K27me3 pourraient alors être activés par leur TFs, et les PCs pourraient retrouver un phénotype plus immature (prePB) ou de lymphocyte B (MBC). Il est par ailleurs possible que des mécanismes supplémentaires soient mis en place afin d'empêcher les cellules de revenir vers ou de maintenir un phénotype de lymphocytes B, après inhibition d'EZH2.

La conformation 3D de la chromatine varie amplement au cours de la PCD, et est spécifique à chaque stade cellulaire du modèle. L'acquisition d'une architecture particulière après activation des MBCs pourraient être irréversible, empêcher le recrutement de facteurs clés caractérisant les lymphocytes B, et engager les cellules vers une destinée plasmocytaire. Il est possible qu'une perte de H3K27me3 après cet engagement soit alors insuffisante pour inverser le processus de différenciation. Notre laboratoire entreprend actuellement de comprendre les mécanismes impliqués dans les changements de conformation 3D de la chromatine au cours de la PCD, par une technique d'analyse globale de HiC. Une approche intéressante serait d'étudier le rôle d'EZH2, ainsi que d'autres enzymes épigénétiques, dans ce processus afin de comprendre d'une part comment la topologie nucléaire est régulée au cours de la PCD, et d'autre part si les variations de la conformation 3D observées au cours de la PCD peuvent être réversées. Les résultats de HiC obtenus nous permettront également de déterminer si les modulations de l'architecture 3D de la chromatine au cours de la PCD régulent directement l'expression des gènes, ou si les marques épigénétiques caractéristiques des statuts transcriptionnels sont responsables des changements architecturaux observés.

Outre l'expression de TFs spécifiques et l'architecture 3D de la chromatine, d'autres marques épigénétiques pourraient être impliquées dans un tel système. Ainsi, alors que les gènes associés à l'identité PC pourraient avoir un statut bivalent (H3K27me3 et H3K4me3) dans les prePBs, les gènes caractérisant les lymphocytes B pourraient, quant à eux, être réprimés (H3K27me3 seul). La marque activatrice serait alors suffisante, après perte de H3K27me3, pour induire un programme transcriptionnel de PC. La perte de H3K27me3, non-associée à un recrutement de TFs spécifiques ou de marques épigénétiques activatrices au niveau des gènes d'identité des lymphocytes B, serait insuffisante pour leur réexpression.

Aussi, nous pourrions imaginer un effet « dose-dépendant » des marques épigénétiques. En effet, il est possible que H3K27me3 soit présent sur les gènes impliqués dans des programmes transcriptionnels de lymphocytes B et de PCs, mais qu'il soit plus abondant dans le premier set de gènes. Ainsi, sur ce dernier, l'inhibition d'EZH2 entraînerait une diminution et non une perte de H3K27me3, garantissant le maintien de leur répression³⁸⁹. Malgré une perte globale de H3K27me3 après inhibition d'EZH2 (observée en microscopie et cytométrie en flux), EZH1 pourrait également compenser cette diminution de H3K27me3 sur un set de gènes particulier. Afin de vérifier ces hypothèses, nous projetons d'étudier le paysage épigénétique des différents stades cellulaires impliqués dans la PCD et ainsi d'apprécier la répartition de marques répressives (H3K27me3, H3K9me3...) et activatrices (H3K4me3, H3K27ac...) sur les gènes clés de la PCD. Nous pourrions également comparer l'abondance ainsi que la perte de H3K27me3 en fonction du set de gènes étudiés, avant et après inhibition d'EZH2. Par ailleurs, la comparaison de l'étude globale de la conformation de la chromatine avec celle de la répartition des marques histones permettrait d'identifier les boucles d'interaction entre régions régulatrices des différents gènes impliqués dans la PCD.

Par ailleurs, il est possible que d'autres marques épigénétiques répressives permettent d'empêcher les cellules de se différencier et diminuent leur plasticité. Il a été montré que les régions présentant un gain de méthylation de l'ADN dans les centroblastes et les PCs comparé aux lymphocytes B naïfs correspondaient à des régions réprimées par le complexe Polycomb²⁰⁹. Aussi, une étude récente a mis en évidence un gain de méthylation de l'ADN dans les centroblastes au niveau de régions riches en H3K27me3. Cette même étude montre que les régions du génome hyperméthylées dans les plasmocytes sont enrichies en gènes identitaires des lymphocytes B et altère l'accessibilité de séquences-motifs reconnues par des TFs impliqués dans le maintien de l'identité B³⁹⁰. En revanche, aucune modification de la méthylation de l'ADN n'a été observée au cours de la PCD au niveau de gènes clés plasmocytaires. Par ailleurs, et de manière contre-intuitive, une inhibition de la méthylation *de novo* induit une activation des lymphocytes B et la différenciation plasmocytaire³⁹⁰. Il est possible que les gènes exprimés dans les lymphocytes B soient réprimés via deux marques répressives dans les prePBs : la méthylation de l'ADN et la marque histone H3K27me3, tel que nous l'avons observé dans les plasmocytes tumoraux. Ainsi, l'altération d'un seul de ces deux mécanismes ne suffirait pas à restaurer ni à maintenir un phénotype de lymphocyte B ou à bloquer la PCD. Afin de valider ces hypothèses et de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation génique de la PCD, notre laboratoire entreprend actuellement l'étude du méthylome et de la répartition de H3K27me3 dans les différents stades cellulaires décrits dans

notre modèle *in vitro* de PCD. Nous pourrions ainsi étudier le rôle d'EZH2 et de H3K27me3 dans la régulation de la méthylation de l'ADN et évaluer leur potentielle collaboration. Aussi, étant donné que l'inhibition de la méthylation *de novo* de l'ADN et l'inhibition de l'activité catalytique répressive d'EZH2 sont capables d'accélérer la PCD, il serait intéressant d'inhiber ces deux mécanismes répresseurs en même temps afin de déterminer si l'accélération de la PCD est amplifiée ou si au contraire, cela entraîne la réexpression de TFs nécessaires à l'identité des lymphocytes B (ou autres types cellulaires) et de ce fait l'inhibition de la PCD.

Plusieurs études sur des mécanismes épigénétiques ont déjà été effectuées dans des modèles murins. Il sera par la suite possible de confirmer ou d'infirmer ces données avec les résultats que nous obtiendrons sur notre modèle *in vitro* de PCD humaine.

Cette étude, ainsi que celles décrites auparavant, mettent en évidence le rôle essentiel de différents mécanismes épigénétiques dans la régulation de la PCD et dans la physiologie des plasmocytes. Notamment, alors qu'une surexpression d'*EZH2* dans des cellules B naïves induit une hyperplasie des centres germinatifs et une inhibition de la PCD^{249,253,254}, l'inhibition de l'enzyme bloque la prolifération cellulaire et accélère la PCD en régulant l'expression de gènes fonctionnels clés impliqués dans ce processus. Une dérégulation de l'expression ou de l'activité d'EZH2, ainsi que d'autres enzymes/mécanismes épigénétiques, au cours de la PCD pourrait donc altérer la réponse immunitaire humorale. En effet, de plus en plus d'études ont mis en évidence le rôle de dérégulations de processus épigénétiques au cours de la PCD dans des maladies auto-immunes ou des états d'immunodépression³⁹¹⁻³⁹⁴. Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression ainsi que le rôle d'EZH2 dans ce type de pathologies. Nous avons mis en évidence par le passé que le modèle *in vitro* de PCD utilisé dans le laboratoire récapitulait les mécanismes cellulaires et moléculaires observés chez la souris et chez l'homme. Notre nouvelle étude ainsi que les résultats en cours d'analyse sur le paysage épigénétique dans la PCD, sont des preuves de concept qu'il est possible d'utiliser ce modèle, tel quel ou en co-culture, pour l'étude de mécanismes épigénétiques impliqués dans la PCD dans un contexte physiologique ou pathologique. Des validations ciblées sur des cellules *ex vivo* pourront être envisagées avec des méthodologies nécessitant peu de cellules.

Comme nous l'avons stipulé dans l'introduction de ce manuscrit, le myélome multiple (MM) est caractérisé par une accumulation anormale d'un clone plasmocytaire prolifératif sécrétant une grande quantité d'Ig monoclonale. Bien que les aberrations chromosomiques caractérisant le MM soient hétérogènes en fonction des patients, il est possible que

l'événement déclencheur soit, quant à lui, similaire chez tous les sujets. L'ordre chronologique d'apparition de défauts chromosomiques et d'altérations épigénétiques au moment de l'oncogenèse est délicate à étudier, étant donné qu'il n'existe à ce jour aucun modèle biologique récapitulant la myélomagénèse.

Bien que la composante cellulaire non-tumorale ait été décrite comme étant un PBs ou un PCs (moins prolifératifs), la cellule à l'origine ainsi que les mécanismes précurseurs de la myélomagénèse sont encore inconnus. Par ailleurs, plusieurs hypothèses ont été avancées dans l'introduction : 1) la cellule d'origine serait issue d'un stade cellulaire immature post-germinatif de la PCD dont la capacité à se différencier a été altérée (la cellule reste proliférative mais sécrète des Igs), 2) la cellule d'origine serait un plasmocyte ayant subi des changements transcriptionnels à la suite d'un stimulus lui conférant un avantage prolifératif caractéristique d'une cellule immature.

Au cours de la PCD, certains stades cellulaires immatures (prePBs ou centroblastes) sont sujets à une instabilité génomique due à une réplication importante associée à une transcription accrue liée à la production d'Ig. Par ailleurs, AID, fortement exprimé dans ces cellules, peut cibler de manière aspécifique des gènes non-Ig et ainsi induire leur mutation. Ces stades cellulaires sont donc des candidats intéressants comme cellule d'origine du MM. Plusieurs études ont montré qu'une surexpression d'*EZH2* dans des centroblastes entraîne une hyperplasie du centre germinatifs chez la souris, et favorise la lymphomagénèse en cas de mutation d'oncogènes connus. Dans notre étude, nous avons montré qu'une inhibition de l'activité enzymatique d'*EZH2* induit une accélération de la maturation/différenciation des prePBs en PCs. Il semblerait donc qu'il y ait une corrélation entre le statut immature des cellules, leur prolifération et l'expression d'*EZH2*. Par ailleurs, tout comme dans les prePBs, *EZH2* est surexprimé dans les PCs tumoraux de MM comparé aux PCs normaux, en association avec une prolifération accrue. D'après ces résultats, nous pouvons suggérer que, comme pour le lymphome, *EZH2* pourrait jouer un rôle dans la myélomagénèse. En utilisant le modèle de PCD *in vitro* de notre laboratoire, ou encore un modèle murin, il serait intéressant de maintenir, dans les PBs et PC, la surexpression d'*EZH2* observée dans les prePBs. Pour cela, nous pourrions transfecter les MBCs ou les prePBs avec un vecteur d'expression du gène *EZH2* sous le contrôle d'un promoteur de gène de ménage ou de CD38 (exprimé dans les PBs et PCs). Cette expérience nous permettrait de voir si, comme dans les centroblastes murins, l'induction de la surexpression d'*EZH2* entraîne une hyperprolifération des prePBs et ainsi un blocage de la PCD, ou si les cellules continuent leur différenciation tout en proliférant. Une autre approche serait de surexprimer *EZH2* dans les PCs (sous le

contrôle du promoteur de CD138 par exemple) et de déterminer si les cellules se différencient, ou du moins retrouvent un statut prolifératif similaire à celui des prePBs tout en maintenant leur phénotype de PC produisant des Igs.

Les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie peuvent survivre de nombreuses années dans l'organisme, et peuvent donc être sujet à différents types d'agression au cours de leur vie. Par ailleurs, plusieurs études ont décrit la possibilité de définir l'âge biologique d'une cellule grâce à son méthylome^{218,222-224}. Les variations du méthylome et de différentes marques d'histones, majoritairement médiées par des facteurs non-héréditaires, observées entre les individus et au sein d'un même type cellulaire, augmente avec l'âge du sujet^{218,222-224,395,396}. Aussi, la variabilité transcriptionnelle observée dans un type cellulaire augmente avec l'âge et serait due à une augmentation du « bruit de fond » épigénétique, particulièrement H3K27me3³⁹⁵. Il a été démontré que le méthylome des PCs variait en fonction de leur durée de vie²⁰⁹. Par ailleurs, les corps nucléaires observés dans les noyaux de PCs sont similaires aux foyers d'hétérochromatine (SAHFs) caractéristiques des cellules sénescentes. Il serait donc intéressant d'étudier si la répartition ou le taux global de différentes marques d'histones, ou encore l'architecture nucléaire 3D, varient dans les MBCs ou les PCs en fonction de la durée de vie de la cellule ou de l'âge d'un individu. En effet, tout comme le méthylome, les marques d'histones ou l'organisation chromatinienne au sein du noyau pourraient constituer une horloge biologique à l'échelle cellulaire. Ainsi, les modulations de mécanismes épigénétiques liées à l'âge et à l'environnement pourraient sensibiliser les cellules à certaines perturbations et au développement de cancers. Aussi, les variations de marques épigénétiques associées à l'âge dans les cellules souches hématopoïétiques, les MBCs ou les PCs, au sein d'un même individu, pourraient constituer une signature permettant de prédire l'apparition d'un MGUS, son évolution en SMM/MM, ou encore la survie des patients et leur réponse aux traitements.

Le MM est une maladie très hétérogène au niveau moléculaire comme au niveau clinique. En effet, comme nous l'avons rapporté, de nombreuses anomalies chromosomiques et mutations ont été décrites chez différents patients atteints de MM. Par ailleurs, les cellules tumorales de différents patients ne sont pas caractérisées par le même programme transcriptionnel. De plus, chez un même patient, il existe une hétérogénéité intra-clonale au diagnostic, amplifiée par la pression de sélection de l'accès à la niche médullaire et des traitements. Ces derniers induisent une sélection de clones tumoraux capables de résister aux agents chimiothérapeutiques. Vraisemblablement du fait de cette hétérogénéité moléculaire, la

réponse des patients aux chimiothérapies conventionnelles est hétérogène. En effet, les molécules utilisées à ce jour dans le traitement du MM ont été validées (efficacité et innocuité) grâce à des essais cliniques en se basant sur la réponse moyenne d'une population de patients. Cependant, il existe généralement des variations interindividuelles considérables : certains patients ne répondent peu ou pas, alors que la molécule testée sera très efficace sur un sous-groupe de patients. Le concept « un traitement pour tous les patients ayant la même pathologie » semble rencontrer certaines limites et ne pas être adapté à la prise en charge de diverses maladies, en particuliers de nombreux cancers comme le MM. Il est donc nécessaire de mettre en place une stratégie thérapeutique plus individualisée et personnalisée. Dans le MM, la stratification des patients a pour but d'adapter leur prise en charge thérapeutique en fonction du pronostic associés aux anomalies moléculaires caractérisant les cellules tumorales ainsi que leur éligibilité à la transplantation de cellules souches. Cependant, malgré des résultats positifs quant à la réponse et la survie des patients, les molécules proposées en première ligne pour le traitement du MM restent les mêmes, et une stratification en sous-groupes moléculaires ne suffisent pas à prédire la réponse de chaque patient aux différentes drogues. Dans le cadre d'une médecine personnalisée, il est nécessaire de développer de nouveaux biomarqueurs associés à chaque nouvelle molécule dès l'essais clinique, mesurables au diagnostic afin de faciliter l'optimisation de la prise en charge des patients. Les biomarqueurs permettent également de développer des combinaisons d'agents thérapeutiques plus adaptées à chacun, et de monitorer l'efficacité de ces drogues afin de guider la prise en charge personnalisée de différentes maladies et d'améliorer le ratio bénéfices/coût des traitements^{397,398}. L'augmentation significative du nombre de molécules thérapeutiques disponibles renforce ce besoin de biomarqueurs notamment pour le traitement des patients à la rechute. La nécessité d'identifier des biomarqueurs est d'autant plus importante pour les épi-drogues³⁹⁹. En effet, bien qu'il s'agisse de traitements prometteurs, la réponse est très hétérogène en fonction des patients, et n'est souvent visible qu'après quelques mois. Ainsi, l'association d'un biomarqueur pour chaque traitement, dans ce contexte, permettrait d'éviter un traitement inefficace de longue durée ainsi que les effets secondaires associés. Les patients non-répondeurs pourraient alors se voir offrir d'autres alternatives thérapeutiques. Les patients identifiés comme répondeurs grâce au biomarqueur pourront, quant à eux, se voir offrir un traitement ciblé. Aussi, l'utilisation de tests compagnons pourrait améliorer la stratification des patients dans les essais cliniques. Cela favoriserait l'autorisation de mise sur le marché de molécules thérapeutiques efficaces sur un sous-groupe de patients mais ayant un trop faible pourcentage de sujets répondeurs. Étant donné que les traitements épigénétiques

affectent le programme transcriptionnel des cellules tumorales, notre laboratoire a mis au point une méthode de calcul de score basé sur l'expression des gènes permettant de prédire la réponse des patients aux HDACi, DNMTi et à la combinaison des deux^{375-377,400} (essai clinique UF9760). Nous avons par ailleurs mis en évidence qu'une combinaison de HDACi et DNMTi, permettait une reprogrammation des plasmocytes tumoraux vers un phénotype de PCs matures normaux⁴⁰⁰.

Des inhibiteurs de l'enzyme épigénétique EZH2 sont actuellement testés en essais clinique dans des hémopathies et tumeurs solides et présentent des résultats prometteurs. EZH2 est surexprimé dans le MM et est associé à un mauvais pronostic. Nous avons donc décidé d'étudier son rôle dans la physiopathologie du MM. Nos résultats confirment l'hétérogénéité de réponse des lignées et cellules primaires de MM face au traitement avec l'inhibiteur de l'activité enzymatique d'EZH2 EPZ-6438. Cette hétérogénéité de réponse ne peut être prédite par le niveau d'expression d'*EZH2*, la perte induite de H3K27me3 ou encore les autres biomarqueurs décrits dans la littérature (surexpression de MMSET, mutation d'UTX). Nous avons donc créé un score basé sur l'expression de 15 gènes cibles d'EPZ-6438 dans les lignées, associés à H3K27me3 dans les cellules primaires et ayant une valeur pronostic chez des patients atteints de MM. Cet EZ-score permet d'identifier une sous-catégorie de patients atteints de MM pouvant bénéficier d'un traitement par des inhibiteurs d'EZH2. Les gènes utilisés pour calculer ce score n'ont jamais été décrit dans la biologie du MM. L'ADN au niveau du promoteur de certains de ces gènes a été retrouvé méthylé dans différents cancers. De manière intéressante, les patients présentant un haut EZ-score, c'est-à-dire potentiellement sensibles aux inhibiteurs d'EZH2, sont associés à un pronostic péjoratif. L'inhibiteur d'EZH2 pourrait donc être une stratégie thérapeutique prometteuse chez ces patients. Il serait par la suite intéressant de valider l'intérêt théranostique de l'EZ-score chez des patients atteints de MM traités avec un inhibiteur d'EZH2, dans le cadre d'un essai clinique. Il serait également intéressant de développer la même approche dans d'autres cancers dans lesquels l'inhibiteur d'EZH2 est actuellement en essai clinique. Nous avons mis en évidence dans notre étude que la perte d'H3K27me3 pouvait être mesurée par cytométrie en flux, technique couramment utilisée dans le contexte clinique pour l'évaluation du diagnostic d'hémopathies. Le Tazemetostat est actuellement testé en essais clinique chez des patients atteints d'hémopathie ou de cancers solides. Il serait intéressant d'évaluer en routine l'efficacité de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique d'EZH2 via l'analyse cytométrique du taux global d'H3K27me3 lors du suivi de patients atteints d'hémopathies traités avec du Tazemetostat.

Les cellules de MM résistantes à l'EPZ-6438 présentent une plus forte méthylation de l'ADN au niveau du promoteur des gènes cibles de l'inhibiteur d'EZH2. Aussi, l'inhibition de DNMTs entraîne une sensibilisation des cellules aux inhibiteurs d'EZH2. Tel qu'il a été observé dans d'autres cancers, il est possible que ces gènes soient associés aux deux marques inhibitrices dans les cellules de MM. La combinaison d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-azacytidine ou décitabine) avec un inhibiteur d'EZH2 pourrait donc être une stratégie intéressante. Par ailleurs, l'étude transcriptomique d'une telle combinaison nous permettrait de comprendre son efficacité et son rationnel biologique pour cibler les cellules de MM. Aussi, il serait intéressant de comparer le profil de méthylation de l'ADN avec celui de H3K27me3 dans cellules tumorales de MM. Il est en effet possible que ces deux marques colocalisent sur des gènes suppresseurs de tumeurs et altèrent la plasticité des cellules tumorales. Il serait également possible d'étudier l'hétérogénéité inter-patients et intra-clonale de ces modifications épigénétiques. En effet, cela pourrait expliquer en partie certaines différences de réponse aux traitements chez les patients, et mettre en avant le rôle de dérégulations épigénétiques dans l'apparition de différents sous-clones tumoraux intervenant dans la résistance aux traitements.

Dans notre étude, nous avons également démontré une synergie entre l'inhibiteur d'EZH2 et le lenalidomide. De plus, le prétraitement des cellules de MM avec l'inhibiteur d'EZH2 re-sensibilise les cellules de MM devenues résistantes aux IMiDs. De manière intéressante, l'utilisation de l'inhibiteur d'EZH2 en prétraitement semble primordiale afin d'assurer la synergie/sensibilisation au lenalidomide. Cela indique qu'une modulation du paysage épigénétique sur des gènes cibles d'EZH2 sensibilise les cellules de MM aux IMiDs. Il a préalablement été montré que la résistance des cellules de MM au lenalidomide était associée à une augmentation de la méthylation de l'ADN et une diminution de l'accessibilité chromatinienne³⁸⁰. Cette même étude a mis en évidence qu'une inhibition de la méthylation de l'ADN associée à celle d'EZH2 restaurait le niveau de compaction de la chromatine et re-sensibilisait les cellules au lenalidomide. En revanche, aucune analyse transcriptomique de la combinaison de ces drogues n'a été effectuée. Dans notre étude, nous avons mis en évidence qu'un autre mécanisme d'action mis en jeu dans cette combinaison est l'inhibition synergique de TFs essentiels pour la prolifération des cellules, tels que IRF4 et MYC. Ce résultat est d'un réel intérêt étant donné que, à l'heure actuelle, la majorité des patients atteints de MM rechutent à la suite du développement de résistance envers les chimiothérapies conventionnelles. Leung-Hagesteijn et al. a mis en évidence que la résistance des cellules tumorales aux inhibiteurs du protéasome pouvait être liée à la présence de prePBs au sein du

clone tumoral⁴⁰¹. Il est en effet possible que, pour échapper au traitement, les cellules tumorales acquièrent un phénotype immature, potentiellement grâce à une plasticité épigénétique. Une autre possibilité serait une préexistence de sous-populations immatures dès le diagnostic, n'exprimant pas encore les cibles de l'inhibiteurs du protéasome. L'inhibiteur d'EZH2 sensibilise les cellules de MM aux inhibiteurs du protéasome, notamment en induisant l'expression de suppresseurs de tumeurs et en inhibant l'expression d'oncogènes³²⁴. Nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 pendant la PCD induisait l'accélération du processus de différenciation. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer si cet inhibiteur favorise également la différenciation des prePBs et PBs tumoraux en PCs, augmentant ainsi la sensibilité du clone tumoral aux inhibiteurs du protéasome. Dans la même idée, étant donné que l'inhibition de la méthylation de l'ADN accélère la PCD^{216,390}, un DNMTi pourrait également permettre une sensibilisation des cellules de MM aux inhibiteurs du protéasome. Ces résultats pourraient ainsi présenter un intérêt thérapeutique pour les patients atteints de MM dans un contexte de résistance aux IMiDs et aux inhibiteurs du protéasome.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de mécanismes épigénétiques dans l'échappement et la résistance des cellules tumorales au système immunitaire. Ainsi, cibler des enzymes épigénétiques impliquées dans ce processus pourrait présenter un intérêt thérapeutique avec les nouvelles approches d'immunothérapie actuellement en développement dans le MM. Cette approche a été validée dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, et est actuellement testée dans des essais cliniques. Les inhibiteurs HDACi, DNMTi et EZH2i permettent la réexpression d'antigènes tumoraux, notamment impliqués dans la machinerie de traitement et de présentation de l'antigène, les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité I/II, des molécules de co-stimulation, des récepteurs induisant la mort cellulaire ou encore des cytokines. Les épi-drogues peuvent également moduler la fonction et l'activation des cellules immunitaires de l'hôte, comme les cellules T régulatrices et les lymphocytes natural killers⁴⁰²⁻⁴⁰⁴. Étant donné que les HMCLs traitées avec l'inhibiteur d'EZH2 surexpriment des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (*B2M*, *HLA*, *CD40*, *FAS* et *CXCL10*), il serait intéressant d'étudier l'effet de la combinaison d'épi-drogues, comme l'inhibiteur d'EZH2, avec des anticorps monoclonaux sur la survie des cellules de MM ainsi que sur l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Outre son rôle dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines, EZH2 pourrait intervenir dans la régulation d'autres processus épigénétiques dans le MM. Nous pourrions ainsi étudier l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur la conformation 3D de la

chromatine, la méthylation de l'ADN et l'expression de miARNs ou leur sécrétion dans des exosomes (effet sur le microenvironnement). La sensibilité des cellules de MM à l'EPZ-6438 pourrait aussi être liée à d'autres mécanismes épigénétiques régulant un programme transcriptionnel particulier.

Par ailleurs, les résultats que nous avons présentés mettent en évidence le rôle essentiel de l'activité enzymatique d'EZH2 pour la prolifération et la survie des cellules tumorales d'un sous-groupe de patients. Comme il a été montré dans d'autres cancers, et comme nous l'avons décrit dans la PCD, EZH2 peut également avoir une fonction indépendante de PRC2 et de son activité enzymatique. Dans la PCD, EZH2o régule notamment des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réponse au stress réplicatif. Dans le MM, EZH2 est plus fortement exprimé dans le sous-groupe de patient dont les cellules tumorales présentent un profil moléculaire prolifératif. EZH2 pourrait donc également avoir une activité de régulation de l'expression des gènes indépendante de H3K27me3 dans les cellules tumorales de MM. Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé les expériences permettant de mettre en évidence une fonction de régulation transcriptionnelle d'EZH2 indépendante d'H3K27me3. Cependant, afin de répondre à cette hypothèse, nous pourrions évaluer le recrutement d'EZH2 et de H3K27me3 au niveau du génome avant et après traitement par l'inhibiteur d'EZH2. Une autre approche complémentaire serait de comparer l'effet de la déplétion d'EZH2 par shARN sur le transcriptome et le phénotype des cellules à celui induit par l'EPZ-6438.

Plusieurs études ont mis en évidence une meilleure efficacité d'un inhibiteur ciblant EZH2 et EZH1 (UNC1999) dans des modèles *in vitro* de MM. Tout comme pour l'inhibiteur d'EZH2, l'UNC1999 induit une perte globale de H3K27me3, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En revanche, comme nous l'avons stipulé dans l'introduction de ce manuscrit, le rôle d'EZH1 dans la physiologie du MM n'a pas été étudiée. Tout comme dans la PCD, il serait intéressant d'évaluer les éventuelles différences d'action et de fonction des deux enzymes du complexes PRC2 dans le MM.

Malgré les résultats encourageant des essais précliniques et cliniques, il est important de garder en mémoire que 1) PRC2 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire normale et le maintien de l'identité des cellules matures, 2) EZH2 est un suppresseur de tumeur dans certains contextes et types cellulaires, et 3) EZH2 contrôle la capacité anti-tumorale des lymphocytes T mémoires CD8⁺⁴⁰⁵. Ainsi, bien que l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur le paysage épigénétique puisse être réversible⁹⁶, l'utilisation systémique de ce type de molécule sur le long terme, au lieu d'une approche plus ciblée, pourrait avoir des effets délétères sur la fonction des cellules normales⁴. Il serait intéressant de développer de

nouvelles molécules thérapeutiques plus ciblées dirigées contre des enzymes épigénétiques spécifiquement dans l'environnement tumoral. Ainsi, nous pourrions proposer des anticorps ciblant les cellules de MM conjugués à des inhibiteurs épigénétiques ou encore l'utilisation de nanoparticules comme vecteurs de telles molécules⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Ces approches permettraient d'augmenter la dose d'agent thérapeutique au niveau de la tumeur et de limiter les effets non-spécifiques affectant les cellules non tumorales.

Conclusions

Pour conclure, nos travaux ont permis de mettre en évidence l'importance du rôle des mécanismes de régulation épigénétiques dans la différenciation plasmocytaire normale ainsi que dans la physiopathologie du MM. EZH2 permet en effet le maintien de l'état prolifératif transitionnel des prePBs dans la PCD, favorisant ainsi l'amplification des cellules nécessaire à l'obtention d'un nombre suffisant de PCs fonctionnels pour assurer la défense de l'organisme contre différents pathogènes. Nos résultats présentent donc un intérêt important pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire humorale. La description de processus physiologiques normaux permet par ailleurs d'appréhender le développement de différentes pathologies, notamment certains cancers, et ainsi de développer de nouvelles stratégies de surveillance ou de diagnostic. EZH2, au sein du complexe PRC2, favorise également la survie, la prolifération et la résistance aux traitements des cellules tumorales de MM. Nos résultats soulignent l'hétérogénéité de réponse des cellules de MM à différents traitements, notamment aux inhibiteurs d'EZH2, à l'instar des bilans cliniques dans le MM ou d'autres types de cancers. Afin d'évoluer vers une médecine personnalisée que nous pensons plus appropriée pour le traitement du MM, nous avons créé un score basé sur des données de transcriptome des cellules tumorales de patients au diagnostic, permettant d'identifier une sous-population à haut risque pouvant bénéficier d'un traitement par des inhibiteurs d'EZH2. L'utilisation de biomarqueurs capable de prédire la réponse des patients aux traitements ou de définir de manière précoce leur efficacité permettrait d'optimiser l'utilisation de certaines molécules thérapeutiques et représente un réel avantage pour les patients atteints de cancers. Nos résultats ouvrent également la porte à de nombreuses questions et de nombreuses voies à explorer dans la PCD et les cellules tumorales de MM : La protéine EZH2 régule-t-elle d'autres mécanismes épigénétiques ? Les enzymes EZH2 et EZH1 ont-elles des fonctions interchangeables ? Comment évolue le paysage épigénétique des cellules au cours de la PCD et dans les MBCs et PCs en fonction de l'âge du sujet ? Quels sont les mécanismes à l'origine du recrutement de PRC2 au niveau de ses différents gènes cibles ? La protéine EZH2 possède-t-elle une fonction de régulation transcriptionnelle indépendante de H3K27me3 ? Des dérégulations épigénétiques au cours de la PCD peuvent-elles participer au développement de plasmocytes tumoraux ? Le paysage épigénétique des cellules tumorales est-il hétérogène en fonction des patients atteints de MM ? Il serait pertinent aussi de valider l'intérêt de l'EZ-score et de la combinaison EZH2i+IMiDs en clinique chez des patients à la rechute ou réfractaires aux IMiDs. Ces perspectives de recherche permettraient d'affiner nos connaissances non seulement dans le domaine de l'épigénétique, du système immunitaire ainsi que la physiopathologie et la prise en charge thérapeutique des patients atteints de MM.

Références bibliographiques

1. Felsenfeld G. A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6(1):a018200–a018200.
2. Villota-Salazar NA, Mendoza-Mendoza A, González-Prieto JM. Epigenetics: from the past to the present. *Front. Life Sci.* 2016;9(4):347–370.
3. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell.* 2007;128(4):635–638.
4. Toraño EG, García MG, Fernández-Morera JL, Niño-García P, Fernández AF. The Impact of External Factors on the Epigenome: *In Utero* and over Lifetime. *BioMed Res. Int.* 2016;2016:1–17.
5. Ebert MS, Sharp PA. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell.* 2012;149(3):515–524.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646–674.
7. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2016;1:15004.
8. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol. Oncol.* 2012;6(6):567–578.
9. Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone R. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(2):459.
10. Zhou W, Dinh HQ, Ramjan Z, et al. DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nat. Genet.* 2018;
11. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(9):517–534.
12. Cogné M. Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed. J.* 2013;36(6):259.
13. Dominguez PM, Shaknovich R. Epigenetic Function of Activation-Induced Cytidine Deaminase and Its Link to Lymphomagenesis. *Front. Immunol.* 2014;5:.
14. Yang X, Han H, De Carvalho DD, et al. Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(4):577–590.
15. Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8(1):.
16. Shi D-Q, Ali I, Tang J, Yang W-C. New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Front. Genet.* 2017;8:.
17. Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics.* 2017;12(6):416–432.
18. Zhang W, Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark. Res.* 2017;5:.
19. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 2016;30(7):733–750.
20. Pombo A, Dillon N. Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015;16(4):245–257.
21. Bonev B, Cavalli G. Organization and function of the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(11):661–678.
22. Fraser J, Ferrai C, Chiariello AM, et al. Hierarchical folding and reorganization of chromosomes are linked to transcriptional changes in cellular differentiation. *Mol. Syst. Biol.* 2015;11(12):852–852.
23. Szalaj P, Plewczynski D. Three-dimensional organization and dynamics of the genome. *Cell Biol. Toxicol.* 2018;
24. Norton HK, Phillips-Cremins JE. Crossed wires: 3D genome misfolding in human disease. *J. Cell Biol.* 2017;216(11):3441.
25. Madakashira BP, Sadler KC. DNA Methylation, Nuclear Organization, and Cancer. *Front. Genet.* 2017;8:.
26. Achinger-Kawecka J, Taberlay PC, Clark SJ. Alterations in Three-Dimensional Organization of the Cancer Genome and Epigenome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2016;81:41–51.
27. Taberlay PC, Achinger-Kawecka J, Lun ATL, et al. Three-dimensional disorganization of the cancer genome occurs coincident with long-range genetic and epigenetic alterations. *Genome Res.* 2016;26(6):719–731.

28. Gurard-Levin ZA, Almouzni G. Histone modifications and a choice of variant: a language that helps the genome express itself. *F1000Prime Rep.* 2014;6(7):.
29. Henikoff S, Smith MM. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(1):a019364.
30. Buschbeck M, Hake SB. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18(5):299–314.
31. Zhao Y, Garcia BA. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(9):a025064.
32. Zhang X, Huang Y, Shi X. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72(22):4257–4272.
33. Kouzarides T. SnapShot: Histone-Modifying Enzymes. *Cell.* 2007;131(4):822-822.e1.
34. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. 2000;403:5.
35. Prakash K, Fournier D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems.* 2018;164:49–59.
36. Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, et al. The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res.* 2015;25(12):1873–1885.
37. Mohan M, Herz H-M, Shilatifard A. SnapShot: Histone Lysine Methylase Complexes. *Cell.* 2012;149(2):498-498.e1.
38. Lan F, Shi Y. Histone H3.3 and cancer: A potential reader connection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112(22):6814–6819.
39. Chrun ES, Modolo F, Daniel FI. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathol. - Res. Pract.* 2017;213(11):1329–1339.
40. Kaniskan HÜ, Martini ML, Jin J. Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases. *Chem. Rev.* 2018;118(3):989–1068.
41. Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin. Epigenetics.* 2016;8(1):.
42. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13(5):337–356.
43. Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA. Certain and Progressive Methylation of Histone H4 at Lysine 20 during the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(1):468–486.
44. Brustel J, Tardat M, Kirsh O, Grimaud C, Julien E. Coupling mitosis to DNA replication: The emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol.* 2011;21(8):452–460.
45. Zheng N, Dai X, Wang Z, Wei W. A new layer of degradation mechanism for PR-Set7/Set8 during cell cycle. *Cell Cycle.* 2016;1–6.
46. Wu S, Rice JC. A new regulator of the cell cycle: The PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle.* 2011;10(1):68–72.
47. Wu S, Wang W, Kong X, et al. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes Dev.* 2010;24(22):2531–2542.
48. Yin Y, Yu VC, Zhu G, Chang DC. SET8 plays a role in controlling G₁/S transition by blocking lysine acetylation in histone through binding to H4 N-terminal tail. *Cell Cycle.* 2008;7(10):1423–1432.
49. Zouaz A, Fernando C, Perez Y, et al. Cell-cycle regulation of non-enzymatic functions of the Drosophila methyltransferase PR-Set7. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(6):2834–2849.
50. Abbas T, Shibata E, Park J, et al. CRL4Cdt2 Regulates Cell Proliferation and Histone Gene Expression by Targeting PR-Set7/Set8 for Degradation. *Mol. Cell.* 2010;40(1):9–21.
51. Centore RC, Havens CG, Manning AL, et al. CRL4Cdt2-Mediated Destruction of the Histone Methyltransferase Set8 Prevents Premature Chromatin Compaction in S Phase. *Mol. Cell.* 2010;40(1):22–33.
52. Jørgensen S, Eskildsen M, Fugger K, et al. SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4(CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation. *J. Cell Biol.* 2011;192(1):43–54.
53. Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(5):2797–2806.

54. Takawa M, Cho H-S, Hayami S, et al. Histone Lysine Methyltransferase SETD8 Promotes Carcinogenesis by Dereulating PCNA Expression. *Cancer Res.* 2012;72(13):3217–3227.
55. Li Y, Armstrong RL, Duronio RJ, MacAlpine DM. Methylation of histone H4 lysine 20 by PR-Set7 ensures the integrity of late replicating sequence domains in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 2016;gkw333.
56. Houston SI, McManus KJ, Adams MM, et al. Catalytic Function of the PR-Set7 Histone H4 Lysine 20 Monomethyltransferase Is Essential for Mitotic Entry and Genomic Stability. *J. Biol. Chem.* 2008;283(28):19478–19488.
57. Tardat M, Brustel J, Kirsh O, et al. The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(11):1086–1093.
58. Tardat M, Murr R, Herceg Z, Sardet C, Julien E. PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J. Cell Biol.* 2007;179(7):1413–1426.
59. Jørgensen S, Elvers I, Trelle MB, et al. The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J. Cell Biol.* 2007;179(7):1337–1345.
60. Congdon LM, Houston SI, Veerappan CS, Spektor TM, Rice JC. PR-Set7-mediated monomethylation of histone H4 lysine 20 at specific genomic regions induces transcriptional repression. *J. Cell. Biochem.* 2010;110(3):609–619.
61. Li Z, Nie F, Wang S, Li L. Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(8):3116–3123.
62. Spektor TM, Congdon LM, Veerappan CS, Rice JC. The UBC9 E2 SUMO Conjugating Enzyme Binds the PR-Set7 Histone Methyltransferase to Facilitate Target Gene Repression. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22785.
63. Kapoor-Vazirani P, Vertino PM. A Dual Role for the Histone Methyltransferase PR-SET7/SETD8 and Histone H4 Lysine 20 Monomethylation in the Local Regulation of RNA Polymerase II Pausing. *J. Biol. Chem.* 2014;289(11):7425–7437.
64. Wakabayashi K -i., Okamura M, Tsutsumi S, et al. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor /Retinoid X Receptor Heterodimer Targets the Histone Modification Enzyme PR-Set7/Setd8 Gene and Regulates Adipogenesis through a Positive Feedback Loop. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(13):3544–3555.
65. Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H, et al. Modulation of p53 Function by SET8-Mediated Methylation at Lysine 382. *Mol. Cell.* 2007;27(4):636–646.
66. West LE, Roy S, Lachmi-Weiner K, et al. The MBT Repeats of L3MBTL1 Link SET8-mediated p53 Methylation at Lysine 382 to Target Gene Repression. *J. Biol. Chem.* 2010;285(48):37725–37732.
67. Kalakonda N, Fischle W, Bocconi P, et al. Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene.* 2008;27(31):4293.
68. Dhami GK, Liu H, Galka M, et al. Dynamic Methylation of Numb by Set8 Regulates Its Binding to p53 and Apoptosis. *Mol. Cell.* 2013;50(4):565–576.
69. Weirich S, Kusevic D, Kudithipudi S, Jeltsch A. Investigation of the methylation of Numb by the SET8 protein lysine methyltransferase. *Sci. Rep.* 2015;5(1):.
70. Driskell I, Oda H, Blanco S, et al. The histone methyltransferase Setd8 acts in concert with c-Myc and is required to maintain skin. *EMBO J.* 2012;31(3):616–629.
71. Veschi V, Thiele CJ. High-SETD8 inactivates p53 in neuroblastoma. *Oncoscience.* 2017;4(3–4):21.
72. Tanaka H, Takebayashi S, Sakamoto A, et al. The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. *Cell Rep.* 2017;18(9):2148–2161.
73. Shih C-T, Chang Y-F, Chen Y-T, et al. The PPAR γ -SETD8 axis constitutes an epigenetic, p53-independent checkpoint on p21-mediated cellular senescence. *Aging Cell.* 2017;16(4):797–813.
74. Qin Y, Ouyang H, Liu J, Xie Y. Proteome identification of proteins interacting with histone methyltransferase SET8. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2013;45(4):303–308.
75. Huang R, Yu Y, Zong X, et al. Monomethyltransferase SETD8 regulates breast cancer metabolism via stabilizing hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Lett.* 2017;390:1–10.
76. Hou L, Li Q, Yu Y, Li M, Zhang D. SET8 induces epithelial-mesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1. *Mol. Med. Rep.* 2015;

77. Yang F, Sun L, Li Q, et al. SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* 2012;31(1):110–123.
78. Milite C, Feoli A, Viviano M, et al. The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clin. Epigenetics.* 2016;8(1):.
79. Ma A, Yu W, Li F, et al. Discovery of a Selective, Substrate-Competitive Inhibitor of the Lysine Methyltransferase SETD8. *J. Med. Chem.* 2014;57(15):6822–6833.
80. Ma A, Yu W, Xiong Y, et al. Structure–activity relationship studies of SETD8 inhibitors. *Med Chem Commun.* 2014;5(12):1892–1898.
81. Blum G, Ibáñez G, Rao X, et al. Small-Molecule Inhibitors of SETD8 with Cellular Activity. *ACS Chem. Biol.* 2014;9(11):2471–2478.
82. Gan L, Yang Y, Li Q, et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark. Res.* 2018;6(1):.
83. Schuettengruber B, Bourbon H-M, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell.* 2017;171(1):34–57.
84. Conway E, Healy E, Bracken AP. PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015;37:42–48.
85. Aranda S, Mas G, Di Croce L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci. Adv.* 2015;1(11):e1500737–e1500737.
86. Ishak CA, Marshall AE, Passos DT, et al. An RB-EZH2 Complex Mediates Silencing of Repetitive DNA Sequences. *Mol. Cell.* 2016;64(6):1074–1087.
87. Wassef M, Margueron R. The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. *J. Mol. Biol.* 2017;429(13):1978–1993.
88. Pan M-R, Hsu M-C, Chen L-T, Hung W-C. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;
89. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, et al. Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Mol. Cell.* 2014;53(1):49–62.
90. Entrevan M, Schuettengruber B, Cavalli G. Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins. *Trends Cell Biol.* 2016;
91. Eagen KP, Aiden EL, Kornberg RD. Polycomb-mediated chromatin loops revealed by a subkilobase-resolution chromatin interaction map. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114(33):8764–8769.
92. Lanzuolo C, Lo Sardo F, Diamantini A, Orlando V. PcG Complexes Set the Stage for Epigenetic Inheritance of Gene Silencing in Early S Phase before Replication. *PLoS Genet.* 2011;7(11):.
93. Lanzuolo C, Lo Sardo F, Orlando V. Concerted epigenetic signatures inheritance at PcG targets through replication. *Cell Cycle.* 2012;11(7):1296–1300.
94. Li H, Liefke R, Jiang J, et al. Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature.* 2017;549(7671):287–291.
95. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, et al. Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000242.
96. Højfeldt JW, Laugesen A, Willumsen BM, et al. Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018;25(3):225–232.
97. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, et al. Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell.* 2014;157(6):1445–1459.
98. Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, et al. Targeting Polycomb to Pericentric Heterochromatin in Embryonic Stem Cells Reveals a Role for H2AK119u1 in PRC2 Recruitment. *Cell Rep.* 2014;7(5):1456–1470.
99. Wang X, Paucek RD, Gooding AR, et al. Molecular analysis of PRC2 recruitment to DNA in chromatin and its inhibition by RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017;24(12):1028–1038.
100. Kaneko S, Son J, Shen SS, Reinberg D. PRC2 binds to active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells. 2014;19.
101. He A, Shen X, Ma Q, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev.* 2012;26(1):37–42.
102. Sbirkov Y, Kwok C, Bhamra A, et al. Semi-Quantitative Mass Spectrometry in AML Cells Identifies New Non-Genomic Targets of the EZH2 Methyltransferase. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(7):1440.

103. Lee JM, Lee JS, Kim H, et al. EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell.* 2012;48(4):572–586.
104. Yan J, Ng S-B, Tay JL-S, et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood.* 2013;121(22):4512–4520.
105. Xu H, Xu K, He HH, et al. Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol. Cancer Res.* 2016;14(2):163–172.
106. Özeş AR, Pulliam N, Ertosun MG, et al. Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates STAT3 activation and oncogenic EZH2 activity. *Oncogene.* 2018;
107. Kim E, Kim M, Woo D-H, et al. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell.* 2013;23(6):839–852.
108. Lee S-R, Roh Y-G, Kim S-K, et al. Activation of EZH2 and SUZ12 Regulated by E2F1 Predicts the Disease Progression and Aggressive Characteristics of Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015;21(23):5391–5403.
109. Xiao J. MiR-32 Functions as a Tumor Suppressor and Directly Targets EZH2 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med. Sci. Monit.* 2014;20:2527–2535.
110. Lu H, Li G, Zhou C, et al. Regulation and role of post-translational modifications of enhancer of zeste homologue 2 in cancer development. *Am. J. Cancer Res.* 2016;6(12):2737.
111. Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development.* 2013;140(12):2525–2534.
112. Bracken AP. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* 2006;20(9):1123–1136.
113. Collinson A, Collier AJ, Morgan NP, et al. Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* 2016;17(10):2700–2714.
114. Martinez A-M, Cavalli G. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle.* 2006;5(11):1189–1197.
115. Piunti A, Rossi A, Cerutti A, et al. Polycomb proteins control proliferation and transformation independently of cell cycle checkpoints by regulating DNA replication. *Nat. Commun.* 2014;5:
116. Picard F, Cadoret J-C, Audit B, et al. The Spatiotemporal Program of DNA Replication Is Associated with Specific Combinations of Chromatin Marks in Human Cells. *PLoS Genet.* 2014;10(5):.
117. Margueron R, Li G, Sarma K, et al. Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Mol. Cell.* 2008;32(4):503–518.
118. Abdalkader L, Oka T, Takata K, et al. Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms. *Pathology (Phila.).* 2016;
119. Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, et al. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. *Blood.* 2015;126(10):1172–1183.
120. Xu J, Shao Z, Li D, et al. Developmental Control of Polycomb Subunit Composition by GATA Factors Mediates a Switch to Non-Canonical Functions. *Mol. Cell.* 2015;57(2):304–316.
121. Mozhui K, Pandey AK. Conserved effect of aging on DNA methylation and association with EZH2 polycomb protein in mice and humans. *Mech. Ageing Dev.* 2017;
122. Jie B, Weilong C, Ming C, et al. Enhancer of zeste homolog 2 depletion induces cellular senescence via histone demethylation along the INK4/ARF locus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015;65:104–112.
123. Hidalgo I, Herrera-Merchan A, Ligos JM, et al. Ezh1 Is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Prevents Senescence-like Cell Cycle Arrest. *Cell Stem Cell.* 2012;11(5):649–662.
124. Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 2007;21(5):525–530.
125. Kheradmand Kia S, Solaimani Kartalaei P, Farahbakhshian E, et al. EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin.* 2009;2:16.

126. Iannetti A, Ledoux AC, Tudhope SJ, et al. Regulation of p53 and Rb Links the Alternative NF- κ B Pathway to EZH2 Expression and Cell Senescence. *PLoS Genet.* 2014;10(9):e1004642.
127. Agherbi H, Gaussmann-Wenger A, Verthuy C, et al. Polycomb Mediated Epigenetic Silencing and Replication Timing at the INK4a/ARF Locus during Senescence. *PLoS ONE.* 2009;4(5):.
128. Savickienė J, Baronaitė S, Zentelytė A, Treigyte G, Navakauskienė R. Senescence-Associated Molecular and Epigenetic Alterations in Mesenchymal Stem Cell Cultures from Amniotic Fluid of Normal and Fetus-Affected Pregnancy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:.
129. Tzatsos A, Paskaleva P, Lymperi S, et al. Lysine-specific Demethylase 2B (KDM2B)-let-7-Enhancer of Zester Homolog 2 (EZH2) Pathway Regulates Cell Cycle Progression and Senescence in Primary Cells. *J. Biol. Chem.* 2011;286(38):33061–33069.
130. Ito T, Teo YV, Evans SA, Neretti N, Sedivy JM. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep.* 2018;22(13):3480–3492.
131. Wen Y, Cai J, Hou Y, Huang Z, Wang Z. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget.* 2017;8(23):.
132. Iwama A. Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. *Blood.* 2017;blood–2017.
133. Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B, Moreaux J. EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget.* 2016;7(3):2284.
134. Ryan RJH, Nitta M, Borger D, et al. EZH2 Codon 641 Mutations are Common in BCL2-Rearranged Germinal Center B Cell Lymphomas. *PLoS ONE.* 2011;6(12):e28585.
135. Ott HM, Graves AP, Pappalardi MB, et al. A687V EZH2 Is a Driver of Histone H3 Lysine 27 (H3K27) Hypertrimethylation. *Mol. Cancer Ther.* 2014;13(12):3062–3073.
136. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 2010;42(2):181–185.
137. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(8):2989–2994.
138. Shirahata-Adachi M, Iriyama C, Tomita A, et al. Altered EZH2 splicing and expression is associated with impaired histone H3 lysine 27 tri-Methylation in myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 2017;63:90–97.
139. Göllner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2016;
140. Yan K-S, Lin C-Y, Liao T-W, et al. EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(6):1172.
141. Song X, Zhang L, Gao T, et al. Selective inhibition of EZH2 by ZLD10A blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells proliferation. *Biomed. Pharmacother.* 2016;81:288–294.
142. Qi W, Chan H, Teng L, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(52):21360–21365.
143. Gulati N, Béguelin W, Giulino-Roth L. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leuk. Lymphoma.* 2018;1–12.
144. Kuntz KW, Campbell JE, Keilhack H, et al. The Importance of Being Me: Magic Methyls, Methyltransferase Inhibitors, and the Discovery of Tazemetostat. *J. Med. Chem.* 2016;59(4):1556–1564.
145. Campbell JE, Kuntz KW, Knutson SK, et al. EPZ011989, A Potent, Orally-Available EZH2 Inhibitor with Robust in Vivo Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* 2015;6(5):491–495.
146. Van Aller GS, Pappalardi MB, Ott HM, et al. Long Residence Time Inhibition of EZH2 in Activated Polycomb Repressive Complex 2. *ACS Chem. Biol.* 2014;9(3):622–629.
147. Kurmasheva RT, Sammons M, Favours E, et al. Initial testing (stage 1) of tazemetostat (EPZ-6438), a novel EZH2 inhibitor, by the Pediatric Preclinical Testing Program: Kurmasheva et al. *Pediatr. Blood Cancer.* 2016;

148. Huang Y, Zhang J, Yu Z, et al. Discovery of First-in-Class, Potent, and Orally Bioavailable Embryonic Ectoderm Development (EED) Inhibitor with Robust Anticancer Efficacy. *J. Med. Chem.* 2017;60(6):2215–2226.
149. Rare Tumors in Kids May Respond to Tazemetostat. *Cancer Discov.* 2018;8(1):OF5.
150. Wiese M, Schill F, Sturm D, et al. No Significant Cytotoxic Effect of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438) on Pediatric Glioma Cells with Wildtype Histone 3 or Mutated Histone 3.3. *Klin. Pädiatr.* 2016;228(03):113–117.
151. Italiano A, Soria J-C, Toulmonde M, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2018;
152. Gibaja V, Shen F, Harari J, et al. Development of secondary mutations in wild-type and mutant EZH2 alleles cooperates to confer resistance to EZH2 inhibitors. *Oncogene.* 2016;35(5):558–566.
153. Garapaty-Rao S, Nasveschuk C, Gagnon A, et al. Identification of EZH2 and EZH1 Small Molecule Inhibitors with Selective Impact on Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Growth. *Chem. Biol.* 2013;20(11):1329–1339.
154. Honma D, Kanno O, Watanabe J, et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. *Cancer Sci.* 2017;
155. Konze KD, Ma A, Li F, et al. An Orally Bioavailable Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem. Biol.* 2013;8(6):1324–1334.
156. Yu Y-H, Lin K-I. Factors That Regulate the Generation of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Adv. Immunol.* 2016;131:61–99.
157. Methot SP, Di Noia JM. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv. Immunol.* 2017;133:37–87.
158. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, et al. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19–CD38hiCD138+ Subset in Human Bone Marrow. *Immunity.* 2015;43(1):132–145.
159. Hammarlund E, Thomas A, Amanna IJ, et al. Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nat. Commun.* 2017;8:
160. McCarron MJ, Park PW, Fooksman DR. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood.* 2017;129(20):2749–2759.
161. Biajoux V, Natt J, Freitas C, et al. Efficient Plasma Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell Rep.* 2016;17(1):193–205.
162. Nera K-P, Kyläniemi MK, Lassila O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand. J. Immunol.* 2015;82(3):225–234.
163. Jourdan M, Cren M, Robert N, et al. IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia.* 2014;28(8):1647–1656.
164. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(3):160–171.
165. Aronov M, Tirosh B. Metabolic Control of Plasma Cell Differentiation- What We Know and What We Don't Know. *J. Clin. Immunol.* 2016;36(S1):12–17.
166. Auner HW, Beham-Schmid C, Dillon N, Sabbattini P. The life span of short-lived plasma cells is partly determined by a block on activation of apoptotic caspases acting in combination with endoplasmic reticulum stress. *Blood.* 2010;116(18):3445–3455.
167. Pelletier N, Casamayor-Palleja M, De Luca K, et al. The Endoplasmic Reticulum Is a Key Component of the Plasma Cell Death Pathway. *J. Immunol.* 2006;176(3):1340–1347.
168. Jones DD, Gaudette BT, Wilmore JR, et al. mTOR has distinct functions in generating versus sustaining humoral immunity. *J. Clin. Invest.* 126(11):4250–4261.
169. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol. Rev.* 2018;283(1):138–149.
170. Pape KA, Jenkins MK. Do Memory B Cells Form Secondary Germinal Centers?: It Depends. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017;a029116.
171. Jourdan M, Caraux A, Caron G, et al. Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. *J. Immunol.* 2011;187(8):3931–3941.

172. Shaffer AL, Lin K-I, Kuo TC, et al. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity*. 2002;17(1):51–62.
173. Corcoran LM, Tarlinton DM. Regulation of germinal center responses, memory B cells and plasma cell formation—an update. *Curr. Opin. Immunol.* 2016;39:59–67.
174. Alinikula J, Nera K-P, Junttila S, Lassila O. Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 2011;41(8):2404–2413.
175. Igarashi K, Ochiai K, Itoh-Nakadai A, Muto A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunol. Rev.* 2014;261(1):116–125.
176. Chen S, Miyazaki M, Fisch K, Chang AN, Murre C. Id3 Orchestrates Germinal Center B Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 2016;MCB.00150-16.
177. Willis SN, Tellier J, Liao Y, et al. Environmental sensing by mature B cells is controlled by the transcription factors PU.1 and SpiB. *Nat. Commun.* 2017;8:.
178. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2016;17(3):331–343.
179. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr. Opin. Immunol.* 2004;16(2):226–234.
180. Zhu C, Chen G, Zhao Y, Gao X-M, Wang J. Regulation of the Development and Function of B Cells by ZBTB Transcription Factors. *Front. Immunol.* 2018;9:.
181. Piovesan D, Tempny J, Di Pietro A, et al. c-Myb Regulates the T-Bet-Dependent Differentiation Program in B Cells to Coordinate Antibody Responses. *Cell Rep.* 2017;19(3):461–470.
182. Francis DA, Karras JG, Ke X, Sen R, Rothstein TL. Induction of the transcription factors NF- κ B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor. 2014;11.
183. Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF- κ B Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2(5):a000182–a000182.
184. Heise N, De Silva NS, Silva K, et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- κ B transcription factor subunits. *J. Exp. Med.* 2014;211(10):2103–2118.
185. Mielenz D, Grötsch B, David J-P. Repressing the repressor: Fra1 controls plasma cell generation. *Oncotarget.* 2015;6(20):17861.
186. Grötsch B, Brachs S, Lang C, et al. The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells. *J. Exp. Med.* 2014;211(11):2199–2212.
187. Leberman DA, Edmiston JS. The role of TGF- β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1297–1304.
188. Khiem D, Cyster JG, Schwarz JJ, Black BL. A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(44):17067–17072.
189. De S, Zhang B, Shih T, et al. B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation. *Front. Immunol.* 2018;8:.
190. Ushijima M, Uruno T, Nishikimi A, et al. The Rac Activator DOCK2 Mediates Plasma Cell Differentiation and IgG Antibody Production. *Front. Immunol.* 2018;9:.
191. Kleiman E, Jia H, Loguercio S, Su AI, Feeney AJ. YY1 plays an essential role at all stages of B-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016;113(27):E3911–E3920.
192. Shi W, Liao Y, Willis SN, et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat. Immunol.* 2015;16(6):663–673.
193. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood.* 2009;114(25):5173–5181.
194. Fang X, Tong Y, Tian H, et al. Rapid de novo generation of antigen specific human B cells with expression of Blimp-1 and AID by in vitro immunization. *Exp. Cell Res.* 2017;352(1):53–62.
195. Hung KL, Meitlis I, Hale M, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Mol. Ther.* 2018;26(2):456–467.
196. Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, et al. IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK-ERK Signaling. *J. Immunol.* 2012;189(1):161–173.
197. Huggins J, Pellegrin T, Felgar RE, et al. CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. *Blood.* 2007;109(4):1611–1619.

198. Tangye SG, Avery DT, Hodgkin PD. A Division-Linked Mechanism for the Rapid Generation of Ig-Secreting Cells from Human Memory B Cells. *J. Immunol.* 2003;170(1):261–269.
199. Kassambara A, Rème T, Jourdan M, et al. GenomicScape: An Easy-to-Use Web Tool for Gene Expression Data Analysis. Application to Investigate the Molecular Events in the Differentiation of B Cells into Plasma Cells. *PLOS Comput. Biol.* 2015;11(1):e1004077.
200. Meininger J, Jäck H-M, Pracht K. miRNA meets plasma cells “How tiny RNAs control antibody responses.” *Clin. Immunol.* 2018;186:3–8.
201. White CA, Pone EJ, Lam T, et al. Histone Deacetylase Inhibitors Upregulate B Cell microRNAs That Silence AID and Blimp-1 Expression for Epigenetic Modulation of Antibody and Autoantibody Responses. *J. Immunol.* 2014;193(12):5933–5950.
202. Gururajan M, Haga CL, Das S, et al. MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. *Int. Immunol.* 2010;22(7):583–592.
203. Shen T, Sanchez HN, Zan H, Casali P. Genome-Wide Analysis Reveals Selective Modulation of microRNAs and mRNAs by Histone Deacetylase Inhibitor in B Cells Induced to Undergo Class-Switch DNA Recombination and Plasma Cell Differentiation. *Front. Immunol.* 2015;6:.
204. Bartolomé-Izquierdo N, de Yébenes VG, Álvarez-Prado AF, et al. miR-28 regulates the germinal center reaction and blocks tumor growth in preclinical models of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017;129(17):2408–2419.
205. AU - Sanchez HN, AU - Shen T, AU - Garcia D, et al. Genome-wide Analysis of HDAC Inhibitor-mediated Modulation of microRNAs and mRNAs in B Cells Induced to Undergo Class-switch DNA Recombination and Plasma Cell Differentiation. *J. Vis. Exp.* 2017;(127):e55135.
206. Porstner M, Winkelmann R, Daum P, et al. miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2: Molecular immunology. *Eur. J. Immunol.* 2015;45(4):1206–1215.
207. Kassambara A, Jourdan M, Bruyer A, et al. Global miRNA expression analysis identifies novel key regulators of plasma cell differentiation and malignant plasma cell. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(10):5639–5652.
208. Schuyler RP, Merkel A, Raineri E, et al. Distinct Trends of DNA Methylation Patterning in the Innate and Adaptive Immune Systems. *Cell Rep.* 2016;17(8):2101–2111.
209. Kulis M, Merkel A, Heath S, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B-cell differentiation. *Nat. Genet.* 2015;47(7):746–756.
210. Shaknovich R, Cerchietti L, Tsikitas L, et al. DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B-cell differentiation. *Blood.* 2011;118(13):3559–3569.
211. Lai AY, Mav D, Shah R, et al. DNA methylation profiling in human B cells reveals immune regulatory elements and epigenetic plasticity at Alu elements during B-cell activation. *Genome Res.* 2013;23(12):2030–2041.
212. Dominguez PM, Teater M, Chambwe N, et al. DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. *Cell Rep.* 2015;12(12):2086–2098.
213. Ramiro AR, Barreto VM. Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation. *Trends Biochem. Sci.* 2015;40(3):172–181.
214. Fritz EL, Rosenberg BR, Lay K, et al. A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* 2013;14(7):749–755.
215. Nabel CS, Jia H, Ye Y, et al. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat. Chem. Biol.* 2012;8(9):751–758.
216. Barwick BG, Scharer CD, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. *Nat. Immunol.* 2016;
217. Caron G, Hussein M, Kulis M, et al. Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Rep.* 2015;13(5):1059–1071.
218. Martin-Subero JI, Oakes CC. Charting the dynamic epigenome during B-cell development. *Semin. Cancer Biol.* 2017;
219. Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell.* 2013;49(2):359–367.

220. Heyn H, Vidal E, Ferreira HJ, et al. Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. *Genome Biol.* 2016;17(1):.
221. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
222. Zheng SC, Widschwendter M, Teschendorff AE. Epigenetic drift, epigenetic clocks and cancer risk. *Epigenomics.* 2016;8(5):705–719.
223. Lowe D, Horvath S, Raj K. Epigenetic clock analyses of cellular senescence and ageing. *Oncotarget.* 2016;7(8):8524–8531.
224. Declerck K, Vanden Berghe W. Back to the future: Epigenetic clock plasticity towards healthy aging. *Mech. Ageing Dev.* 2018;
225. Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, et al. Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(35):12979–12984.
226. Muñoz-López Á, van Roon EHJ, Romero-Moya D, et al. Cellular Ontogeny and Hierarchy Influence the Reprogramming Efficiency of Human B Cells into Induced Pluripotent Stem Cells: B-Cell Lineage Reprogramming. *STEM CELLS.* 2016;34(3):581–587.
227. Kieffer-Kwon K-R, Nimura K, Rao SSP, et al. Myc Regulates Chromatin Decompaction and Nuclear Architecture during B Cell Activation. *Mol. Cell.* 2017;67(4):566-578.e10.
228. Bunting KL, Soong TD, Singh R, et al. Multi-tiered Reorganization of the Genome during B Cell Affinity Maturation Anchored by a Germinal Center-Specific Locus Control Region. *Immunity.* 2016;45(3):497–512.
229. Pérez-García A, Marina-Zárate E, Álvarez-Prado ÁF, et al. CTCF orchestrates the germinal centre transcriptional program and prevents premature plasma cell differentiation. *Nat. Commun.* 2017;8:.
230. Bortnick A, He Z, Aubrey M, et al. An inter-chromosomal transcription hub activates the unfolded protein response in plasma cells. 2018;
231. Scharer CD, Barwick BG, Guo M, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is controlled by multiple cell division-coupled epigenetic programs. *Nat. Commun.* 2018;9:.
232. Baxter J, Sauer S, Peters A, et al. Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes. *EMBO J.* 2004;23(22):4462–4472.
233. Wen D, Banaszynski LA, Rosenwaks Z, Allis CD, Rafii S. H3.3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos. *Nucleus.* 2014;5(5):369–375.
234. Weth O, Paprotka C, Gunther K, et al. CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(19):11941–11951.
235. Waibel M, Christiansen AJ, Hibbs ML, et al. Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat. Commun.* 2015;6(1):.
236. Kienzler A-K, Rizzi M, Reith M, Nutt SL, Eibel H. Inhibition of human B-cell development into plasmablasts by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;131(6):1695-1699.e9.
237. Jiang X-X, Chou Y, Jones L, et al. Epigenetic Regulation of Antibody Responses by the Histone H2A Deubiquitinase MYSM1. *Sci. Rep.* 2015;5:13755.
238. Green MR, Yoon H, Boss JM. Epigenetic Regulation during B Cell Differentiation Controls CIITA Promoter Accessibility. *J. Immunol.* 2006;177(6):3865–3873.
239. Li G, Zan H, Xu Z, Casali P. Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* 2013;34(9):460–470.
240. Fujita N, Jaye DL, Geigerman C, et al. MTA3 and the Mi-2/NuRD Complex Regulate Cell Fate during B Lymphocyte Differentiation. *Cell.* 2004;119(1):75–86.
241. Barneda-Zahonero B, Roman-Gonzalez L, Collazo O, Mahmoudi T, Parra M. Epigenetic Regulation of B Lymphocyte Differentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming. *Comp. Funct. Genomics.* 2012;2012:.
242. Tanaka H, Muto A, Shima H, et al. Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* 2016;291(12):6316–6330.
243. Bao Y, Cao X. Epigenetic Control of B Cell Development and B-Cell-Related Immune Disorders. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2016;50(3):301–311.

244. Su S-T, Ying H-Y, Chiu Y-K, et al. Involvement of Histone Demethylase LSD1 in Blimp-1-Mediated Gene Repression during Plasma Cell Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(6):1421–1431.
245. Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K. Transcriptional Repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) Involves Recruitment of Histone Deacetylase. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(7):2592–2603.
246. Zan H, Casali P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front. Immunol.* 2015;6:.
247. Ying Z, Mei M, Zhang P, et al. Histone Arginine Methylation by PRMT7 Controls Germinal Center Formation via Regulating *Bcl6* Transcription. *J. Immunol.* 2015;195(4):1538–1547.
248. Infantino S, Light A, O'Donnell K, et al. Arginine methylation catalyzed by PRMT1 is required for B cell activation and differentiation. *Nat. Commun.* 2017;8:.
249. Caganova M, Carrisi C, Varano G, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 2013;123(12):5009–5022.
250. Béguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell.* 2013;23(5):677–692.
251. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood.* 2010;116(24):5247–5255.
252. Raaphorst FM, van Kemenade FJ, Fieret E, et al. Cutting Edge: Polycomb Gene Expression Patterns Reflect Distinct B Cell Differentiation Stages in Human Germinal Centers. *J. Immunol.* 2000;164(1):1–4.
253. Béguelin W, Rivas MA, Calvo Fernández MT, et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat. Commun.* 2017;8(1):.
254. Béguelin W, Teater M, Gearhart MD, et al. EZH2 and BCL6 Cooperate to Assemble CBX8-BCOR Complex to Repress Bivalent Promoters, Mediate Germinal Center Formation and Lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2016;30(2):197–213.
255. Berg T, Thoene S, Yap D, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood.* 2014;123(25):3914–3924.
256. Neo WH, Lim JF, Grumont R, Gerondakis S, Su I-h. c-Rel Regulates Ezh2 Expression in Activated Lymphocytes and Malignant Lymphoid Cells. *J. Biol. Chem.* 2014;289(46):31693–31707.
257. Guo M, Price MJ, Patterson DG, et al. EZH2 Represses the B Cell Transcriptional Program and Regulates Antibody-Secreting Cell Metabolism and Antibody Production. *J. Immunol.* 2018;200(3):1039–1052.
258. Braggio E, Kortüm KM, Stewart AK. SnapShot: Multiple Myeloma. *Cancer Cell.* 2015;28(5):678–678.e1.
259. Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018;
260. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 2017;3:17046.
261. Zhan F. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(6):2020–2028.
262. Egan JB, Shi C-X, Tembe W, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood.* 2012;120(5):1060–1066.
263. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood.* 2012;120(5):1067–1076.
264. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat. Commun.* 2014;5:.
265. Bahlis NJ. In this issue of Blood, Keats et al,¹ Egan et al,² and Walker et al³ provide a genome-wide snapshot of the clonal landscape in multiple myeloma (MM) illustrating the complexity of the evolutionary process and the dynamics of clonal evolution over time. 3.
266. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12(5):335–348.
267. on behalf of the GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group, Paíno T, Paiva B, et al. Phenotypic

- identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential. *Leukemia*. 2015;29(5):1186–1194.
268. Paiva B, Puig N, Cedena M-T, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia*. 2016;
 269. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(2):473–481.
 270. Chaidos A, Barnes CP, Cowan G, et al. Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood*. 2013;121(2):318–328.
 271. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2011;117(2):553–562.
 272. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma Is Characterized by Stage-Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *J. Immunol*. 2013;190(6):2966–2975.
 273. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis*. 2009;30(8):1330–1335.
 274. Sive JI, Feber A, Smith D, et al. Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis. *Br. J. Haematol*. 2016;172(3):473–475.
 275. Agirre X, Castellano G, Pascual M, et al. Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15:e86–e87.
 276. Amodio N, D'Aquila P, Passarino G, Tassone P, Bellizzi D. Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2017;21(1):91–101.
 277. Turner JG, Gump JL, Zhang C, et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(12):3881–3889.
 278. Chim C, Liang R, Leung M, Kwong Y. Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *J. Clin. Pathol*. 2007;60(1):104–106.
 279. Galm O, Wilop S, Reichelt J, et al. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia*. 2004;18(10):1687–1692.
 280. Heller G, Schmidt WM, Ziegler B, et al. Genome-Wide Transcriptional Response to 5-Aza-2'-Deoxycytidine and Trichostatin A in Multiple Myeloma Cells. *Cancer Res*. 2008;68(1):44–54.
 281. Braggio E, Maiolino A, Gouveia ME, et al. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Int. J. Hematol*. 2010;91(1):87–96.
 282. Kaiser MF, Johnson DC, Wu P, et al. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood*. 2013;122(2):219–226.
 283. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2010;107(17):7904–7909.
 284. Pawlyn C, Kaiser MF, Heuck C, et al. The spectrum and clinical impact of epigenetic modifier mutations in myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2016;22(23):5783–5794.
 285. Rastgoo N, Abdi J, Hou J, Chang H. Role of epigenetics-microRNA axis in drug resistance of multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*. 2017;10(1):.
 286. Yang Y, Lin J, Ma Z, et al. Potential roles of microRNAs and their target genes in human multiple myeloma. *Eur. J. Haematol*. 2017;99(2):178–185.
 287. Gao H, Wang H, Yang W. Identification of key genes and construction of microRNA–mRNA regulatory networks in multiple myeloma by integrated multiple GEO datasets using bioinformatics analysis. *Int. J. Hematol*. 2017;
 288. Morelli E, Leone E, Cantafio MEG, et al. Selective targeting of IRF4 by synthetic microRNA-125b-5p mimics induces anti-multiple myeloma activity in vitro and in vivo. *Leukemia*. 2015;29(11):2173–2183.
 289. Leone E, Morelli E, Di Martino MT, et al. Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2013;19(8):2096–2106.

290. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(17):7904–7909.
291. Di Martino MT, Gullà A, Cantafio MEG, et al. In Vitro and in Vivo Anti-tumor Activity of miR-221/222 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Oncotarget.* 2013;4(2):242–255.
292. Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Dereglulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia.* 2010;24(3):629–637.
293. Amodio N, Stamato MA, Gullà AM, et al. Therapeutic Targeting of miR-29b/HDAC4 Epigenetic Loop in Multiple Myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 2016;15(6):1364–1375.
294. Murray MY, Rushworth SA, Zaitseva L, Bowles KM, MacEwan DJ. Attenuation of dexamethasone-induced cell death in multiple myeloma is mediated by miR-125b expression. *Cell Cycle.* 2013;12(13):2144–2153.
295. Yamamoto T, Kosaka N, Hattori Y, Ochiya T. A Challenge to Aging Society by microRNA in Extracellular Vesicles: microRNA in Extracellular Vesicles as Promising Biomarkers and Novel Therapeutic Targets in Multiple Myeloma. *J. Clin. Med.* 2018;7(3):55.
296. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, et al. Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Int. J. Cancer.* 2017;140(2):400–410.
297. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, et al. Quantitative Superresolution Microscopy Reveals Differences in Nuclear DNA Organization of Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *J. Cell. Biochem.* 2015;116(5):704–710.
298. Wu P, Li T, Li R, et al. 3D genome of multiple myeloma reveals spatial genome disorganization associated with copy number variations. *Nat. Commun.* 2017;8:.
299. Pawlyn C, Kaiser MF, Heuck C, et al. The spectrum and clinical impact of epigenetic modifier mutations in myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2016;22(23):5783–5794.
300. Mithraprabhu S, Kalff A, Chow A, Khong T, Spencer A. Dysregulated Class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics.* 2014;9(11):1511–1520.
301. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science.* 2009;325(5942):834–840.
302. Ohguchi H, Hideshima T, Bhasin MK, et al. The KDM3A–KLF2–IRF4 axis maintains myeloma cell survival. *Nat. Commun.* 2016;7:10258.
303. Wei X, Calvo-Vidal MN, Chen S, et al. Germline mutations in lysine specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A) confer susceptibility to multiple myeloma. *Cancer Res.* 2018;canres.1900.2017.
304. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin. Cancer Biol.* 2017;
305. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature.* 2011;471(7339):467–472.
306. Oyer J, Huang X, Zheng Y, et al. Point mutation E1099K in MMSET/NSD2 enhances its methyltransferase activity and leads to altered global chromatin methylation in lymphoid malignancies. *Leukemia.* 2014;28(1):198–201.
307. Kuo AJ, Cheung P, Chen K, et al. NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Mol. Cell.* 2011;44(4):609–620.
308. Marango J, Shimoyama M, Nishio H, et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood.* 2008;111(6):3145–3154.
309. Min D-J, Ezponda T, Kim M, et al. MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia.* 2013;27(3):.
310. Hajdu I, Ciccica A, Lewis SM, Elledge SJ. Wolf–Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(32):13130–13134.
311. Shah MY, Martinez-Garcia E, Phillip JM, et al. MMSET/WHSC1 enhances DNA damage repair leading to an increase in resistance to chemotherapeutic agents. *Oncogene.* 2016;
312. Ezponda T, Dupéré-Richer D, Will CM, et al. UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. *Cell Rep.* 2017;21(3):628–640.

313. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase, UTX, in human cancer. *Nat. Genet.* 2009;41(5):521–523.
314. Van der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics.* 2014;9(5):658–668.
315. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood.* 2002;99(5):1745–1757.
316. Kalushkova A, Fryknäs M, Lemaire M, et al. Polycomb Target Genes Are Silenced in Multiple Myeloma. *PLoS ONE.* 2010;5(7):e11483.
317. Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J.* 2017;7(3):e549.
318. Agarwal P, Alzrigat M, Párraga AA, et al. Genome-wide profiling of histone H3 lysine 27 and lysine 4 trimethylation in multiple myeloma reveals the importance of Polycomb gene targeting and highlights EZH2 as a potential therapeutic target. *Oncotarget.* 2016;7(6):6809.
319. Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene.* 2005;24(41):6269–6280.
320. Croonquist PA. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. *Blood.* 2003;102(7):2581–2592.
321. Nara M, Teshima K, Watanabe A, et al. Bortezomib Reduces the Tumorigenicity of Multiple Myeloma via Downregulation of Upregulated Targets in Clonogenic Side Population Cells. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e56954.
322. Hernando H, Gelato KA, Lesche R, et al. EZH2 Inhibition Blocks Multiple Myeloma Cell Growth through Upregulation of Epithelial Tumor Suppressor Genes. *Mol. Cancer Ther.* 2016;15(2):287–298.
323. Alzrigat M, Párraga AA, Agarwal P, et al. EZH2 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *Oncotarget.* 2016;
324. Rizq O, Mimura N, Oshima M, et al. Dual inhibition of EZH2 and EZH1 sensitizes PRC2-dependent tumors to proteasome inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2017;clincanres.2735.2016.
325. Zhao F, Chen Y, Zeng L, et al. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;646(1–3):1–11.
326. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.* 2009;8(6):1579–1588.
327. Xie Z, Bi C, Cheong LL, et al. Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e21583.
328. Bi C, Chung T-H, Huang G, et al. Genome-wide pharmacologic unmasking identifies tumor suppressive microRNAs in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(28):.
329. Zhang W, Wang YE, Zhang Y, et al. Global Epigenetic Regulation of MicroRNAs in Multiple Myeloma. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e110973.
330. Adamik J, Jin S, Sun Q, et al. EZH2 or HDAC1 Inhibition Reverses Multiple Myeloma–Induced Epigenetic Suppression of Osteoblast Differentiation. *Mol. Cancer Res.* 2017;15(4):405–417.
331. Fang C, Qiao Y, Mun SH, et al. Cutting Edge: EZH2 Promotes Osteoclastogenesis by Epigenetic Silencing of the Negative Regulator IRF8. *J. Immunol.* 2016;196(11):4452–4456.
332. Moreaux J, Klein B, Bataille R, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica.* 2011;96(4):574–582.
333. Jourdan M, Mahtouk K, Veyrone J, et al. Delineation of the roles of paracrine and autocrine interleukin-6 (IL-6) in myeloma cell lines in survival versus cell cycle. A possible model for the cooperation of myeloma cell growth factors. 8.
334. Cives M, Simone V, Brunetti O, Longo V, Silvestris F. Novel lenalidomide-based combinations for treatment of multiple myeloma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013;85(1):9–20.

335. Guirguis AA, Ebert BL. Lenalidomide: deciphering mechanisms of action in myeloma, myelodysplastic syndrome and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015;37:61–67.
336. Fecteau J-F, Corral LG, Ghia EM, et al. Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21WAF1/Cip1-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood.* 2014;124(10):1637–1644.
337. Escoubet-Lozach L, Lin I-L, Jensen-Pergakes K, et al. Pomalidomide and Lenalidomide Induce p21WAF-1 Expression in Both Lymphoma and Multiple Myeloma through a LSD1-Mediated Epigenetic Mechanism. *Cancer Res.* 2009;69(18):7347–7356.
338. Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood.* 2014;124(4):536–545.
339. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, et al. Rate of CRL4CRBN substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4. *Blood Cancer J.* 2015;5(10):e354.
340. Yang DY, Ren JH, Guo XN, et al. Lenalidomide affect expression level of cereblon protein in multiple myeloma cell line RPMI8226. *Genet. Mol. Res.* 2015;7.
341. Sebastian S, Zhu YX, Braggio E, et al. Multiple myeloma cells capacity to decompose H₂O₂ determines lenalidomide sensitivity. *Blood.* 2016;blood–2016.
342. Franssen LE, Nijhof IS, Couto S, et al. Cereblon loss and up-regulation of c-Myc are associated with lenalidomide resistance in multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2018;haematol.2017.186601.
343. KAWANO Y, FUJIWARA S, WADA N, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int. J. Oncol.* 2012;41(3):876–884.
344. Bhutani M, Zhang Q, Friend R, et al. Investigation of a gene signature to predict response to immunomodulatory derivatives for patients with multiple myeloma: an exploratory, retrospective study using microarray datasets from prospective clinical trials. *Lancet Haematol.* 2017;4(9):e443–e451.
345. Zhu YX, Yin H, Bruins LA, et al. RNA interference screening identifies lenalidomide sensitizers in multiple myeloma, including RSK2. *Blood.* 2015;125(3):483–491.
346. Dolloff NG. Emerging Therapeutic Strategies for Overcoming Proteasome Inhibitor Resistance. *Adv. Cancer Res.* 2015;127:191–226.
347. Wallington-Beddoe CT, Sobieraj-Teague M, Kuss BJ, Pitson SM. Resistance to proteasome inhibitors and other targeted therapies in myeloma. *Br. J. Haematol.* 2018;
348. Kervoëlen C. La dexaméthasone dans le myélome multiple : étude des mécanismes de sensibilité et impact de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie sur la réponse. 2015;
349. Kervoëlen C, Ménoret E, Gomez-Bougie P, et al. Dexamethasone-induced cell death is restricted to specific molecular subgroups of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(29):.
350. Moreaux J. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood.* 2004;103(8):3148–3157.
351. Gourzones-Dmitriev C, Kassambara A, Sahota S, et al. DNA repair pathways in human multiple myeloma. *Cell Cycle.* 2013;12(17):2760–2773.
352. Spanswick VJ. Repair of DNA interstrand crosslinks as a mechanism of clinical resistance to melphalan in multiple myeloma. *Blood.* 2002;100(1):224–229.
353. Chen Q. The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 2005;106(2):698–705.
354. Xie J, Zhang L, Li M, et al. Functional analysis of the involvement of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in the resistance to melphalan in multiple myeloma. *BMC Cancer.* 2014;14:11.
355. Sousa MML, Zub KA, Aas PA, et al. An Inverse Switch in DNA Base Excision and Strand Break Repair Contributes to Melphalan Resistance in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE.* 2013;8(2):.
356. Szalat R, Samur MK, Fulciniti M, et al. Nucleotide excision repair is a potential therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;
357. Surget S, Lemieux-Blanchard E, Maïga S, et al. Bendamustine and melphalan kill myeloma cells similarly through reactive oxygen species production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other. *Leuk. Lymphoma.* 2014;55(9):2165–2173.

358. Zub KA, de Sousa MML, Sarno A, et al. Modulation of Cell Metabolic Pathways and Oxidative Stress Signaling Contribute to Acquired Melphalan Resistance in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE*. 2015;10(3):.
359. Viziteu E, Klein B, Basbous J, et al. RECQ1 helicase is involved in replication stress survival and drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2104–2113.
360. Hazlehurst LA, Enkemann SA, Beam CA, et al. Genotypic and Phenotypic Comparisons of de Novo and Acquired Melphalan Resistance in an Isogenic Multiple Myeloma Cell Line Model. 8.
361. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clin. Proc.* 2013;88(4):360–376.
362. Zamagni E, Tacchetti P, Pantani L, Cavo M. Anti-CD38 and anti-SLAMF7: the future of myeloma immunotherapy. *Expert Rev. Hematol.* 2018;11(5):423–435.
363. Varga C, Maglio M, Ghobrial IM, Richardson PG. Current use of monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2018;
364. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384–394.
365. Taniwaki M, Yoshida M, Matsumoto Y, et al. ELOTUZUMAB FOR THE TREATMENT OF RELAPSED OR REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA, WITH SPECIAL REFERENCE TO ITS MODES OF ACTION AND SLAMF7 SIGNALING. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018;10(1):e2018014.
366. Nijhof IS, Groen RWJ, Noort WA, et al. Preclinical Evidence for the Therapeutic Potential of CD38-Targeted Immuno-Chemotherapy in Multiple Myeloma Patients Refractory to Lenalidomide and Bortezomib. *Clin. Cancer Res.* 2015;21(12):2802–2810.
367. Köhler M, Greil C, Hudecek M, et al. Current developments in immunotherapy in the treatment of multiple myeloma: Immunotherapy in Multiple Myeloma. *Cancer*. 2018;124(10):2075–2085.
368. Sherbenou DW, Mark TM, Forsberg P. Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma: A New Wave of the Future. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(9):545–554.
369. Boussi L, Niesvizky R. Advances in immunotherapy in multiple myeloma: *Curr. Opin. Oncol.* 2017;29(6):460–466.
370. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*. 2018;32(2):252–262.
371. Nijhof IS, van de Donk NWCJ, Zweegman S, Lokhorst HM. Current and New Therapeutic Strategies for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: An Update. *Drugs*. 2018;78(1):19–37.
372. Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(3):443–448.
373. D'Agostino M, Salvini M, Palumbo A, Larocca A, Gay F. Novel investigational drugs active as single agents in multiple myeloma. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2017;26(6):699–711.
374. Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, et al. Epigenetic Modulating Agents as a New Therapeutic Approach in Multiple Myeloma. *Cancers*. 2013;5(4):430–461.
375. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br. J. Cancer*. 2013;109(3):676–685.
376. Moreaux J, Bruyer A, Veyrune J-L, et al. DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br. J. Haematol.* 2014;164(4):613–616.
377. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Development of Gene Expression-Based Score to Predict Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to DNA Methylation Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 2012;11(12):2685–2692.
378. Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, et al. Characterization of the EZH2-MMSET Histone Methyltransferase Regulatory Axis in Cancer. *Mol. Cell*. 2013;49(1):80–93.
379. Popovic R, Martinez-Garcia E, Giannopoulou EG, et al. Histone methyltransferase MMSET/NSD2 alters EZH2 binding and reprograms the myeloma epigenome through global and focal changes in H3K36 and H3K27 methylation. *PLoS Genet.* 2014;10(9):e1004566.

380. Dimopoulos K, Søgaard Helbo A, Fibiger Munch-Petersen H, et al. Dual inhibition of DNMTs and EZH2 can overcome both intrinsic and acquired resistance of myeloma cells to IMiDs in a cereblon-independent manner. *Mol. Oncol.* 2018;12(2):180–195.
381. Kikuchi J, Koyama D, Wada T, et al. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. *J. Clin. Invest.* 2015;125(12):4375–4390.
382. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* 2004;172(5):2731–2738.
383. Shay T, Jojic V, Zuk O, et al. Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013;110(8):2946–2951.
384. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature.* 2016;532(7600):512–516.
385. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, et al. Recapitulating adult human immune traits in laboratory mice by normalizing environment. *Nature.* 2016;532(7600):512–516.
386. Tao L, Reese TA. Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. *Trends Immunol.* 2017;38(3):181–193.
387. Reardon S. Dirty room-mates make lab mice more useful. *Nature.* 2016;532(7599):294–295.
388. Hasbold J, Corcoran LM, Tarlinton DM, Tangye SG, Hodgkin PD. Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* 2004;5(1):55–63.
389. Dai Z, Mentch SJ, Gao X, Nichenametla SN, Locasale JW. Methionine metabolism influences genomic architecture and gene expression through H3K4me3 peak width. *Nat. Commun.* 2018;9(1):.
390. Barwick BG, Scharer CD, Martinez RJ, et al. B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation. *Nat. Commun.* 2018;9:.
391. Coker WJ, Jeter A, Schade H, Kang Y. Plasma cell disorders in HIV-infected patients: epidemiology and molecular mechanisms. *Biomark. Res.* 2013;1(1):8.
392. Wu H, Deng Y, Feng Y, et al. Epigenetic regulation in B-cell maturation and its dysregulation in autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* 2018;
393. Malkiel S, Barlev AN, Atisha-Fregoso Y, Suurmond J, Diamond B. Plasma Cell Differentiation Pathways in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 2018;9:.
394. Pan-Hammarström Q, Abolhassani H, Hammarström L. Defects in plasma cell differentiation are associated with primary immunodeficiency in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018;141(4):1217–1219.
395. Cheung P, Vallania F, Warsinske HC, et al. Single-Cell Chromatin Modification Profiling Reveals Increased Epigenetic Variations with Aging. *Cell.* 2018;
396. van Dongen J, Nivard MG, Willemsen G, et al. Genetic and environmental influences interact with age and sex in shaping the human methylome. *Nat. Commun.* 2016;7:11115.
397. González-Calle V, Keane N, Braggio E, Fonseca R. Precision Medicine in Myeloma: Challenges in Defining an Actionable Approach. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(10):621–630.
398. Jain KK. Textbook of personalized medicine. New York: Humana Press; 2015.
399. Treppendahl MB, Kristensen LS, Grønbæk K. Predicting response to epigenetic therapy. *J. Clin. Invest.* 2014;124(1):47–55.
400. Bruyer A, Maes K, Herviou L, et al. DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment induces reprogramming of myeloma cells in the direction of normal plasma cells. *Br. J. Cancer.* 2018;118(8):1062–1073.
401. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, et al. Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell.* 2013;24(3):289–304.
402. Dunn J, Rao S. Epigenetics and immunotherapy: The current state of play. *Mol. Immunol.* 2017;87:227–239.
403. Gallagher SJ, Shklovskaya E, Hersey P. Epigenetic modulation in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2017;35:48–56.
404. Bugide S, Green MR, Wajapeyee N. Inhibition of Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) induces natural killer cell-mediated eradication of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;115(15):E3509–E3518.

405. He B, Xing S, Chen C, et al. CD8⁺ T Cells Utilize Highly Dynamic Enhancer Repertoires and Regulatory Circuitry in Response to Infections. *Immunity*. 2016;45(6):1341–1354.
406. Leslie LA, Younes A. Antibody-drug conjugates in hematologic malignancies. United States: 2013.
407. Tai Y-T, Mayes PA, Acharya C, et al. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(20):3128–3138.
408. Zheleznyak A, Shokeen M, Achilefu S. Nanotherapeutics for multiple myeloma. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2018;e1526.

Annexes

I. Article : Prediction of multiple myeloma cells sensitivity to DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment

Angelique Bruyer^{2§}, Ken Maes^{6§}, **Laurie Herviou**², Anja Seckinger^{4,5}, Alboukadel Kassambara^{1,2}, Thierry Rème^{1,2}, Nicolas Robert¹, Guilhem Requirand¹, Stéphanie Boireau¹, Jean-luc Veyrone^{1,2}, Laure Vincent⁷, Salahedine Bouhya⁷, Hartmut Goldschmidt^{4,5}, Karin Vanderkerken⁶, Dirk Hose^{4,5}, Bernard Klein^{1,2,3}, Elke De Bruyne^{6*}, Jerome Moreaux^{1,2,3*}

¹ Department of Biological Haematology, CHU Montpellier, Montpellier, France;

² Institute of Human Genetics, CNRS-UPR1142, Montpellier F-34396, France;

³ University of Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France;

⁴ Dept. of Internal Medicine V, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany;

⁵ National Center of Tumor Diseases, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany;

⁶ Laboratory of Hematology and Immunology, Myeloma Center Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium;

⁷ CHU Montpellier, Department of Clinical Hematology, Montpellier, France.

*These authors share last autorship.

§These authors share first autorship.

Résumé :

Le myélome multiple (MM) est la seconde hémopathie la plus commune. Des aberrations de modifications épigénétiques ont été rapportées dans le MM et pourrait être des cibles thérapeutiques prometteuses. Étant donné que le taux de réponse est généralement limité mais qu'il existe des réponses conséquentes, il est important d'identifier les patients qui pourraient bénéficier des thérapies épigénétiques ciblées. Parce que la combinaison HDACi et DNMTi est d'une potentielle valeur thérapeutique dans le MM, nous avons développé un score basé sur l'expression de gènes qui pourrait être utile dans le design d'essai clinique utilisant cette combinaison. Ce score prédit la sensibilité des cellules de MM à la combinaison HDACi/DNMTi. Une fort Combo-score chez les patients de MM correspond à un groupe de mauvais pronostic mais une plus forte sensibilité des cellules de MM au traitement HDACi/DNMTi par rapport à un faible Combo-score. De plus, nous avons étudié les changements transcriptionnels induit par le traitement HDACi/DNMTi. La combinaison des deux drogues épigénétiques provoque une perte d'expression d'IRF4 et MYC, et induit un programme transcriptionnel de plasmocytes matures normaux dans les lignées cellulaires de MM. Pour conclure, nous avons développé un score permettant la prédiction de la sensibilité des cellules primaires de MM à la combinaison HDACi/DNMTi. Nous avons également découvert que cette combinaison pourrait être bénéfique pour les patients de haut risque via le ciblage de la prolifération et l'induction de la maturation.

Publication dans le journal British Journal of Cancer en Mars 2018



ARTICLE

Translational Therapeutics

DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment induces reprogramming of myeloma cells in the direction of normal plasma cells

Angelique Bruyer¹, Ken Maes², Laurie Herviou¹, Alboukadel Kassambara^{1,3}, Anja Seckinger⁴, Guillaume Cartron^{5,6,7}, Thierry Rème^{1,3}, Nicolas Robert³, Guilhem Requirand³, Stéphanie Boireau³, Carsten Müller-Tidow⁴, Jean-luc Veyrone^{1,3}, Laure Vincent⁶, Salahedine Bouhya⁶, Hartmut Goldschmidt^{4,8}, Karin Vanderkerken², Dirk Hose⁴, Bernard Klein^{1,3,5}, Elke De Bruyne² and Jerome Moreaux^{1,3,5}

BACKGROUND: Multiple myeloma (MM) is the second most common hematologic malignancy. Aberrant epigenetic modifications have been reported in MM and could be promising therapeutic targets. As response rates are overall limited but deep responses occur, it is important to identify those patients who could indeed benefit from epigenetic-targeted therapy.

METHODS: Since HDACi and DNMTi combination have potential therapeutic value in MM, we aimed to build a GEP-based score that could be useful to design future epigenetic-targeted combination trials. In addition, we investigated the changes in GEP upon HDACi/DNMTi treatment.

RESULTS: We report a new gene expression-based score to predict MM cell sensitivity to the combination of DNMTi/HDACi. A high Combo score in MM patients identified a group with a worse overall survival but a higher sensitivity of their MM cells to DNMTi/HDACi therapy compared to a low Combo score. In addition, treatment with DNMTi/HDACi downregulated IRF4 and MYC expression and appeared to induce a mature BMPC plasma cell gene expression profile in myeloma cell lines.

CONCLUSION: In conclusion, we developed a score for the prediction of primary MM cell sensitivity to DNMTi/HDACi and found that this combination could be beneficial in high-risk patients by targeting proliferation and inducing maturation.

British Journal of Cancer (2018) 118:1062–1073; <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0025-x>

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a most often fatal neoplasia characterized by the accumulation of malignant plasma cells (MMCs) in the bone marrow (BM). The profile of DNA methylation in MM comprises genomic global hypomethylation and simultaneous promoter hypermethylation of known or potential tumor-suppressor genes^{1, 2}. Recently, hypermethylation of several potential suppressor genes was demonstrated to be associated with significantly shorter overall survival (OS)¹.

Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) and 5-azacytidine are both clinically used DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors (DNMTi) for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML)³. In MM, clinical trials are ongoing with DNMTi as monotherapy or combined with lenalidomide or dexamethasone⁴. Histone deacetylases (HDACs) also represent promising molecular targets for the treatment of different cancers, including MM^{5–15}. Romidepsin and Vorinostat (SAHA) are two HDAC inhibitors (HDACi) that have been approved by the Food and Drug

Administration (FDA) for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma¹⁶ and several pan-HDACi are currently evaluated in clinical trials in MM^{4, 14}. Combination of panobinostat/bortezomib/dexamethasone (PANORAMA) and of vorinostat/bortezomib (VANTAGE 088) have been tested in two large phase III clinical trials^{17, 18}. Results from the VANTAGE 088 trial showed that the association of vorinostat and bortezomib significantly prolonged progression-free survival (PFS) in patients with relapsed or refractory MM¹⁷. For the PANORAMA trial, re-evaluation of the results recently showed a significant improvement of the PFS when the pan-HDACi panobinostat was combined with bortezomib and dexamethasone in a prespecified subgroup of patients previously exposed to with both bortezomib and an immunomodulatory agent (IMiD) with relapsed MM resulted in a significant PFS improvement. In addition, the overall response rate was also higher: 59 vs 41%. The FDA and European Medicines Agency approved panobinostat only very recently in patients who have received at least two prior lines of therapy, including bortezomib and an IMiD^{19–21}. However, this

¹IGH, CNRS, Univ Montpellier, Montpellier, France; ²Laboratory of Hematology and Immunology, Myeloma Center Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium; ³Department of Biological Haematology, CHU Montpellier, Montpellier, France; ⁴Dept. of Internal Medicine V, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁵UFR de Médecine, Univ Montpellier, Montpellier, France; ⁶Department of Clinical Hematology, CHU Montpellier, Montpellier, France; ⁷Univ Montpellier, UMR CNRS 5235, Montpellier, France and ⁸National Center of Tumor Diseases, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

Correspondence: Jerome Moreaux (jerome.moreaux@igh.cnrs.fr)

These authors share first authorship: Angelique Bruyer, Ken Maes.

These authors contributed equally: Elke De Bruyne, Jerome Moreaux.

Received: 7 August 2017 Revised: 10 January 2018 Accepted: 15 January 2018

Published online: 2 March 2018

Table 1. Pathway enrichment analysis using Reactome of genes significantly overexpressed in decitabine/TSA-treated HMCLs

| Gene set name | k/K | # Genes in Gene Set (K) | # Genes in Overlap (k) | P-value | FDR q-value | Genes |
|---|--------|-------------------------|------------------------|---------|-------------|--|
| Interferon alpha/beta signaling (R) | 0.0069 | 67 | 18 | 0.0000 | 5.98E-13 | IFITM1, IFITM2, IFIT1, IFIT3, IFIT2, RSAD2, IFI27, EGR1, STAT1, XAF1, OASL, OAS1, OAS2, IRF7, IRF6, USP18, GBP2, MX1 |
| Interferon gamma signaling (R) | 0.0074 | 72 | 17 | 0.0000 | 1.52E-11 | TRIM22, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, CD44, HLA-DQB1, STAT1, HLA-DPB1, HLA-DRA, OASL, OAS1, OAS2, IRF7, IRF6, GBP2, GBP1 |
| Inflammatory bowel disease (IBD) (K) | 0.0068 | 66 | 13 | 0.0000 | 6.70E-08 | GATA3, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, STAT4, STAT1, HLA-DPB1, IL4R, HLA-DRA |
| Allograft rejection (K) | 0.0039 | 38 | 10 | 0.0000 | 2.37E-07 | PRF1, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Graft-versus-host disease (K) | 0.0043 | 42 | 10 | 0.0000 | 5.03E-07 | PRF1, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Asthma (K) | 0.0032 | 31 | 9 | 0.0000 | 5.03E-07 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Cell adhesion molecules (CAMs) (K) | 0.0148 | 144 | 16 | 0.0000 | 8.00E-07 | ALCAM, SDC4, SDC2, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, CDH1, NRCAM, SELL, HLA-DRA, CD6 |
| Antigen processing and presentation (K) | 0.0080 | 78 | 11 | 0.0000 | 1.02E-05 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HSPA1A, HSPA2, HLA-DRA |
| Intestinal immune network for IgA production (K) | 0.0049 | 48 | 9 | 0.0000 | 1.15E-05 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Systemic lupus erythematosus (K) | 0.0138 | 135 | 13 | 0.0000 | 5.28E-05 | C3, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HIST1H2AE, HIST1H2BG, HIST1H2BD, HLA-DRA |
| TCR signaling (R) | 0.0067 | 65 | 8 | 0.0000 | 8.54E-04 | PAG1, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| MHC class II antigen presentation (R) | 0.0091 | 89 | 9 | 0.0001 | 0.001 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Rheumatoid arthritis (K) | 0.0092 | 90 | 9 | 0.0001 | 0.001 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| Phagosome (K) | 0.0158 | 154 | 11 | 0.0002 | 0.003 | C3, HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPB1, CLEC7A, HLA-DRA |
| Costimulation by the CD28 family (R) | 0.0064 | 62 | 7 | 0.0002 | 0.003 | HLA-DQA1, HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DRA |
| IL12 signaling mediated by STAT4 (N) | 0.0031 | 30 | 5 | 0.0003 | 0.005 | PRF1, HLA-DRB1, STAT4, HLA-DRA, ETV5 |
| Validated transcriptional targets of TAp63 isoforms (N) | 0.0050 | 49 | 6 | 0.0003 | 0.006 | EGR2, CDKN1A, MFGE8, NQO1, IGFBP3, PMAIP1 |
| T-cell activation (P) | 0.0083 | 81 | 7 | 0.0009 | 0.01 | HLA-DQA1, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DMB, ITPR1, HLA-DRA, PIK3CD |
| Direct p53 effectors (N) | 0.0135 | 132 | 9 | 0.0009 | 0.01 | ATF3, TGFA, SFN, CDKN1A, DUSP1, HSPA1A, CD82, IGFBP3, PMAIP1 |
| ECM-receptor interaction (K) | 0.0089 | 87 | 7 | 0.0013 | 0.01 | SDC4, FN1, COL1A1, COL1A2, CD44, ITGA7, LAMB3 |
| IL4-mediated signaling events (N) | 0.0066 | 64 | 6 | 0.0013 | 0.02 | EGR2, PARP14, COL1A1, COL1A2, IL13RA2, IL4R |
| Proteoglycans in cancer (K) | 0.0209 | 204 | 11 | 0.0016 | 0.02 | CBLB, ANK3, SDC4, SDC2, FN1, CDKN1A, CD44, FLNB, ITPR1, HPSE, PIK3CD |
| p53 signaling pathway (K) | 0.0070 | 68 | 6 | 0.0018 | 0.02 | SFN, CDKN1A, CD82, SESN3, IGFBP3, PMAIP1 |
| Calcineurin-regulated NFAT-dependent transcription in lymphocytes (N) | 0.0048 | 47 | 5 | 0.0020 | 0.02 | CBLB, GATA3, EGR1, EGR2, GBP3 |
| Apoptotic execution phase (R) | 0.0048 | 47 | 5 | 0.0020 | 0.02 | GSN, TJP2, CDH1, H1FO, DSP |
| Proteoglycan syndecan-mediated signaling events (N) | 0.0004 | 4 | 2 | 0.0026 | 0.03 | SDC4, SDC2 |
| ErbB1 downstream signaling (N) | 0.0103 | 100 | 7 | 0.0028 | 0.03 | NCKAP1, EPS8, SFN, EGR1, DUSP1, CHN2, STAT1 |

Gene annotation and networks were generated with the Reactome Functional Interaction Cytoscape plugin (<http://www.cytoscape.org/>)

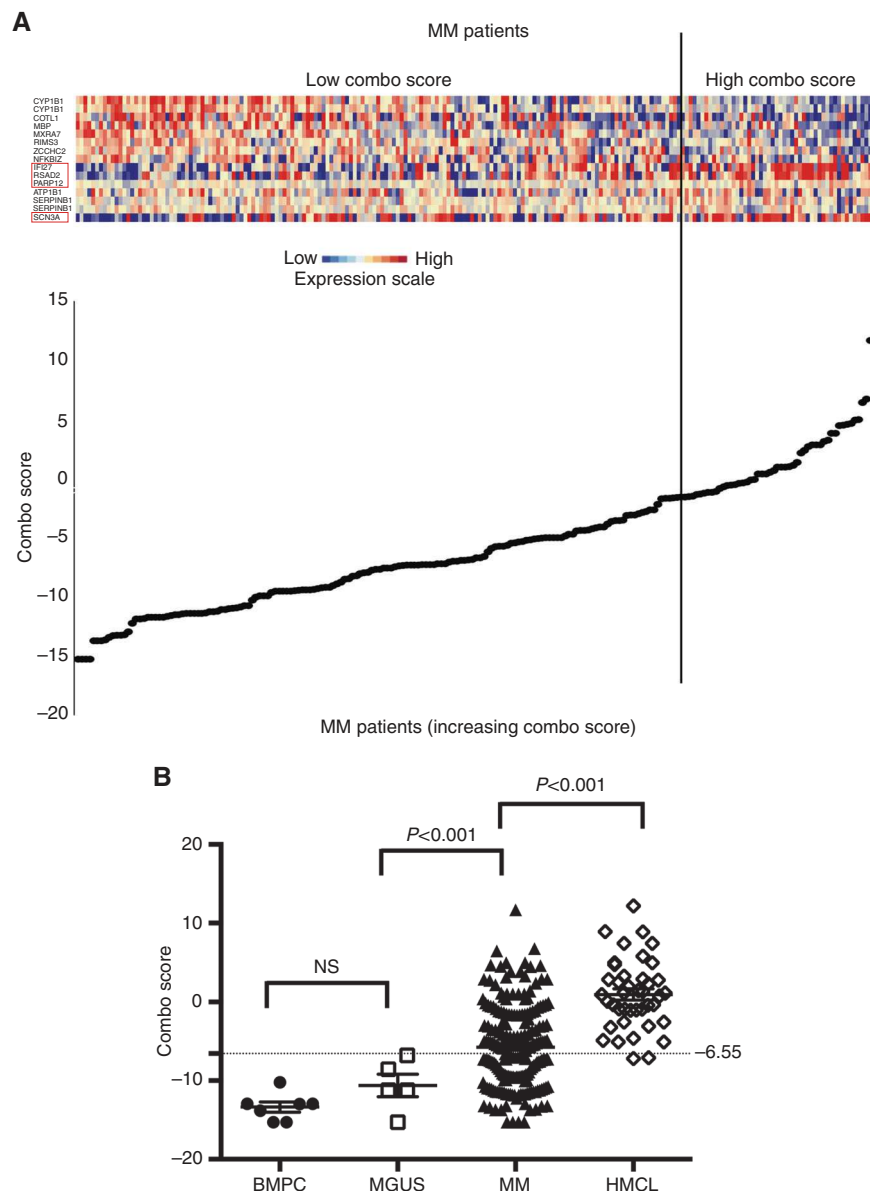


Fig. 1 Clustergram of the signals of the 15 genes used to build the Combo score in myeloma cells of 206 previously untreated patients. **a** The signals of the 15 probe sets in MMCs of 206 patients, ordered by increasing Combo score, are displayed from low (deep blue) to high (deep red) expression. Among the 15 probe sets, the genes associated with a poor outcome are identified by a red frame. **b** Combo score in normal bone marrow plasma cells ($n = 7$), in premalignant plasma cells of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS, $n = 5$), in multiple myeloma cells of patients with intramedullary MM ($n = 206$), and in human myeloma cell lines ($n = 40$)

combination is associated with high toxicity, including thrombocytopenia (67%), lymphopenia (53%), diarrhoea (26%), and asthenia or fatigue (24%). Several other ongoing trials are evaluating panobinostat in combination with other partners (both standard-of-care agents and targeted therapies) for newly diagnosed or relapsing/refractory MM patients¹⁹.

Recently, Matthews et al. investigated the potential of combining panobinostat with a BH3-only mimetic (ABT-737), recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL), or 5-azacitidine, in vivo, using the Vk*MYC transgenic MM mouse model²². HDACi/rhTRAIL or HDACi/ABT-737 combinations are associated with important drug-induced toxicity in vivo. In contrast, HDACi and DNMTi demonstrated a significant reduction of tumor load and prolonged survival of mice without observing major toxicity^{22, 23}. In patients with solid cancers or advanced

hematological malignancies, HDACi and DNMTi combination was well tolerated²⁴ and suggested promising activity in MDS, AML^{16, 24, 25}, and refractory advanced non-small cell lung cancer²⁶. Together, these observations suggest that targeting the aberrant tumor-specific epigenetic program simultaneously with DNMTi and HDACi treatment could have therapeutic interest in MM. However, identification of biomarkers predictive for sensitivity of MMCs to epigenetic therapies remains an important objective to improve clinical trials. We recently reported gene expression (gene expression profiling (GEP))-based risk scores to predict the sensitivity of MMCs to DNMTi^{27, 28} and HDACi²⁸. Since HDACi and DNMTi combination have potential therapeutic value in MM, we aimed to build a GEP-based score that could be useful to design future epigenetic-targeted combination trials. In addition, we investigated the changes in GEP upon HDACi/DNMTi treatment in

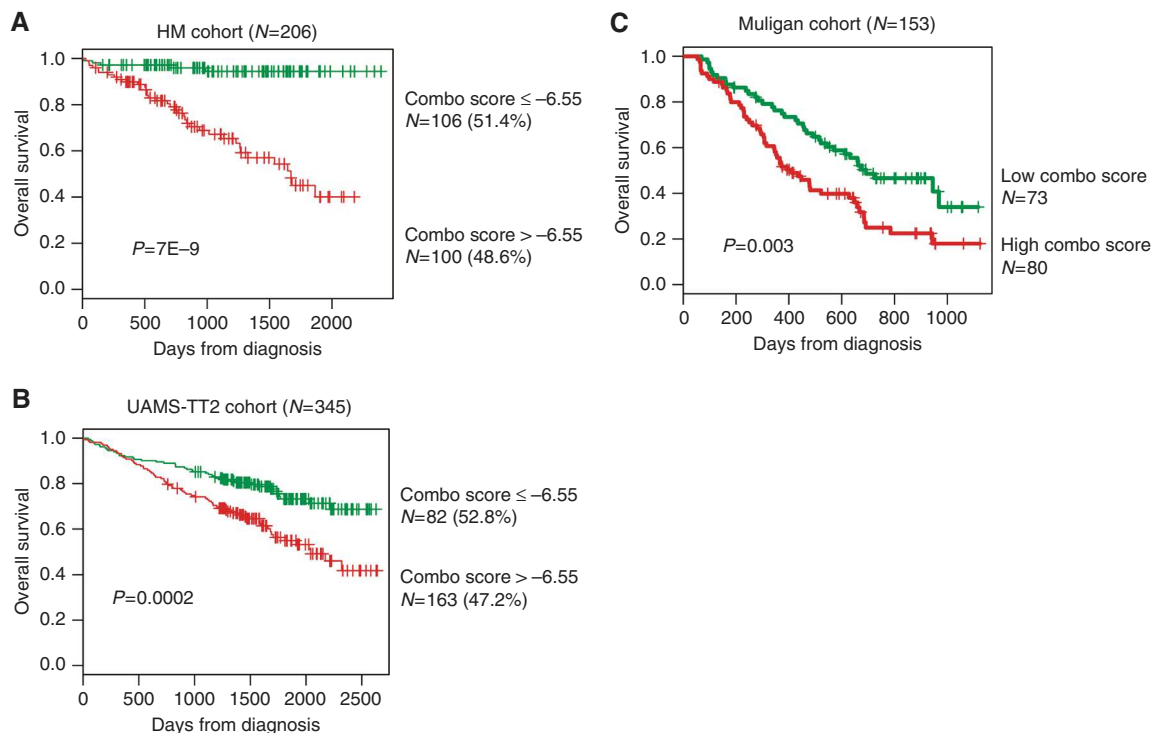


Fig. 2 Prognostic value of Combo score in multiple myeloma. **a** Patients of the HM cohort were ranked according to increased Combo score and a maximum difference in OS was obtained with Combo score = -6.55 splitting patients into high-risk (48.6%) and low-risk (51.4%) groups. **b** The prognostic value of Combo score was validated using an independent cohort of 345 patients from UAMS treated with TT2 therapy (UAMS-TT2 cohort). The parameters to compute the Combo score of patients of UAMS-TT2 cohort and the proportions delineating the two prognostic groups were those defined in the HM cohort. **c** The prognostic value of Combo score was validated in a cohort of 188 patients at relapse treated with bortezomib monotherapy (Mulligan cohort)⁴⁰

order to identify mechanisms underlying the enhanced anti-MM activity using human MM cell lines and the 5T33MM model.

MATERIALS AND METHODS

Human myeloma cell lines (HMCLs) and primary MM cells of patients (N = 40) were obtained as previously described^{29–34} or purchased from DSMZ and American Type Culture Collection. Microarray data are deposited in the ArrayExpress public database (accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088). Patients presenting with previously untreated MM (N = 206) or monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS; N = 5) at the university hospitals of Heidelberg and Montpellier, as well as 7 healthy donors have been included in the study approved by the ethics committee of Montpellier and Heidelberg after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Clinical parameters and treatment regimens of the MM patients included in the Heidelberg–Montpellier (HM) cohort were previously described³⁵. GEP of purified MMCs was assayed using Affymetrix U133 2.0 plus microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as described³⁶ and data normalized using the MAS5 Affymetrix algorithm. The .CEL and MAS5 files are deposited in the ArrayExpress public database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), under accession number E-MTAB-362. We also used publicly available MAS5 normalized GEP data (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession number GSE2658) from purified MMCs of a cohort of 345 patients treated with total therapy 2 protocol (UAMS-TT2 cohort) at the University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, USA)³⁷. t(4;14) translocation was evaluated using *MMSET* spike expression³⁸ and del17p13 surrogated by *TP53* probe set signal³⁹ for UAMS-TT2

patients. We also used Affymetrix data of 152 relapsed MM patients subsequently treated with bortezomib (GSE9782) from the study of Mulligan et al.⁴⁰ Gene expression data of normal memory B cells (MB), preplasmablasts, plasmablasts, and early plasma cells^{41, 42} are deposited in the ArrayExpress databases under accession numbers E-MEXP-2360 and E-MEXP-3034.

Identification of genes deregulated by the HDACi/DNMTi combination

HMCLs (XG-5, XG-6, XG-7, XG-12, XG-19, XG-20, OPM2, RPMI8226, and LP1) were treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ decitabine (Sigma, St Louis, MO) for 7 days in RPMI 1640, 10% fetal bovine serum supplemented with interleukin (IL)-6 for IL-6-dependent HMCLs. During the last 24 h, 0.33 $\mu\text{mol/L}$ trichostatin A (TSA; Sigma) was added as described by Heller et al.⁴³ Whole-genome GEP was assayed with Affymetrix U133 2.0 plus microarrays (Affymetrix).

C57BL/KaLwRij mice were purchased from Harlan CPB (Horst, The Netherlands). Mice were housed according to the conditions approved by the Ethical Committee for Animal Experiments of the Vrije Universiteit Brussel (license no. LA1230281). At day 0, naive C57BL/KaLwRij mice were injected with 5×10^5 5T33MM cells. After establishment of disease (day 16), mice were treated with the combination of decitabine (0.2 mg/kg) (intraperitoneal injection, daily) and quisinostat (1.5 mg/kg) (subcutaneous injection, once every other day) or vehicle. Compounds were kindly provided by Johnson & Johnson (Beerse, Belgium) and used as a filter-sterilized 10% hydroxypropyl-cyclodextran suspension. After 5 days, mice were sacrificed and the bone marrow was isolated from hind legs. For mRNA analysis, tumor cells were purified by depletion of CD11b+ contaminating cells. Cytospins were made before and after depletion to count the percentage of plasma cells as described previously²³. Samples with >95% plasma cells (N = 4

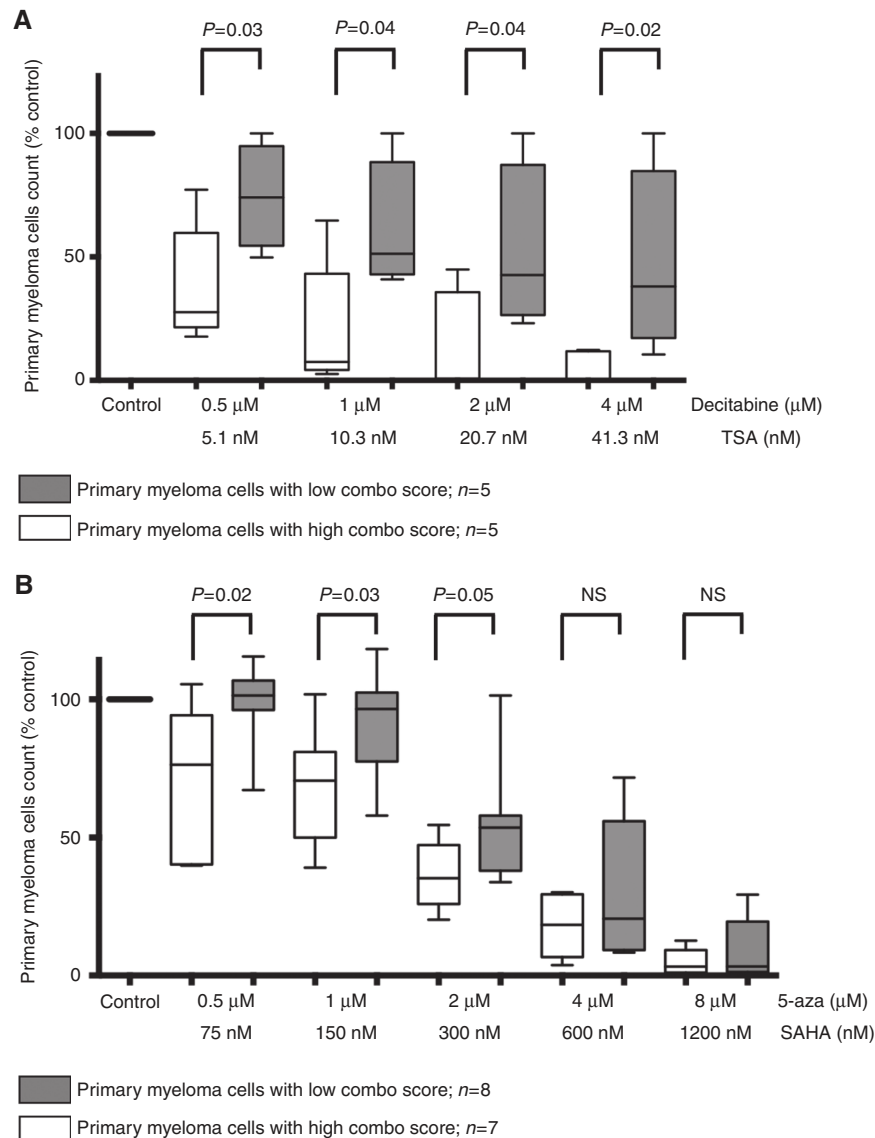


Fig. 3 Combo score predicts for sensitivity of primary myeloma cells of patients to HDACi/DNMTi combined treatment. **a** Mononuclear cells from tumor samples of 10 patients with MM were cultured for 4 days in the presence of IL-6 (2 ng/ml) with or without graded decitabine and TSA concentrations. At day 4 of culture, the count of viable CD138⁺ MMCs was determined using flow cytometry. The gray columns represent the mean \pm SD of primary myeloma cell counts (expressed as the percentage of the count without adding drugs) of the five patients with a low Combo score and the white columns that of the five patients with a high Combo score. **b** 5-Azacitidine and SAHA combination was also investigated using samples of 15 myeloma patients. The gray columns represent the mean \pm SD of primary myeloma cell counts (expressed as the percentage of the count without adding drugs) of the 8 patients with a low Combo score and the white columns that of the 7 patients with a high Combo score

in each group) were used for RNA isolation using the RNeasy Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). RNA was further processed and hybridized to the Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as previously described^{23, 27}. Microarray data are available at ArrayExpress database (Accession number: E-MTAB-3178).

Sensitivity of primary myeloma cells to HDACi/DNMTi combination Primary myeloma cells of 10 patients were cultured with or without graded concentrations of decitabine and TSA. Primary myeloma cells of 15 patients were cultured with or without graded concentrations of 5-azacitidine (Sigma) and vorinostat (SAHA) (Sigma). MMC cytotoxicity was evaluated using anti-CD138-PE monoclonal antibody (mAb; Immunotech, Marseille, France) as described^{27, 44}. Results were analyzed using GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Statistical analysis

Gene expression data were analyzed using the SAM (Significance Analysis of Microarrays) software⁴⁵ as published³⁸. The statistical significance of differences in OS between groups of patients was calculated by log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method. All these analyses have been done with R.2.10.1 (<http://www.r-project.org/>), bioconductor version 2.5 and Genomicscape (<http://www.genomicscape.com>)⁴⁶. A histone acetylation/DNA methylation risk score (termed Combo score) was built using our previously published methodology with the decitabine/HDACi combination deregulated prognostic genes^{27, 28}. Briefly, the Combo score was constructed as the sum of the Cox model beta coefficients of each of the decitabine/HDACi combination deregulated genes with a prognostic value, weighted by ± 1 according to the patient MMC signal above or below the probeset maxstat value^{27, 28, 38}. Significantly

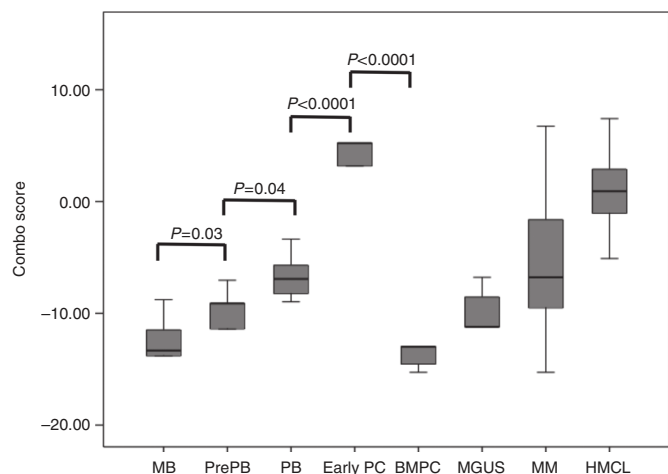


Fig. 4 Combo score in normal plasma cell differentiation. Combo score in normal memory B cells (MB, $n = 5$), normal preplasmablasts (PrePB, $n = 5$), normal plasmablasts (PB, $n = 5$), normal early plasma cells (Early PC, $n = 5$), normal bone marrow plasma cells ($n = 5$), in premalignant plasma cells of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS, $n = 5$), multiple myeloma cells of patients with intramedullary MM ($n = 206$), and human myeloma cell lines ($n = 40$)

enriched pathways were identified using Reactome functional interaction map. Murine orthologs of HMCL genes were identified using OrthoRetriever tool (<https://lighthouse.ucsf.edu/orthoretriever/>). Gene set enrichment analysis was carried out by computing overlaps with canonical pathways and gene ontology gene sets obtained from the Broad Institute⁴⁷. Clustering was performed and visualized with Cluster and TreeView⁴⁸.

Real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

RNA was converted to cDNA using the Qiagen's QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The assays-on-demand primers and probes and the TaqMan Universal Master Mix were used according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The measurement of gene expression was performed using the Roche LC480 Sequence Detection System. For each primer, serial dilutions of standard cDNA were amplified to create a standard curve, and values of unknown samples were estimated relative to this standard curve in order to assess PCR efficiency. Ct values were obtained for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the respective genes of interest during the log phase of the cycle. Gene expression was normalized to that of GAPDH ($\Delta Ct = Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ GAPDH}$) and compared with the values obtained for a known positive control using the following formula: $100/2^{\Delta\Delta Ct}$ where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ unknown} - \Delta Ct \text{ positive control}$.

Immunophenotypic analyses

For immunophenotypic analysis, the Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) was used for intracellular staining of IRF-4 (clone IRF4.3E4 from BioLegend (San Diego, CA, USA)) or MYC (clone #12189, Cell Signaling). Flow cytometric analysis was performed with a FORTRESSA cytometer using FACSDiva 6.1 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The Kaluza software (Beckman Coulter) was used for data analysis. The fluorescence intensity of the cell populations was quantified using the staining index formula: [mean fluorescence intensity (MFI) obtained for a given mAb minus MFI obtained with a control mAb]/[2 times the standard deviation of the MFI obtained with the same control mAb]⁴⁹.

RESULTS

Identification of genes with deregulated expression by decitabine and HDACi combination and associated with a prognostic value in MM

Using gene expression microarrays, we analyzed gene expression changes in HMCLs after (Supplementary Table S1) combination treatment with sub-lethal doses of decitabine and TSA⁴³. HDACi/DNMTi treatment resulted in a significant upregulation of 375 genes (SAM supervised paired analysis, false discovery rate (FDR) < 5%; Supplementary Table S2) without significant downregulated genes. Reactome analysis revealed a significant enrichment of genes involved in immunological and inflammatory diseases, p53 and TAp63 anti-oncogenic signaling pathways, and cell-to-cell communication signals (Table 1). We also used the syngeneic, immunocompetent 5T33MM to study the in vivo transcriptional response of MM cells to HDACi/DNMTi combination as previously described²³. Similar to the HMCL, the sub-lethal doses showing minimal effects on BM plasmacytosis ensuring the yield of good-quality RNA were used (data not shown). In vivo HDACi/DNMTi treatment resulted in a significant deregulation of 415 genes (SAM supervised paired analysis, FDR < 5%; Supplementary Table S3). To identify genes commonly deregulated by the combination in vitro and in vivo, we compared results obtained with the HMCLs and the 5T33MM model. A list of 52 common HDACi/DNMTi deregulated genes was identified (Supplementary Table S4). Using Maxstat R function and Benjamini-Hochberg multiple testing correction³⁸, we then investigated the association between the expression levels of these 52 genes and patient prognosis in order to find genes regulated by HDAC and DNMT that could have an important function in MM pathophysiology. Among the 52 genes, 4 genes had a bad prognostic value and 11 a good one in our cohort of 206 newly diagnosed patients (HM cohort) (Supplementary Table S5). The prognostic information of HDACi/DNMTi combination deregulated genes was gathered in a Combo score as described in the Materials and methods section (Fig. 1a). Combo score values in normal, premalignant, or malignant plasma cells are displayed in Fig. 1b. The Combo score value was not significantly different in plasma cells from MGUS patients compared to normal BM plasma cells (BMPCs). However, MMCS of patients have a significantly higher Combo score than plasma cells from MGUS patients ($P < 0.001$) and HMCLs had the highest score ($P < 0.001$) (Fig. 1b). Investigating the Combo score in the eight groups of the molecular classification of MM, the Combo score was significantly higher in the proliferation and hyperdiploid subgroups ($P < 0.001$, $P = 0.001$, and $P < 0.001$, respectively) and significantly lower in the low bone disease, CD2, and MY subgroups ($P = 0.02$, $P = 0.003$, and $P = 0.002$, respectively)⁵⁰ (Supplementary Figure S1).

Evaluation of the prognostic significance of the Combo score

Using a maxstat analysis for OS⁵¹, the Combo score was significantly associated with high-risk myeloma in the two independent cohorts of newly diagnosed patients, namely, HM and UAMS-TT2 (Fig. 2a, b). Maxstat statistic test split the HM patient cohort into two groups: a high-risk group of 48.6 % patients (Combo score > -6.55) with a 54.9 months median OS and a low-risk group of 51.4% patients (Combo score ≤ -6.55) with not reached median survival ($P = 7E-9$; Fig. 2a). In the UAMS-TT2 cohort, a Combo score > -6.55 is also associated with a high risk ($P = 0.002$; Fig. 2b) in 47.2% of the patients. Next, we investigated whether the Combo score could also have a prognostic value in relapsed patients. Using the Mulligan cohort, including patients treated with bortezomib monotherapy after relapse, the Combo score kept prognostic value ($P = 0.003$; Fig. 2c).

The prognostic value of the Combo score was then compared to usual prognostic factors ($\beta 2M$, ISS, t(4;14), and del17p) and the published GEP-based risk scores, i.e., UAMS-HRS⁵², IFM score⁵³, RS score⁵⁴, proliferation scores, GPI³⁵, and scores surrogating

Table 2. Top gene set significantly enriched in untreated compared to MMC ($n=9$) treated by DNMTi/HDACi combination

| Gene set name | Genes in gene set (K) | Description | Genes in overlap (k) | k/K | P-value | FDR q -value |
|--|-----------------------|---|----------------------|--------|----------|----------------|
| HELLER_HDAC_TARGETS_SILENCED_BY_METHYLATION_UP | 461 | Genes upregulated in multiple myeloma (MM) cell lines treated with both decitabine [PubChem=451668] TSA [PubChem=5562] | 49 | 0.1063 | 8.57E-31 | 4.06E-27 |
| SENESE_HDAC3_TARGETS_DN | 536 | Genes downregulated in U2OS cells (osteosarcoma) upon knockdown of HDAC3 [GeneID=8841] by RNAi | 41 | 0.0765 | 1.58E-20 | 1.07E-17 |
| PILON_KLF1_TARGETS_DN | 1972 | Genes downregulated in erythroid progenitor cells from fetal livers of E13.5 embryos with KLF1 [GeneID=10661] knockout compared to those from the wild-type embryos | 78 | 0.0396 | 7.34E-20 | 4.35E-17 |
| HELLER_SILENCED_BY_METHYLATION_DN | 105 | Genes downregulated in at least one of the three multiple myeloma (MM) cell lines treated with the DNA hypomethylating agent decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) [PubChem=451668] | 20 | 0.1905 | 2.33E-18 | 1.03E-15 |
| HELLER_HDAC_TARGETS_SILENCED_BY_METHYLATION_DN | 281 | Genes downregulated in multiple myeloma (MM) cell lines treated with both decitabine [PubChem=451668] TSA [PubChem=5562] | 29 | 0.1032 | 2.39E-18 | 1.03E-15 |
| MEISSNER_BRAIN_HCP_WITH_H3K4ME3_AND_H3K27ME3 | 1069 | Genes with high-CpG-density promoters (HCP) bearing histone H3 dimethylation at K4 (H3K4me2) and trimethylation at K27 (H3K27me3) in the brain | 52 | 0.0486 | 4.33E-17 | 1.47E-14 |
| HELLER_HDAC_TARGETS_UP | 317 | Genes upregulated in at least one of the three multiple myeloma (MM) cell lines by TSA [PubChem=5562] | 29 | 0.0915 | 6.26E-17 | 1.98E-14 |
| NUYTTEN_EZH2_TARGETS_UP | 1037 | Genes upregulated in PC3 cells (prostate cancer) after knockdown of EZH2 [GeneID=2146] by RNAi | 49 | 0.0473 | 1.13E-15 | 2.97E-13 |
| NUYTTEN_EZH2_TARGETS_DN | 1024 | Genes downregulated in PC3 cells (prostate cancer) after knockdown of EZH2 [GeneID=2146] by RNAi | 46 | 0.0449 | 5.41E-14 | 1.03E-11 |
| HELLER_SILENCED_BY_METHYLATION_UP | 282 | Genes upregulated in at least one of the three multiple myeloma (MM) cell lines treated with the DNA hypomethylating agent decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) [PubChem=451668] | 24 | 0.0851 | 1.50E-13 | 2.49E-11 |
| CHICAS_RB1_TARGETS_CONFLUENT | 567 | Genes upregulated in confluent IMR90 cells (fibroblast) after knockdown of RB1 [GeneID=5925] by RNAi | 33 | 0.0582 | 2.26E-13 | 3.45E-11 |
| HELLER_HDAC_TARGETS_DN | 292 | Genes downregulated in at least one of the three multiple myeloma (MM) cell lines by TSA [PubChem=5562] | 24 | 0.0822 | 3.20E-13 | 4.74E-11 |
| DANG_BOUND_BY_MYC | 1103 | Genes whose promoters are bound by MYC [GeneID=4609], according to MYC Target Gene Database | 46 | 0.0417 | 7.35E-13 | 9.56E-11 |
| ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_CD1_VS_CD2_UP | 66 | Genes upregulated in CD-1 compared to CD-2 cluster of multiple myeloma samples | 13 | 0.197 | 1.32E-12 | 1.53E-10 |
| WEI_MYCN_TARGETS_WITH_E_BOX | 795 | Genes whose promoters contain E-box motifs and whose expression changed in MYCN-3 cells (neuroblastoma) upon induction of MYCN [GeneID=4613] | 37 | 0.0465 | 6.23E-12 | 6.71E-10 |
| MARTINEZ_TP53_TARGETS_DN | 593 | Genes downregulated in mice with skin-specific knockout of TP53 [GeneID=7157] | 31 | 0.0523 | 1.89E-11 | 1.79E-09 |
| MARTINEZ_RB1_TARGETS_UP | 673 | Genes upregulated in mice with skin-specific knockout of RB1 [GeneID=5925] by Cre-lox | 32 | 0.0475 | 1.00E-10 | 7.29E-09 |
| PUJANA_ATM_PCC_NETWORK | 1442 | Genes constituting the ATM-PCC network of transcripts whose expression positively correlated (Pearson correlation coefficient, $PCC \geq 0.4$) with that of ATM [GeneID=472] across a compendium of normal tissues | 49 | 0.034 | 1.75E-10 | 1.23E-08 |

Table 2 continued

| Gene set name | Genes in gene set (K) | Description | Genes in overlap (k) | k/K | P-value | FDR q-value |
|--|-----------------------|--|----------------------|--------|----------|-------------|
| SHAFFER_IRF4_TARGETS_IN_MYELOMA_VS_MATURE_B_LYMPHOCYTE | 101 | IRF4 [GeneID=3662] target genes up-regulated in primary myeloma vs. mature B lymphocytes | 13 | 0.1287 | 3.57E-10 | 2.32E-08 |
| MARTINEZ_RB1_AND_TP53_TARGETS_DN | 591 | Genes downregulated in mice with skin-specific double knockout of both RB1 and TP53 [GeneID=5925;7157] by Cre-lox | 29 | 0.0491 | 3.71E-10 | 2.37E-08 |
| SENESE_HDAC1_TARGETS_UP | 457 | Genes upregulated in U2OS cells (osteosarcoma) upon knockdown of HDAC1 [GeneID=3065] by RNAi | 25 | 0.0547 | 6.79E-10 | 3.92E-08 |
| BILD_MYC_ONCOGENIC_SIGNATURE | 206 | Genes selected in supervised analyses to discriminate cells expressing c-Myc [GeneID=4609] from control cells expressing GFP | 17 | 0.0825 | 8.63E-10 | 4.92E-08 |
| CHICAS_RB1_TARGETS_GROWING | 243 | Genes upregulated in growing IMR90 cells (fibroblast) after knockdown of RB1 [GeneID=5925] by RNAi | 18 | 0.0741 | 1.57E-09 | 8.46E-08 |
| BENPORATH_CYCLING_GENES | 648 | Genes showing cell-cycle stage-specific expression [PMID=12058064] | 29 | 0.0448 | 2.99E-09 | 1.48E-07 |
| REACTOME_CELL_CYCLE | 421 | Genes involved in cell cycle | 23 | 0.0546 | 3.36E-09 | 1.61E-07 |
| CHICAS_RB1_TARGETS_SENESCENT | 572 | Genes upregulated in senescent IMR90 cells (fibroblast) after knockdown of RB1 [GeneID=5925] by RNAi | 27 | 0.0472 | 3.44E-09 | 1.63E-07 |

response to treatment DM score²⁷ and HA score²⁸. In univariate COX analysis, all of these factors had prognostic value (Supplementary Table S5). Compared two by two in multivariate COX analysis, Combo score, ISS, IFM score, t(4;14), GPI, DM score, HA score, and β 2M remained independent in the HM cohort. In the UAMS-TT2 cohort, when compared two by two, Combo score tested with HRS, IFM score, t(4;14), del17p, RS, GPI, HA score, and DM score remained independent prognostic factors. When tested all together, Combo score, β 2M, and RS remained independent in the HM cohort, whereas UAMS-HRS, t(4;14), and del17p were independent in the UAMS-TT2 cohort (Supplementary Table S6).

The Combo score is predictive for myeloma cell sensitivity to DNMTi and HDACi combination

The efficacy of the Combo score to predict sensitivity of myeloma cells to DNMTi/HDACi treatment was investigated using primary MMC of patients co-cultured with their bone marrow microenvironment in vitro^{27, 28}. MMC of patients with a high Combo score ($n = 5$) were significantly more sensitive to decitabine and TSA combination than MMC of patients with a low Combo score ($n = 5$) (Fig. 3a). We confirmed these results using another DNMTi and HDACi association. Primary MMCs of patients with a high Combo score ($n = 7$) exhibited a significant higher sensitivity to the clinical grade inhibitors 5-azacitidine/SAHA combination than MMC of patients with a low Combo score ($n = 8$) (Fig. 3b). Altogether, these data indicated that patients with high risk identified using the Combo score could benefit from HDACi/DNMTi treatment.

MMC of patients with a low Combo score value are characterized by a mature BMPC gene signature, whereas patients with high Combo score have a proliferating and MYC-associated gene signatures

In order to evaluate whether different gene signatures could be identified comparing the high and low Combo score groups, we performed a gene set enrichment analysis (GSEA). MMC of patients with a low Combo score displayed a significant enrichment in genes associated with normal mature BMPCs (gene set: MOREAUX MULTIPLE MYELOMA BY TACI UP, $P < 0.0001$, Supplementary Figure S2 and Supplementary Table S7) and bone microenvironment dependence (gene sets: KEGG CYTOKINE CYTOKINE RECEPTOR INTERACTION, $P < 0.0001$, Supplementary Figure S2 and Supplementary Tables S8). In contrast, MMCs of patients with a high Combo score exhibited a significant enrichment in genes associated with proliferating plasmablastic progenitors (gene sets: WHITFIELD CELL CYCLE S, REACTOME CELL CYCLE $P < 0.0001$ and $P = 0.01$, Supplementary Figure S3 and Supplementary Tables S9 and S10), MYC deregulation (gene sets: O'DONNELL TARGETS OF MYC, DANG MYC TARGETS UP, $P < 0.0001$ and 0.002 , Supplementary Figure S3 and Supplementary Table S11 and S12), and transcription (gene set: REACTOME TRANSCRIPTION, $P < 0.0001$, Supplementary Figure S3 and supplementary Table S13). Investigating the Combo score in normal plasma cell differentiation, the Combo score value was significantly higher in preplasmablasts (PrePB, $P = 0.03$) compared to MB cells and in plasmablasts (PB, $P = 0.04$) compared to preplasmablasts (Fig. 4). Early plasma cells were found to have the highest score ($P < 0.001$) and the Combo score decreased drastically to the lowest value in mature BMPC ($P < 0.001$) (Fig. 4).

HDACi/DNMTi combination results in significant downregulation of IRF4 and MYC expression

Since MM patients with a high Combo score are characterized by deregulation of MYC target genes, we next investigated the link between DNMTi/HDACi combined treatment and MYC deregulation using nine different HMCLs. Interestingly, GSEA analysis underlined that DNMTi/HDACi treatment results in a significant downregulation of genes silenced by H3K27 and DNA methylation, HDAC, EZH2, IRF4, and MYC target genes, suggesting that the

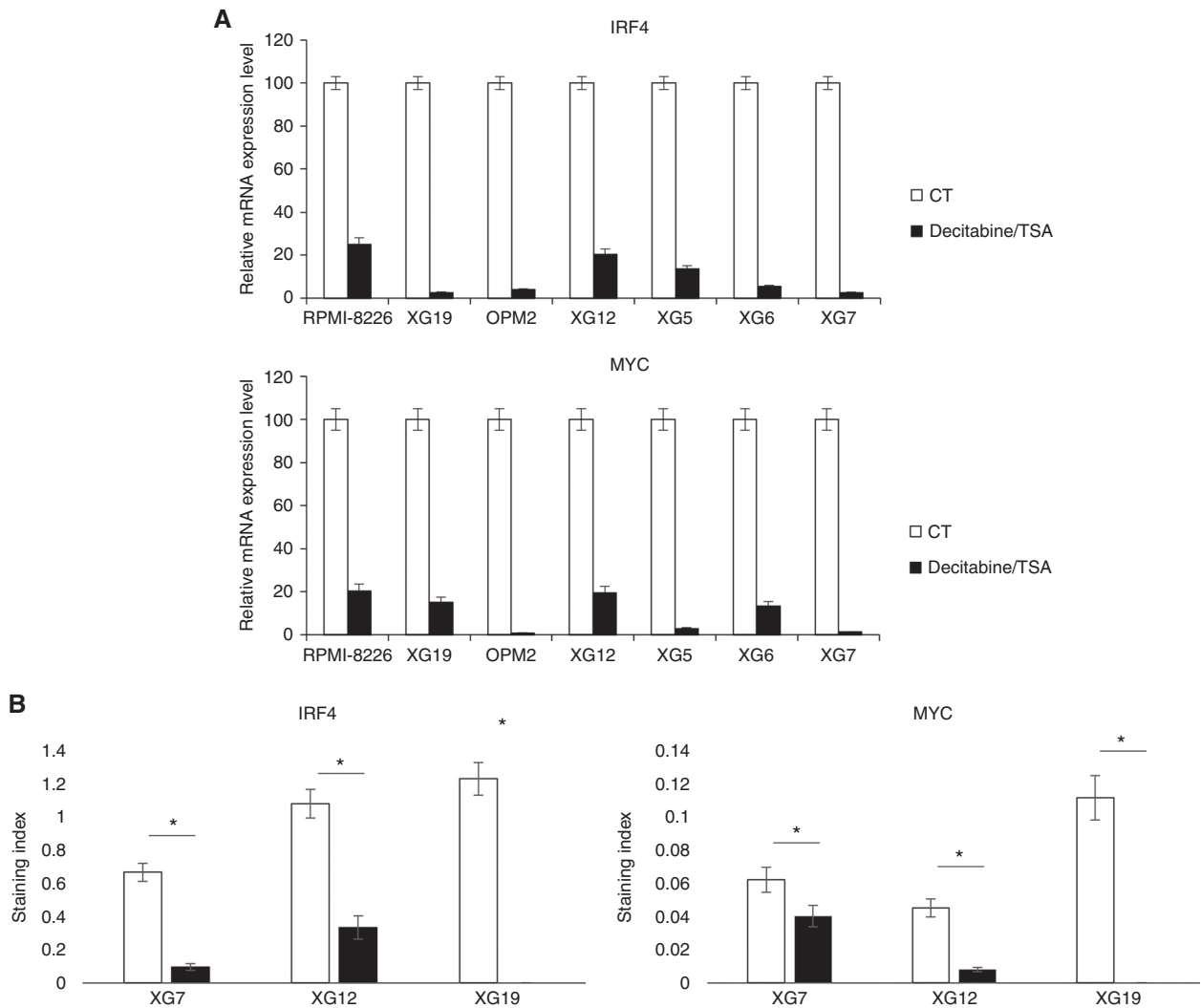


Fig. 5 HDACi/DNMTi induces a significant downregulation of IRF4 and MYC expression. **a** Seven HMCLs were treated for 7 days with decitabine (DNMTi) and TSA during the last 24 h. Data are the *MYC* and *IRF4* gene expression in treated HMCLs compared to the control (arbitrary signal = 100) assayed using real-time PCR. **b** Protein expression of MYC and IRF4 was assayed using flow cytometry in three HMCLs, namely XG7, XG12, and XG19

effects of the combination could be mediated by IRF4 and MYC downregulation (Table 2). *IRF4* and *MYC* downregulation after HDACi/DNMTi treatment was validated at the mRNA level by using QPCR (Fig. 5a) and at the protein level (Fig. 5b). Of note, this strong common downregulation of MYC and IRF4 expression was higher compared to DNMTi or HDACi treatment alone (Supplementary Figure S4A-B).

HDACi/DNMTi combination results in epigenetic reprogramming of MMCs
As we identified HDACi/DNMTi combined treatment is associated with MYC/IRF4 axis dysregulation thought to play a role in MM pathophysiology, we sought to determine whether HDACi/DNMTi treatment is associated with an epigenetic reprogramming of MMCs. Cluster analysis of the top 100 genes deregulated by HDACi/DNMTi (GSEA analysis) revealed that treated HMCLs cluster with normal BMPC, suggesting that HDACi/DNMTi combined treatment induced a normal BMPC gene program (Fig. 6). Altogether, these data indicate an epigenetic reprogramming of MMCs by HDACi/DNMTi combination, associated with MYC/IRF4 axis targeting and normal BMPC gene expression pattern induction.

DISCUSSION

Clinical trials suggested promising activity of HDACi/DNMTi combination in MDS, AML^{16, 24, 25}, and refractory advanced non-small cell lung cancer²⁶. In MM, the oral HDACi panobinostat was recently approved by the US Food and Drug Administration for use in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed MM¹⁹. In addition, ongoing trials are investigating the therapeutic interest of panobinostat with other agents including next-generation proteasome inhibitors (carfilzomib and ixazomib), IMiD and dexamethasone, bortezomib and IMiD, or monoclonal antibodies in relapsed/refractory MM patients¹⁹. Moreover, DNMTi and HDACi combination resulted in a significant anti-myeloma activity in the Vk*MYC transgenic MM and 5T33MM mouse models^{22, 23}. Importantly, cooperation between histone modifications and DNA methylation is known to be important for the establishment of global epigenetic patterns as well as loci-specific gene regulation⁵⁵. This crosstalk can be mediated by biochemical interactions between SET domain histone methyltransferases and DNMTs⁵⁵. Only upregulated genes were identified in the HMCLs treated with DNMTi/HDACi compared with untreated HMCLs with a significant enrichment in genes involved in immunological and inflammatory diseases, p53 and TAp63 signaling pathways, and intercellular

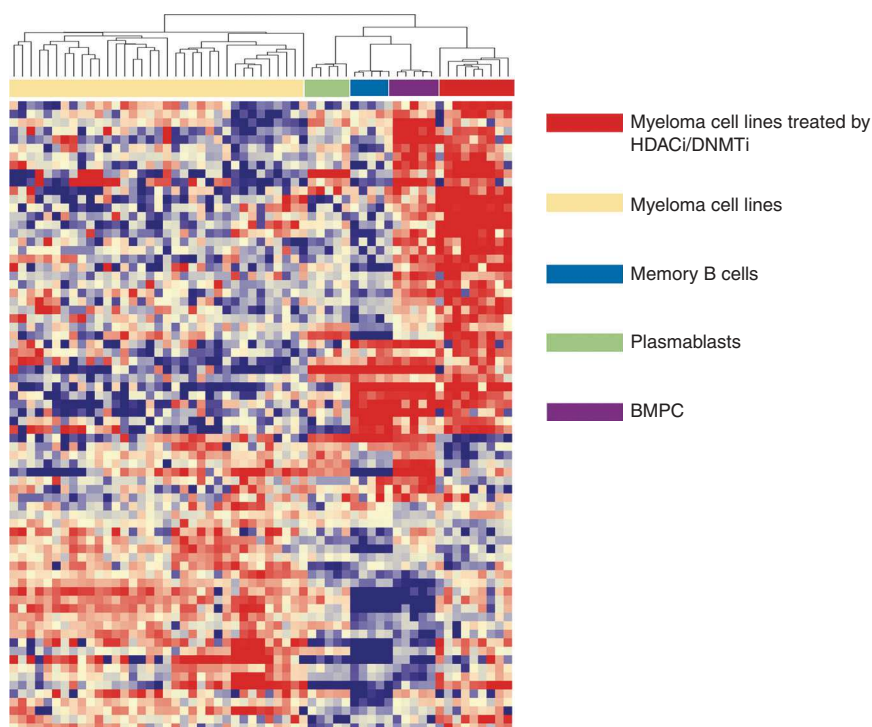


Fig. 6 HDACi/DNMTi induces a normal BMPC gene expression program in MM cells. The signals of the top 100 genes deregulated by HDACi/DNMTi in myeloma cell lines ($n=49$), myeloma cell lines treated by DNMTi/HDACi ($n=9$), normal memory B cells (MB, $n=5$), normal plasmablasts (PB, $n=5$), and normal bone marrow plasma cells ($n=5$) are displayed from low (deep blue) to high (deep red) expression

communication signals. Significant induction of TP53 and TP53 homolog Tap63 target genes known to exert anti-oncogenic roles in cancers⁵⁶ and could participate in the MMC toxicity of HDACi/DNMTi combination.

In this study, we constructed a GEP-based Combo score that allows identification of high-risk patients associated with MMC's higher sensitivity to HDACi/DNMTi combination in vitro. Since HDACi/DNMTi combination are well tolerated²⁴ showing promising activity in cancers (including hematological malignancies^{16, 24–26}) and have potential therapeutic value in MM^{22, 23}, the Combo score could enable the identification of MM patients who could benefit from this treatment.

The 15 genes used to build the Combo score, included 4 genes associated with a bad prognosis and 11 associated with a good prognosis (Fig. 1). Among these genes, some of them could highlight pathways involved in MM biology and sensitivity to DNMTi/HDACi combination. Patients with high Combo score, and poor survival, are characterized by a higher expression of the 4 bad prognostic genes and a lower expression of the 11 good ones in MMCs. Primary MMCs of patients with high Combo score can be efficiently targeted by the upregulation of gene products encoded by genes upregulated by HDACi/DNMTi, in particular the 11 good prognostic genes. A full understanding of the reason why the Combo score could predict for HDACi/DNMTi sensitivity will be provided by an extensive study of the function of the products encoded by HDACi/DNMTi-regulated genes in MMC survival and/or proliferation. Among them, *NFKBIZ* was identified. *NFKBIZ* codes the inhibitor of nuclear factor- κ B (NF κ B) (I κ B) protein I κ B ζ . I κ B ζ is an atypical and mainly nuclear I κ B protein working as a co-transcription factor of NF κ B to modulate the expression of NF κ B target genes⁵⁷. NF κ B is a major pathway involved in MMC survival and is activated by various gene mutations^{58–60}. *NFKBIZ* overexpression was reported to induce cell death⁶¹ and inhibit transcriptional activity of STAT3 with Mcl1 downregulation and apoptosis induction⁶². Mcl1 is known to be the major antiapoptotic protein involved in MMC survival^{63, 64}. This significant

overexpression of *NFKBIZ* after DNMTi/HDACi treatment was validated by quantitative RT-PCR in seven HMCLs (Supplementary Figure S5). As a significant enrichment in genes associated with proliferation was identified in MMC of patients with a high Combo score value, the higher sensitivity of high Combo score patients to DNMTi/HDACi combination could be explained by the fact that incorporation of DNMTi into DNA is restricted to cell cycling cells³. Furthermore, HDACi have been shown to induce G1 cell cycle arrest through dephosphorylation of retinoblastoma protein and increase expression of p53 and p21^{9, 12, 14}. Using methylation-specific PCR, several studies have identified hypermethylation of tumor-suppressor genes including cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI, p15, and p16) and p14^{65–67}. DNMTi/HDACi treatment induced p21 and p57 CDKI expression in MMC (Supplementary Table S2). Thus DNMTi/HDACi combination could be useful to induce the expression of major tumor-suppressor genes in MMC.

Furthermore, core histone proteins must be synthesized rapidly during the brief S-phase when a cell is dividing⁶⁸. As a result, the histone mRNAs are highly cell cycle regulated, increasing 35-fold as cells enter S-phase and decreasing again at the end of S-phase⁶⁸. Altogether, these data could clarify why MMC of high Combo score patients, distinguished by an active growth, can be efficiently targeted by HDACi/DNMTi treatment.

Most interestingly, HDACi/DNMTi treatment induced reprogramming of MMC through IRF4 and MYC axis targeting and induction of a normal BMPC gene expression program. IRF4 is a transcription factor critical for normal plasma cell development⁶⁹. Abnormal activity of IRF4 linked to a translocation or the presence of superenhancers plays a key role in MM development^{70, 71}. IRF4 is overexpressed in a subset of patients harboring t(6;14)(p25;q32) translocation⁷⁰. MYC is an IRF4 target presenting prominent role in MM pathogenesis⁶⁹. We report here that HDACi/DNMTi combination triggers a significant downregulation of MYC, IRF4, and several IRF4-MYC target genes. Interestingly, this strong common downregulation of MYC and IRF4 expression was not identified after DNMTi or HDACi treatment alone^{27, 28}. It

was demonstrated that IMiDs could target IRF4 and MYC expression through binding to cereblon E3 ubiquitin ligase that promote proteasomal degradation of IKZF1 and IKZF3 transcriptional factors^{72, 73}.

These data suggest that DNMTi/HDACi could be of therapeutic interest in combination with IMiDs in high-risk MM with elevated Combo score value.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Microarray Core Facility of IRMB (<http://irb.montp.inserm.fr/en/index.php?page=Plateau&ldEquipe=6>). This work was supported by grants from French INCA (Institut National du Cancer) Institute (2012-109/087437 and PLBIO15-256), Languedoc Roussillon CRLR (R14026FF), LR-FEDER Hemodiag, Fondation de France (201400047510), ITMO Cancer (MM&TT), SIRIC Montpellier (INCa-DGOS-Inserm 6045), Kom Op tegen Kanker, Stichting tegen Kanker and Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek, Belgium, the German Federal Ministry of Education (BMBF) "CAMPSIMM" (01ES1103) and within the framework of the e:Med research and funding concept "CLIOMMICS" (01ZX1309), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TRR79; subproject B1). L.H. is supported by a grant from Labex EpiGenMed.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.B. and K.M. designed the research and wrote the paper. H.D., A.S., C.M.-T., L.V., S.B., G.C., and G.H. collected bone marrow samples and clinical data and participated in the writing of the paper. A.K., R.T., and J.-I.V. participated in the bioinformatics studies. N.R., G.R., and S.B. provided with technical assistance. K.V., L.H., and B.K. participated in the research and wrote the paper. E.D.B. and J.M. designed and supervised the research and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0025-x>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Heuck, C. J. et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J. Immunol.* **190**, 2966–2975 (2013).
2. Walker, B. A. et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* **117**, 553–562 (2010).
3. Hollenbach, P. W. et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS ONE* **5**, e9001 (2010).
4. Maes, K. et al. Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers* **5**, 430–461 (2013).
5. Feng, R. et al. KD5170, a novel mercaptoketone-based histone deacetylase inhibitor, exerts antimyeloma effects by DNA damage and mitochondrial signaling. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1494–1505 (2008).
6. Hideshima, T. et al. Induction of differential apoptotic pathways in multiple myeloma cells by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Leukemia* **28**, 457–460 (2013).
7. Kaiser, M. et al. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* **91**, 248–251 (2006).
8. Khan, S. B., Maududi, T., Barton, K., Ayers, J. & Alkan, S. Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **125**, 156–161 (2004).
9. Lavelle, D., Chen, Y. H., Hankewych, M. & DeSimone, J. Histone deacetylase inhibitors increase p21(WAF1) and induce apoptosis of human myeloma cell lines independent of decreased IL-6 receptor expression. *Am. J. Hematol.* **68**, 170–178 (2001).
10. Minami, J. et al. Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia* **28**, 680–689 (2013).
11. Mitsiades, C. S. et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 540–545 (2004).
12. Mitsiades, N. et al. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* **101**, 4055–4062 (2003).
13. Catley, L. et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* **102**, 2615–2622 (2003).

14. Neri, P., Bahlis, N. J. & Lonial, S. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **21**, 733–747 (2012).
15. Neri, P. et al. In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Br. J. Haematol.* **143**, 520–531 (2008).
16. Zhang, Q. L. et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia* **23**, 1507–1514 (2009).
17. Dimopoulos, M. et al. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* **14**, 1129–1140 (2013).
18. Richardson, P. G. et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood* **122**, 2331–2337 (2013).
19. Laubach, J. P., Moreau, P., San-Miguel, J. F. & Richardson, P. G. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4767–4773 (2015).
20. Richardson, P. G. et al. Pomalidomide, bortezomib and low-dose dexamethasone in lenalidomide-refractory and proteasome inhibitor-exposed myeloma. *Leukemia* **31**, 2695–2701 (2017).
21. San-Miguel, J. F. et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 1195–1206 (2014).
22. Matthews, G. M. et al. Preclinical screening of histone deacetylase inhibitors combined with ABT-737, rhTRAIL/MD5-1 or 5-azacytidine using syngeneic Vk*MYC multiple myeloma. *Cell Death Dis.* **4**, e798 (2013).
23. Maes, K. et al. In vivo treatment with epigenetic modulating agents induces transcriptional alterations associated with prognosis and immunomodulation in multiple myeloma. *Oncotarget* **6**, 3319–3334 (2015).
24. Bots, M. & Johnstone, R. W. Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3970–3977 (2009).
25. Fandy, T. E. et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood* **114**, 2764–2773 (2009).
26. Juergens, R. A. et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **1**, 598–607 (2011).
27. Moreaux, J. et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 2685–2692 (2012).
28. Moreaux, J. et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br. J. Cancer* **109**, 676–685 (2013).
29. Gu, Z. J. et al. Agonist anti-gp130 transducer monoclonal antibodies are human myeloma cell survival and growth factors. *Leukemia* **14**, 188–197 (2000).
30. Moreaux, J. et al. TACI expression is associated with a mature bone marrow plasma cell signature and C-MAF overexpression in human myeloma cell lines. *Haematologica* **92**, 803–811 (2007).
31. Moreaux, J. et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* **96**, 574–582 (2011).
32. Rebouissou, C. et al. A gp130 interleukin-6 transducer-dependent SCID model of human multiple myeloma. *Blood* **91**, 4727–4737 (1998).
33. Tarte, K. et al. Induced expression of B7-1 on myeloma cells following retroviral gene transfer results in tumor-specific recognition by cytotoxic T cells. *J. Immunol.* **163**, 514–524 (1999).
34. Zhang, X. G. et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* **83**, 3654–3663 (1994).
35. Hose, D. et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica* **96**, 87–95 (2011).
36. De Vos, J. et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* **21**, 6848–6857 (2002).
37. Barlogie, B. et al. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood* **107**, 2633–2638 (2006).
38. Kassambara, A. et al. Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma. *Haematologica* **97**, 622–630 (2012).
39. Xiong, W. et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* **112**, 4235–4246 (2008).
40. Mulligan, G. et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* **109**, 3177–3188 (2007).

41. Jourdan, M. et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J. Immunol.* **187**, 3931–3941 (2011).
42. Jourdan, M. et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* **114**, 5173–5181 (2009).
43. Heller, G. et al. Genome-wide transcriptional response to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin a in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **68**, 44–54 (2008).
44. Mahtouk, K. et al. An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis. *Blood* **103**, 1829–1837 (2004).
45. Cui, X. & Churchill, G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* **4**, 210 (2003).
46. Kassambara, A. et al. GenomicScape: an easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004077 (2015).
47. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
48. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14863–14868 (1998).
49. Jourdan, M. et al. Differential effects of lenalidomide during plasma cell differentiation. *Oncotarget* **7**, 28096–28111 (2016).
50. Zhan, F. et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* **108**, 2020–2028 (2006).
51. Hothorn, T. & Lausen, B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput. Stat. Data Anal.* **43**, 121–137 (2003).
52. Shaughnessy, J. D. Jr. et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* **109**, 2276–2284 (2007).
53. Decaux, O. et al. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myelome. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4798–4805 (2008).
54. Reme, T., Hose, D., Theillet, C. & Klein, B. Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinformatics* **29**, 1149–1157 (2013).
55. Cedar, H. & Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 295–304 (2009).
56. Humphries, L. A. et al. Pro-apoptotic TP53 homolog TAp63 is repressed via epigenetic silencing and B-cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **163**, 590–602 (2013).
57. Hildebrand, D. G. et al. IkappaBzeta is a transcriptional key regulator of CCL2/MCP-1. *J. Immunol.* **190**, 4812–4820 (2013).
58. Bolli, N. et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat. Commun.* **5**, 2997 (2014).
59. Lohr, J. G. et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* **25**, 91–101 (2014).
60. Walker, B. A. et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3911–3920 (2015).
61. Totzke, G. et al. A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 12645–12654 (2006).
62. Wu, Z. et al. Nuclear protein IkappaB-zeta inhibits the activity of STAT3. *Biochem Biophys. Res Commun.* **387**, 348–352 (2009).
63. Derenne, S. et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100**, 194–199 (2002).
64. Jourdan, M. et al. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* **22**, 2950–2959 (2003).
65. Braggio, E. et al. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **91**, 87–96 (2010).
66. Mateos, M. V. et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br. J. Haematol.* **118**, 1034–1040 (2002).
67. Takada, S. et al. Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* **75**, 505–510 (2005).
68. Harris, M. E. et al. Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: evidence suggesting control at two posttranscriptional steps. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2416–2424 (1991).
69. Shaffer, A. L. et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* **454**, 226–231 (2008).
70. Iida, S. et al. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat. Genet.* **17**, 226–230 (1997).
71. Loven, J. et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* **153**, 320–334 (2013).
72. Kronke, J. et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301–305 (2014).
73. Lu, G. et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* **343**, 305–309 (2014).



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. If you remix, transform, or build upon this article or a part thereof, you must distribute your contributions under the same license as the original. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

© The Author(s) 2018

II. Brevet : Method and pharmaceutical compositions for the treatment of multiple myeloma

J. Moreaux, **L. Herviou**, F. Izard, C. Grimaud, E. Julien

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of multiple myeloma. In particular, the present invention relates to a method of treating multiple myeloma in a patient in need thereof comprising administering to the patient 10 a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor.

EP16305176. 2016

METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA

5 **FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of multiple myeloma.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION:**

Multiple Myeloma (MM) is a currently incurable malignant plasma cell disease, with 25,000 new patients per year in the EU and a median survival of five to six years¹. This disease develops primarily in the bone marrow and is associated with end organ damages: bone lesions due to abnormal bone turnover induced by tumor cells, renal failure due to high levels of monoclonal immunoglobulin (Ig), anemia due to bone marrow invasion by tumor cells. Malignant plasma cells (Multiple Myeloma Cells, MMCs) are clonal cells that exhibit the same rearranged heavy and light chain Ig genes, with somatic mutations in the variable domains of Ig genes that are fixed throughout disease course. For virtually all patients, Multiple Myeloma (MM) disease is preceded by a premalignant phase, called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), characterized by the accumulation in the bone marrow of clonal plasma cells surviving for years in the bone marrow and the detection of a clonal Ig in the serum². MGUS frequency increased rapidly with age and occurs in 5.7% the population older than 70 years. Premalignant plasma cells are in an oncogene-induced senescence state, with deregulation of oncogenes (Cyclin D1, Ras and growth factors), partial inactivation of the Rb pathway and accumulation of p21 and p16. MM disease arises at a 1% rate per year in patients with MGUS, independently of the duration of premalignant phase.

Treatment of MM¹ consists of (1) an induction phase with four monthly courses of high doses of corticosteroid (Dexamethasone) and a proteasome inhibitor (Velcade) in association with a cell cycle targeting drug or an immunomodulatory drug, (2) a short-term exposure to high dose of Melphalan, an alkylating agent followed with autologous stem cell transplantation to rescue hematopoiesis and (3) a maintenance treatment with dexamethasone and an immunomodulatory drug (Thalidomide or Revlimid), which targets Cereblon, an F-box protein of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase complex. These regimens do not cure patients and MM repeatedly relapses until the patient succumbs to the disease.

The molecular events governing the onset and progression of malignant transformation are triggered by DNA alterations (translocations, amplifications or deletions, mutations) and defects in pattern of epigenetic modifications in chromatin³, including changes in DNA methylation and in histone methylation and acetylation. These epigenetic changes are often critical in the initiation and progression of many cancers⁴. In multiple myeloma (MM), the profile of DNA methylation comprises genomic global hypomethylation and promoter hypermethylation of tumor suppressor genes^{5,6}. More recently, hypermethylation of *GPX3*, *RBPI*, *SPARC* and *TGFBI* genes was demonstrated to be associated with significantly shorter overall survival, independent of age, ISS score and adverse cytogenetics⁷. Thus, clinical trials for MM treatment are ongoing with DNMT inhibitors (DNMTi) as monotherapy or combined with lenalidomide or dexamethasone⁸. Histone deacetylases (HDAC) represent another molecular targets for the treatment of different cancers including MM⁹⁻¹². Romidepsin and Vorinostat (SAHA) have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma¹³ and several HDAC inhibitors (HDACi) are evaluated in clinical trials in MM^{8,9}. In this regard, combination of panobinostat-bortezomib-dexamethasone (PANORAMA) and of vorinostat-bortezomib (VANTAGE 088) have been initiated in two large phase III clinical trials^{14,15}. Results of VANTAGE 088 trial showed that association of vorinostat and bortezomib prolonged significantly progression free survival in patients with relapsed or refractory MM¹⁵. In PANORAMA clinical trial, panobinostat pan-HDACi treatment combined with bortezomib and dexamethasone resulted in a significant progression-free survival improvement in patients with relapsed MM¹⁶. However, identification of biomarkers predictive for sensitivity of MMCs to epigenetic therapies remains an important objective to improve clinical trials. We recently reported gene expression (GEP)-based risk scores to predict the sensitivity of MMC to DNMTi^{17,18} and HDACi¹⁷. These scores allow the identification of MM patients who could benefit from HDACi or DNMTi treatment.

SETD8 (also known as SET8, PR-Set7, KMT5A) is the sole enzyme responsible for the monomethylation of histone H4 at lysine 20 (H4K20me1) which has been linked to chromatin compaction and cell-cycle regulation¹⁹⁻²¹. In addition, SETD8 also induces the methylation of non-histone proteins, such as the replication factor PCNA and the tumor suppressor P53 and its stabilizing protein Numb^{22,23,24}. While SETD8-mediated methylation of P53 and Numb inhibits apoptosis, PCNA methylation upon SETD8 enhances the interaction with the Flap endonuclease FEN1 and promotes cancer cell proliferation^{23,24}. Consistent with this, overexpression of SETD8 is found in various types of cancer and has

been directly implicated in breast cancer invasiveness and metastasis²⁵. A role of SETD8 in development of Multiple Myeloma is not known, however.

SUMMARY OF THE INVENTION:

5 The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of multiple myeloma. In particular, the present invention is defined by the claims.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

10 In order to identify new epigenetic targets for MM cancer treatment, the inventors asked which genes encoding epigenetic factors are differentially expressed between normal bone marrow plasma cells (BMPCs, n=7), MM plasma cells from newly diagnosed patients (MMCs, n = 206) and human myeloma cell lines (HMCLs, N=40). They identified a significant overexpression of the histone methyltransferase SETD8 in HMCLs compared to normal BMPCs and primary MMCs from newly diagnosed patients. Here, the inventors
15 provide evidence that SETD8 overexpression is an adverse prognosis factor in multiple myeloma. The inhibition of this epigenetic enzyme by the chemical drug UNC0379 causes SETD8 degradation and H4K20me1 depletion, which leads to cell-cycle defects and apoptosis in U2OS and human myeloma cell lines. Remarkably, treatment of MM patient samples with UNC 0379 leads to reduce the percentage of myeloma cells without significant toxicity on the
20 non-myeloma cells, suggesting a specific addiction of primary myeloma cells to the SETD8 activity. Finally, combining low dose of UNC0379 with melphalan strongly enhances the appearance of DNA damage, suggesting that SETD8 inhibition represent a promising strategy to improve conventional treatment of multiple myeloma.

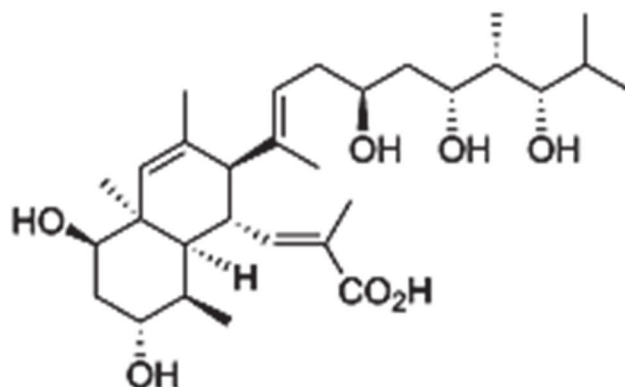
Accordingly a first object of the present invention relates to a method of treating
25 multiple myeloma in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor.

The term "multiple myeloma" as used herein refers to a disorder characterized by malignant proliferation of plasma cells derived from a single clone. It is diagnosed using standard diagnostic criteria. Typically, low red blood cell count and/or elevated protein levels
30 in the blood or protein in the urine is an early indicator; a bone marrow biopsy showing high levels of myeloma cells (>10% plasma cells) in the bone marrow is more definitive. The presence of the M protein in the serum and/or presence of lytic lesions in the bones are also diagnostic indicators of the disorder.

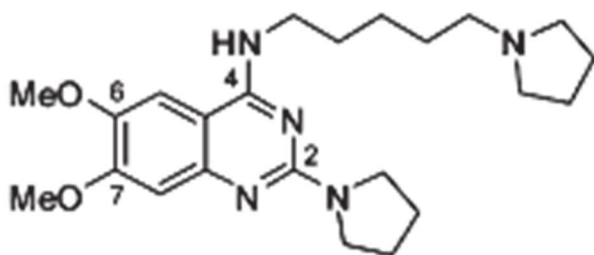
As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a patient having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a patient beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a patient during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a patient during treatment of an illness, e.g., to keep the patient in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

As used herein, the term "SETD8" has its general meaning in the art and refers to the sole enzyme responsible for the monomethylation of histone H4 at lysine 20 (H4K20me1) which has been linked to chromatin compaction and cell-cycle regulation¹⁹⁻²¹. SETD8 is also known as SET8, PR-Set7, KMT5A. Accordingly a "SETD8 inhibitor" refers to any compound that is able to inhibit the activity or expression of SETD8. In particular the SETD8 inhibitor of the present invention is a compound that is able to inhibit the catalytic activity of the enzyme i.e. the monomethylation of histone H4 at lysine 20.

SETD8 inhibitors are well known in the art and typically include the compounds described in *J Med Chem.* 2014 Aug 14;57(15):6822-33. In some embodiments, the SETD8 inhibitor is the nahuoic acid A that has the formula of



5 In some embodiments, the SETD8 inhibitor is the UNC0379 small-molecule inhibitor that has the formula of:



In some embodiments, the SETD8 inhibitor is an inhibitor of SETD8 expression. An “inhibitor of expression” refers to a natural or synthetic compound that has a biological effect to inhibit the expression of a gene. In a preferred embodiment of the invention, said inhibitor of gene expression is a siRNA, an antisense oligonucleotide or a ribozyme. For example, anti-sense oligonucleotides, including anti-sense RNA molecules and anti-sense DNA molecules, would act to directly block the translation of SETD8 mRNA by binding thereto and thus preventing protein translation or increasing mRNA degradation, thus decreasing the level of SETD8, and thus activity, in a cell. For example, antisense oligonucleotides of at least about 15 bases and complementary to unique regions of the mRNA transcript sequence encoding SETD8 can be synthesized, e.g., by conventional phosphodiester techniques. Methods for using antisense techniques for specifically inhibiting gene expression of genes whose sequence is known are well known in the art (e.g. see U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; and 5,981,732). Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of expression for use in the present invention.

SETD8 gene expression can be reduced by contacting a patient or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that SETD8 gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Antisense oligonucleotides, siRNAs, shRNAs and ribozymes of the invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and typically cells expressing SETD8. Typically, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art.

In some embodiments, the SETD8 inhibitor of the present invention is administered to the patient in combination with a chemotherapeutic agent. As used herein, the term "chemotherapeutic agent" refers to any compound that can be used in the treatment, management or amelioration of cancer, including peritoneal carcinomatosis, or the amelioration or relief of one or more symptoms of a cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomycins, actinomycin, anthramycin, azascrine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabycin, carminomycin, carzinophilin,

chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, porfiromycins, puromycin, quelamycin, rodoxubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-
5 metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiothane,
10 testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid;
15 triaziquone; 2,2' 2'' -trichlorotriethylamine; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, e.g. paclitaxel and docetaxel; chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; etoposide
20 (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vinblastine; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; imexon; tyrosine kinase inhibitors, such as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib; proteasome inhibitors such as bortezomib thalidomide, lenalidomide corticosteroids such as
25 prednisone and dexamethasone (Decadron®). pomalidomide, the keto-epoxide tetrapeptide proteasome carfilzomib, the anti-CS-1 antibody elotuzumab, and histone deacetylase inhibitors of vorinostat and panabinstatand pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A further object of the present invention relates to a method for predicting the survival
30 time of a patient suffering from multiple myeloma comprising i) determining the expression level of SETD8 in a sample of multiple myeloma cells obtained from the patient, ii) comparing the expression level determined at step i) with a predetermined reference value and iii) concluding that the patient will have a short survival time when the level determined at step i) is higher than the predetermined reference value or concluding that the patient will

have a long survival time when the expression level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.

The method of the present invention is particularly suitable for predicting the duration of the overall survival (OS), progression-free survival (PFS) and/or the disease-free survival (DFS) of the cancer patient. Those of skill in the art will recognize that OS survival time is generally based on and expressed as the percentage of people who survive a certain type of cancer for a specific amount of time. Cancer statistics often use an overall five-year survival rate. In general, OS rates do not specify whether cancer survivors are still undergoing treatment at five years or if they've become cancer-free (achieved remission). DFS gives more specific information and is the number of people with a particular cancer who achieve remission. Also, progression-free survival (PFS) rates (the number of people who still have cancer, but their disease does not progress) includes people who may have had some success with treatment, but the cancer has not disappeared completely. As used herein, the expression "short survival time" indicates that the patient will have a survival time that will be lower than the median (or mean) observed in the general population of patients suffering from said cancer. When the patient will have a short survival time, it is meant that the patient will have a "poor prognosis". Inversely, the expression "long survival time" indicates that the patient will have a survival time that will be higher than the median (or mean) observed in the general population of patients suffering from said cancer. When the patient will have a long survival time, it is meant that the patient will have a "good prognosis".

In some embodiments, the expression level of SETD8 is determined by determining the quantity of SETD8 mRNA. Methods for determining the quantity of mRNA are well known in the art. For example the nucleic acid contained in the samples (e.g., cell or tissue prepared from the patient) is first extracted according to standard methods, for example using lytic enzymes or chemical solutions or extracted by nucleic-acid-binding resins following the manufacturer's instructions. The extracted mRNA is then detected by hybridization (e. g., Northern blot analysis, in situ hybridization) and/or amplification (e.g., RT-PCR). Other methods of Amplification include ligase chain reaction (LCR), transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA). Nucleic acids having at least 10 nucleotides and exhibiting sequence complementarity or homology to the mRNA of interest herein find utility as hybridization probes or amplification primers. It is understood that such nucleic acids need not be identical, but are typically at least about 80% identical to the homologous region of comparable size, more preferably 85% identical and even more preferably 90-95% identical.

In some embodiments, it will be advantageous to use nucleic acids in combination with appropriate means, such as a detectable label, for detecting hybridization. Typically, the nucleic acid probes include one or more labels, for example to permit detection of a target nucleic acid molecule using the disclosed probes. In various applications, such as in situ hybridization procedures, a nucleic acid probe includes a label (e.g., a detectable label). A “detectable label” is a molecule or material that can be used to produce a detectable signal that indicates the presence or concentration of the probe (particularly the bound or hybridized probe) in a sample. Thus, a labeled nucleic acid molecule provides an indicator of the presence or concentration of a target nucleic acid sequence (e.g., genomic target nucleic acid sequence) (to which the labeled uniquely specific nucleic acid molecule is bound or hybridized) in a sample. A label associated with one or more nucleic acid molecules (such as a probe generated by the disclosed methods) can be detected either directly or indirectly. A label can be detected by any known or yet to be discovered mechanism including absorption, emission and/ or scattering of a photon (including radio frequency, microwave frequency, infrared frequency, visible frequency and ultra-violet frequency photons). Detectable labels include colored, fluorescent, phosphorescent and luminescent molecules and materials, catalysts (such as enzymes) that convert one substance into another substance to provide a detectable difference (such as by converting a colorless substance into a colored substance or vice versa, or by producing a precipitate or increasing sample turbidity), haptens that can be detected by antibody binding interactions, and paramagnetic and magnetic molecules or materials.

In some embodiments, the expression level of SETD8 is determined at the protein level. Typically, the sample is contacted with a binding agent specific for SETD8 (e.g. an antibody). For example, one or more labels can be attached to the antibody, thereby permitting detection of the target protein (i.e the marker). Exemplary labels include radioactive isotopes, fluorophores, ligands, chemiluminescent agents, enzymes, and combinations thereof. In some embodiments, the label is a quantum dot. Non-limiting examples of labels that can be conjugated to primary and/or secondary affinity ligands include fluorescent dyes or metals (e.g. fluorescein, rhodamine, phycoerythrin, fluorescamine), chromophoric dyes (e.g. rhodopsin), chemiluminescent compounds (e.g. luminal, imidazole) and bioluminescent proteins (e.g. luciferin, luciferase), haptens (e.g. biotin). A variety of other useful fluorescers and chromophores are described in Stryer L (1968) *Science* 162:526-533 and Brand L and Gohlke J R (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41:843-868.

In some embodiments, the predetermined reference value is a threshold value or a cut-off value. Typically, a "threshold value" or "cut-off value" can be determined experimentally, empirically, or theoretically. A threshold value can also be arbitrarily selected based upon the existing experimental and/or clinical conditions, as would be recognized by a person of ordinary skilled in the art. For example, retrospective measurement of expression level of SETD8 in properly banked historical subject samples may be used in establishing the predetermined reference value. The threshold value has to be determined in order to obtain the optimal sensitivity and specificity according to the function of the test and the benefit/risk balance (clinical consequences of false positive and false negative). Typically, the optimal sensitivity and specificity (and so the threshold value) can be determined using a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve based on experimental data. For example, after determining the expression level of SETD8 in a group of reference, one can use algorithmic analysis for the statistic treatment of the measured expression levels of SETD8 in samples to be tested, and thus obtain a classification standard having significance for sample classification. The full name of ROC curve is receiver operator characteristic curve, which is also known as receiver operation characteristic curve. It is mainly used for clinical biochemical diagnostic tests. ROC curve is a comprehensive indicator that reflects the continuous variables of true positive rate (sensitivity) and false positive rate (1-specificity). It reveals the relationship between sensitivity and specificity with the image composition method. A series of different cut-off values (thresholds or critical values, boundary values between normal and abnormal results of diagnostic test) are set as continuous variables to calculate a series of sensitivity and specificity values. Then sensitivity is used as the vertical coordinate and specificity is used as the horizontal coordinate to draw a curve. The higher the area under the curve (AUC), the higher the accuracy of diagnosis. On the ROC curve, the point closest to the far upper left of the coordinate diagram is a critical point having both high sensitivity and high specificity values. The AUC value of the ROC curve is between 1.0 and 0.5. When $AUC > 0.5$, the diagnostic result gets better and better as AUC approaches 1. When AUC is between 0.5 and 0.7, the accuracy is low. When AUC is between 0.7 and 0.9, the accuracy is moderate. When AUC is higher than 0.9, the accuracy is quite high. This algorithmic method is preferably done with a computer. Existing software or systems in the art may be used for the drawing of the ROC curve, such as: MedCalc 9.2.0.1 medical statistical software, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT VI0.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md., USA), etc.

In some embodiments, the predetermined reference value is determined by carrying out a method comprising the steps of a) providing a collection of samples of multiple myeloma cells; b) providing for each sample provided at step a), information relating to the actual clinical outcome for the corresponding patient (i.e. the duration of the survival); c) providing a serial of arbitrary quantification values; d) determining the expression level of SETD8 for each sample contained in the collection provided at step a); e) classifying said samples in two groups for one specific arbitrary quantification value provided at step c), respectively: (i) a first group comprising samples that exhibit a quantification value for level that is lower than the said arbitrary quantification value contained in the said serial of quantification values; (ii) a second group comprising samples that exhibit a quantification value for said level that is higher than the said arbitrary quantification value contained in the said serial of quantification values; whereby two groups of samples are obtained for the said specific quantification value, wherein the samples of each group are separately enumerated; f) calculating the statistical significance between (i) the quantification value obtained at step e) and (ii) the actual clinical outcome of the patients from which samples contained in the first and second groups defined at step f) derive; g) reiterating steps f) and g) until every arbitrary quantification value provided at step d) is tested; h) setting the said predetermined reference value as consisting of the arbitrary quantification value for which the highest statistical significance (most significant) has been calculated at step g). For example the expression level of SETD8 has been assessed for 100 samples of 100 patients. The 100 samples are ranked according to the expression level of SETD8. Sample 1 has the highest level and sample 100 has the lowest level. A first grouping provides two subsets: on one side sample Nr 1 and on the other side the 99 other samples. The next grouping provides on one side samples 1 and 2 and on the other side the 98 remaining samples etc., until the last grouping: on one side samples 1 to 99 and on the other side sample Nr 100. According to the information relating to the actual clinical outcome for the corresponding patient, Kaplan Meier curves are prepared for each of the 99 groups of two subsets. Also for each of the 99 groups, the p value between both subsets was calculated. The predetermined reference value is then selected such as the discrimination based on the criterion of the minimum p value is the strongest. In other terms, the expression level of SETD8 corresponding to the boundary between both subsets for which the p value is minimum is considered as the predetermined reference value. It should be noted that the predetermined reference value is not necessarily the median value of expression levels of SETD8. Thus in some embodiments, the predetermined reference value thus allows discrimination between a poor and a good prognosis for a patient. Practically,

high statistical significance values (e.g. low P values) are generally obtained for a range of successive arbitrary quantification values, and not only for a single arbitrary quantification value. Thus, in one alternative embodiment of the invention, instead of using a definite predetermined reference value, a range of values is provided. Therefore, a minimal statistical significance value (minimal threshold of significance, e.g. maximal threshold P value) is arbitrarily set and a range of a plurality of arbitrary quantification values for which the statistical significance value calculated at step g) is higher (more significant, e.g. lower P value) are retained, so that a range of quantification values is provided. This range of quantification values includes a "cut-off" value as described above. For example, according to this specific embodiment of a "cut-off" value, the outcome can be determined by comparing the expression level of SETD8 with the range of values which are identified. In some embodiments, a cut-off value thus consists of a range of quantification values, e.g. centered on the quantification value for which the highest statistical significance value is found (e.g. generally the minimum p value which is found). For example, on a hypothetical scale of 1 to 10, if the ideal cut-off value (the value with the highest statistical significance) is 5, a suitable (exemplary) range may be from 4-6. For example, a patient may be assessed by comparing values obtained by measuring the expression level of SETD8, where values higher than 5 reveal a poor prognosis and values less than 5 reveal a good prognosis. In some embodiments, a patient may be assessed by comparing values obtained by measuring the expression level of SETD8 and comparing the values on a scale, where values above the range of 4-6 indicate a poor prognosis and values below the range of 4-6 indicate a good prognosis, with values falling within the range of 4-6 indicating an intermediate occurrence (or prognosis).

According to the present invention the therapeutically effective amount is determined using procedures routinely employed by those of skill in the art such that an "improved therapeutic outcome" results. It will be understood, however, that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound

at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

A further object of the present invention relates to a method of treating multiple myeloma in a subject in need thereof comprising i) determining the survival time of the patient by the method as above described and ii) administering to the patient a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor when it is concluded that the patient will have a short survival time.

According to the invention, the SETD8 inhibitor is administered to the patient in the form of a pharmaceutical composition. Typically, the SETD8 inhibitor may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form therapeutic compositions. "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. Typically, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions

(monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions. The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms. The SETD8 inhibitor can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by

incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the typical methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The preparation of more, or highly concentrated solutions for direct injection is also contemplated, where the use of DMSO as solvent is envisioned to result in extremely rapid penetration, delivering high concentrations of the active agents to a small tumor area. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the patient being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual patient.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1: SETD8 expression in MM. A. *SETD8* gene expression in BMPCs, patients' MMCs and HMCLs. Data are MAS5-normalized Affymetrix signals (U133 plus 2.0 microarrays). Statistical difference was assayed using a t-test.

Figure 2: SETD8 gene expression in the 8 groups of the UAMS molecular classification of multiple myeloma. Gene expression profiling of MMCs of the patients of UAMS-TT2 cohort were used. PR: proliferation, LB: low bone disease, MS: MMSET, HY: hyperdiploid, CD1: Cyclin D1-Cyclin D3, CD2: Cyclin D1-Cyclin D3, MF: MAF, MY: myeloid.

Figure 3: Prognostic value of SETD8 expression in MM. (A) Lower overall survival of patients of UAMS-TT2 cohort (n=256) whose MMCs highly expressed *SETD8* gene. The splitting of the patients into two groups according to SETD8 expression in MMCs was done using the Maxstat algorithm. (B) Lower overall survival of patients of the UAMS-TT3 cohort (n=158) whose MMCs highly expressed *RECQ1* gene.

Figure 4: SETD8 is significantly overexpressed in MM patients with ch 1q21 gain and high growth proliferation index. (A) Association between SETD8 expression and patients' genetic abnormalities was completed using UAMS-TT2 cohort. (B) SETD8 expression in the different gene expression-based proliferation index groups (GPI).

Figure 5: UNC0379 treatment causes SETD8 and H4K20me1 depletion followed by DNA damage and checkpoint activation in U2OS cells. (A) Immunoblot analysis with anti-SETD8 and anti-H4K20me1 and anti-histone H4 (loading control) of U2OS cells treated with DMSO or with 10 μ M of UNC0379 for 24h. (B) Immunoblot analysis with anti-SETD8 and anti-tubulin (loading control) of DMSO treated cells or UNC0379 treated cells in presence or not of MG123 (proteasome inhibitor). (C) immunoblot analysis of whole-cell extracts with anti-tubulin (loading control), anti-phospho/CHK1 (marker of DNA damage checkpoint activation), anti-P53, anti-P21, anti- γ H2A.X (marker of DNA damage) in cells treated with DMSO or UNC0379 during 24 hours.

Figure 6: UNC0379 treatment induces myeloma cell growth inhibition, H4K20me1 depletion and DNA damages. (A) UNC0379 induces a dose-dependent inhibition of cell growth in HMCL. HMCL were cultured for 4 days in 96-well flat-bottom microtitre plates in RPMI 1640 medium, 10% fetal calf serum, 2 ng/ml interleukin six culture medium (control), and graded concentrations of UNC0379. At day 4 of culture, the viability was assessed by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. The IC50 (concentration responsible for 50% of the maximal inhibitory effect), was determined using GraphPad PRISM software. Data are mean values \pm standard deviation (SD) of five experiments determined on sextuplet culture wells. ; (B) immunoblot analysis of whole-cell extracts with anti-tubulin (loading control), anti-SETD8, anti-histone H4 (loading control), anti-H4K20me1 and anti- γ H2A.X in XG1, XG7 and XG12 HMCLs treated 24hours with DMSO or UNC0379 at 5 μ M.

Figure 7: UNC0379 treatment results in MM cell apoptosis induction. Apoptosis induction was analyzed with Annexin V APC staining by flow cytometry. The shown data is

one representative experiment and mean values \pm SD of 3 separate experiments. Statistical analysis was done with a paired t-test.

Figure 8: UNC0379 synergizes with melphalan to induce DNA damage response in MM cells. 53BP1 staining was used as marker for DNA damage. The number of 53BP1 foci found in each cell was counted, three days after doxycycline treatment. At least 300 cells were counted for each treatment group. The percentage of cells with 53BP1 foci per cell is displayed in the histograms.

Figure 9: UNC0379 induces mortality of primary MM cells from patients. Mononuclear cells from 8 patients with MM were treated with different doses of UNC0379. At day 4 of culture, the viability and total cell counts were assessed and the percentage of CD138 viable plasma cells was determined by flow cytometry. Results are median values of the numbers of myeloma cells in the culture wells. The values were compared with a Wilcoxon test for pairs.

EXAMPLE:

Material & Methods

Human Myeloma Cell Lines (HMCLs) and primary multiple myeloma cells of patients. Human myeloma cell lines HMCLs, N=40 were obtained as previously described or purchased from DSMZ and American Type Culture Collection. Microarray data are deposited in the ArrayExpress public database (accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088). Patients presenting with previously untreated multiple myeloma (N=206) or monoclonal gammopathy of undetermined significance (N=5) at the university hospitals of Heidelberg and Montpellier as well as 7 healthy donors have been included in the study approved by the ethics committee of Montpellier and Heidelberg after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Clinical parameters and treatment regimens of the MM patients included in the Heidelberg-Montpellier (HM) cohort were previously described²⁶. Gene expression profiling (GEP) of purified MMCs was assayed using Affymetrix U133 2.0 plus microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as described²⁷ and data normalized using the MAS5 Affymetrix algorithm. The .CEL and MAS5 files are deposited in the ArrayExpress public database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), under accession number E-MTAB-362. We also used publicly available MAS5 normalized GEP data (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession number GSE2658) from purified MMCs of a cohort of 345 patients treated with total therapy 2 protocol (UAMS-TT2 cohort) at the University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, USA)²⁸. T(4;14)

translocation was evaluated using *MMSET* spike expression²⁹ and del17p13 surrogated by *TP53* probe set signal³⁰ for UAMS-TT2 patients. Gene expression data of normal memory B cells (MB), preplasmasts, plasmablasts and early plasma cells^{31,32} are deposited in the ArrayExpress databases under accession numbers E-MEXP-2360 and E-MEXP-3034.

5 **Immunoblot analysis**

For immunoblot analysis, cells washed with phosphate-buffered saline (PBS) were lysed in Laemmli buffer. After measuring protein quantity by Bradford, equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with one of the following antibodies: anti-SETD8 (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-H4K20me1 (1:1000 cell signaling) anti-phospho-H2A.X-Ser139 (1:1000, millipore). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. The immunoreactive bands were detected by chemiluminescence.

Sensitivity of HMCLs to SET8 inhibitor.

15 HMCL were cultured with graded concentrations of the SETD8 inhibitor UNC0379³³. HMCL cell growth was quantified with a Cell Titer Glo Luminescent Assay (Promega, Madison, WI, USA) and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using GraphPad Prism software (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)^{17,18,34}.

Sensitivity of primary myeloma cells to SETD8 inhibitor.

20 Primary myeloma cells of 6 patients were cultured with or without graded concentrations of UNC0379 SETD8 inhibitor. MMCs cytotoxicity was evaluated using anti-CD138-PE mAb (Immunotech, Marseille, France) as described^{18,35}. Results were analyzed using GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

DNA repair foci - immunofluorescence microscopy

25 After deposition on slides using a Cytospin centrifuge, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.5% Triton in PBS and saturated with 5% bovine milk in PBS. The rabbit anti-53BP1 antibody (clone NB100-304, Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom) and the mouse anti- γ H2AX (Ser139) antibody (clone JBW301, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were diluted 1/300 and 1/100 respectively in 5% bovine milk in PBS, and
30 deposited on cytopins for 90 minutes at room temperature. Slides were washed twice and antibodies to rabbit or mouse immunoglobulins conjugated to alexa 488 (diluted 1/500 in 5% bovine milk in PBS) were added for 45 minutes at room temperature. Slides were washed and mounted with Vectashield and 1% DAPI. Images and fluorescence were captured with a ZEISS Axio Imager Z2 microscope (X63 objective) (company, town state), analyzed with

Metafer (version3.6, company, town state) and ImageJ softwares. The number of 53BP1 and γ H2AX foci was counted in at least 300 nuclei.

Statistical analysis

Gene expression data were analyzed using SAM (Significance Analysis of
5 Microarrays) software³⁶ as published²⁹. The statistical significance of differences in overall survival between groups of patients was calculated by the log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method. All these analyses have been done with R.2.10.1 (<http://www.r-project.org/>) and bioconductor version 2.5. Significantly enriched pathways were identified
10 using Reactome functional interaction map. Gene set enrichment analysis was carried out by computing overlaps with canonical pathways and gene ontology gene sets obtained from the Broad Institute³⁷.

Results

As shown in figure 1, *SETD8* gene was not significantly differentially expressed
15 between multiple myeloma cells (MMCs) of patients (median 1253, range 92 - 6928) compared to normal bone marrow plasma cells (BMPCs) (median = 1798; range: 922 – 2422)($P = NS$). However, we noticed some abnormal spiked expression in several patients ($P < 0.001$) and a relative higher expression in human myeloma cell lines (HMCLs) (median
20 1880, range 286 - 3960) compared to primary MMCs or BMPCs ($P < .001$) (Figure 1). Primary MMCs of previously untreated patients can be classified into seven molecular groups associated with different patients' survival³⁸. *SETD8* expression was not significantly deregulated in a specific subgroup of the molecular classification of MM (Figure 2). Nevertheless, a high *SETD8* expression, defined using maxstat R package²⁹, coincided with
25 shorter overall survival (OS) in two independent cohorts of newly-diagnosed MM patients ($P = 2E-4$ in the UAMS-TT2 cohort (N=256) and $P = 0.003$ in the UAMS-TT3 cohort (N=158)) (Figure 3). In addition, a significant overexpression of *SETD8* is observed in MM patients with 4 copies of chromosome regions 1q21, which are linked to a poor prognosis (Figure 4A). No significant overexpression of *SETD8* was identified in patients with deletion 17p or
30 t(4;14) translocation. There is a significant gradual increase in *SETD8* expression from patients with a low growth proliferation index (GPI)²⁶ to GPI^{medium} and GPI^{high} groups (Figure 4B). Taken together, these results suggest that *SETD8* overexpression is associated with a prognostic value in MM patients.

Given the role of SETD8 in the control of genome integrity and cell proliferation, we investigated the interest of the SETD8 inhibitor, UNC0379, to eradicate MM cells. UNC0379 treatment is efficient to decrease the levels of H4K20me1 within 24 hours, whereas no significant change was observed for other methylated histone marks such as H3K9me1 and H3K27me1 at this time in the osteosarcoma U2OS cell line (Figure 5A). Interestingly, UNC0379 treatment also caused the proteolytic degradation of SETD8, which was prevented by the inhibition of the 26S proteasome pathway by the chemical proteasome inhibitor MG132 (Figure 5B). Since SETD8 is targeted for degradation in response to DNA damage²⁰, the degradation of SETD8 upon UNC0379 might be related the appearance of DNA damage and the activation of the DNA damage checkpoint, as observed by the increase in γ H2A.X and the phosphorylation of CHK1 in UNC0379-treated cells (Figure 5C). Consistent with this, UNC0379 treatment led to the stabilization of P53 and an increase in the levels of the cell-cycle inhibitor P21 (Figure 5C). These results indicate that UNC0379 can penetrate into human cells and induce a specific inhibition of SETD8 activity followed by its proteolytic degradation via the proteasome.

The effect of UNC0379 was examined in 10 different human myeloma cell lines representative of the patients' molecular heterogeneity³⁹. As shown in figure 6, UNC0379 induced a dose dependent inhibition of cell growth in all investigated HMCLs with a median IC50 of 2.05 μ M (range: 1,24 – 9.23 μ M) (Figure 6A). As described in figure 5 for U2OS cells, this cell-growth inhibition in HMCLs resulted from a decrease in levels and activity of SETD8 upon UNC0379 treatment (Figure 6B).

By flow cytometry experiments, we showed that UNC0379 (5 mM)-mediated SETD8 inhibition is followed by apoptosis in XG1 and XG7 HMCLs with 87%, 63% of annexin-V positive respectively (Figure 7, $P < 0.05$).

These results allowed us to examine the combination of a sub-lethal dose of UNC0379 with genotoxic drugs currently used in MM treatment. UNC0379 significantly synergizes with melphalan to induce accumulation of DNA double strand breaks, as evidenced by increased accumulation of 53BP1 foci (Figure 8, $P < 0.001$, and data not shown).

We next tested the impact of UNC0379 treatment on primary myeloma cells derived from 8 distinct patients. As shown in figure 9, UNC0379 induced a significant apoptosis of primary myeloma cells from patients co-cultured with their bone marrow environment and recombinant IL-6¹⁷ (n=8). Strikingly, SETD8 inhibitor significantly reduced the median number of viable myeloma cells by 19%, 57% and 66% at respectively 1, 2.5 and 5 μ M ($P =$ NS, $P = 0.01$ and $P = 0.005$ respectively; n=8) (Figure 9) without significant toxicity on the

non-myeloma cells (Figure 9). These data demonstrated a specific toxicity of UNC0379 on myeloma cells.

Taken together, these data underline the therapeutic interest of SETD8 inhibitor in MM and especially in patients characterized by high SETD8 expression and a poor prognosis.

5

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

- 10 1. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(8):479-491.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009;113(22):5412-5417.
- 15 3. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2 Suppl 1:S4-11.
4. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J.* 2009;50(4):455-463.
- 20 5. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J Immunol.* 2013;190(6):2966-2975.
6. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood.* 2010.
7. Kaiser MF, Johnson DC, Wu P, et al. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumour suppressor genes in multiple myeloma. *Blood.* 2013.
- 25 8. Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Vanderkerken K, De Bruyne E. Epigenetic Modulating Agents as a New Therapeutic Approach in Multiple Myeloma. *Cancers.* 2013;5(2):430-461.
- 30 9. Neri P, Bahlis NJ, Lonial S. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012;21(5):733-747.
10. Neri P, Tagliaferri P, Di Martino MT, et al. In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Br J Haematol.* 2008;143(4):520-531.

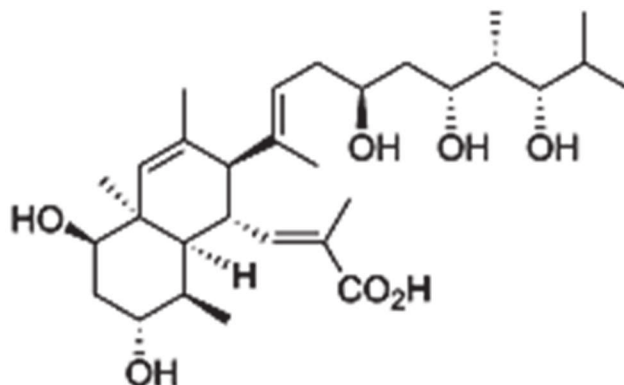
11. Minami J, Suzuki R, Mazitschek R, et al. Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013.
12. Hideshima T, Mazitschek R, Santo L, et al. Induction of differential apoptotic pathways in multiple myeloma cells by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 2013.
13. Zhang QL, Wang L, Zhang YW, et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia*. 2009;23(8):1507-1514.
14. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 2013;122(14):2331-2337.
15. Dimopoulos M, Siegel DS, Lonial S, et al. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1129-1140.
16. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1195-1206.
17. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer*. 2013;109(3):676-685.
18. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(12):2685-2692.
19. Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev*. 2012;26(4):325-337.
20. Brustel J, Tardat M, Kirsh O, Grimaud C, Julien E. Coupling mitosis to DNA replication: the emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol*. 2011;21(8):452-460.
21. Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):2797-2806.
22. Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H, et al. Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular cell*. 2007;27(4):636-646.

23. Dhimi GK, Liu H, Galka M, et al. Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis. *Molecular cell*. 2013;50(4):565-576.
24. Takawa M, Cho HS, Hayami S, et al. Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res*. 2012;72(13):3217-3227.
25. Koturbash I, Simpson NE, Beland FA, Pogribny IP. Alterations in histone H4 lysine 20 methylation: implications for cancer detection and prevention. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(2):365-374.
26. Hose D, Reme T, Hielscher T, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica*. 2011;96(1):87-95.
27. De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene*. 2002;21(44):6848-6857.
28. Barlogie B, Tricot G, Rasmussen E, et al. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood*. 2006;107(7):2633-2638.
29. Kassambara A, Hose D, Moreaux J, et al. Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2012;97(4):622-630.
30. Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood*. 2008;112(10):4235-4246.
31. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 2009;114(25):5173-5181.
32. Jourdan M, Caraux A, Caron G, et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J Immunol*. 2011;187(8):3931-3941.
33. Ma A, Yu W, Li F, et al. Discovery of a selective, substrate-competitive inhibitor of the lysine methyltransferase SETD8. *J Med Chem*. 2014;57(15):6822-6833.
34. Moreaux J, Bruyer A, Veyrune JL, Goldschmidt H, Hose D, Klein B. DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br J Haematol*. 2014;164(4):613-616.

35. Mahtouk K, Jourdan M, De Vos J, et al. An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis. *Blood*. 2004;103(5):1829-1837.
36. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA
5 microarray experiments. *Genome Biol*. 2003;4(4):210.
37. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550.
38. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple
10 myeloma. *Blood*. 2006;108(6):2020-2028.
39. Moreaux J, Klein B, Bataille R, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011;96(4):574-582.

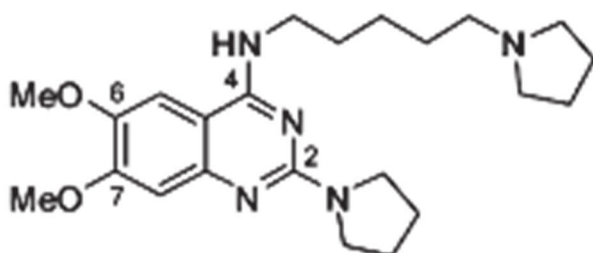
CLAIMS:

1. A method of treating multiple myeloma in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor.
2. The method of claim 1 wherein the SETD8 inhibitor is:



5

3. The method of claim 1 wherein the SETD8 inhibitor is:



4. The method of claim 1 wherein the SETD8 inhibitor is an inhibitor of SETD8 expression.

5. The method of claim 1 wherein the SETD8 inhibitor is administered to the patient in combination with at least one chemotherapeutic agent.

6. The method of claim 5 wherein the chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine,

15

triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard;

5 nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomycins, actinomycin, anthramycin, azascrine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins,

10 mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, porfiromycins, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine,

15 thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitio stanol, mepitio stanol, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; frolic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid;

20 amsacrine; bestabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziqone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguanzone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziqone; 2,2'2"-trichlorotriethylamine;

25 vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, e.g. paclitaxel and docetaxel; chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vinblastine; vincristine; vinorelbine;

30 navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; imexon; tyrosine kinase inhibitors, such as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib; proteasome inhibitors such as bortezomib thalidomide, lenalidomide corticosteroids such as prednisone and dexamethasone (Decadron®).

pomalidomide, the keto-epoxide tetrapeptide proteasome carfilzomib, the anti-CS-1 antibody elotuzumab, and histone deacetylase inhibitors of vorinostat and panabinostatand pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

- 5 7. A method for predicting the survival time of a patient suffering from multiple myeloma comprising i) determining the expression level of SETD8 in a sample of multiple myeloma cells obtained from the patient, ii) comparing the expression level determined at step i) with a predetermined reference value and iii) concluding that the patient will have a short survival time when the level determined at step i) is higher
10 than the predetermined reference value or concluding that the patient will have a long survival time when the expression level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.
8. A method of treating multiple myeloma in a subject in need thereof comprising i) determining the survival time of the patient by the method of claim 7 and ii)
15 administering to the patient a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor when it is concluded that the patient will have a short survival time.

ABSTRACT OF THE INVENTION**METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT
5 OF MULTIPLE MYELOMA**

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of multiple myeloma. In particular, the present invention relates to a method of treating multiple myeloma in a patient in need thereof comprising administering to the patient
10 a therapeutically effective amount of a SETD8 inhibitor.

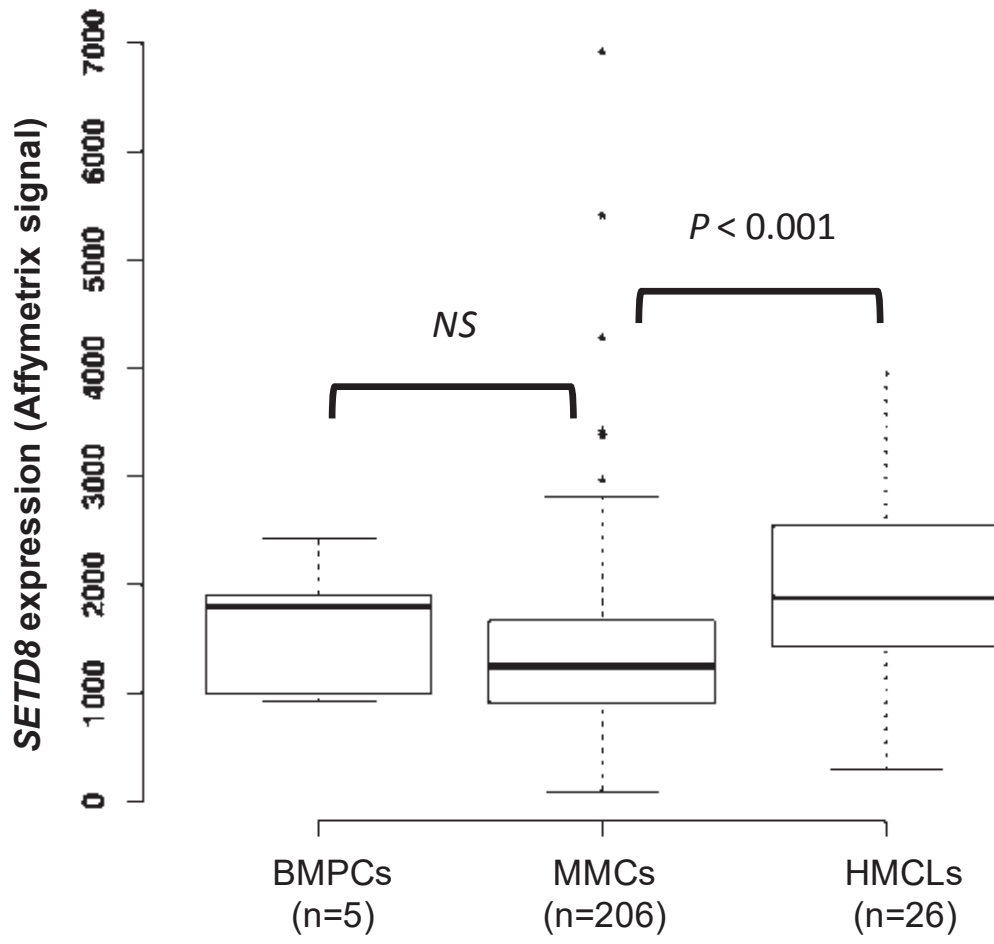


Figure 1

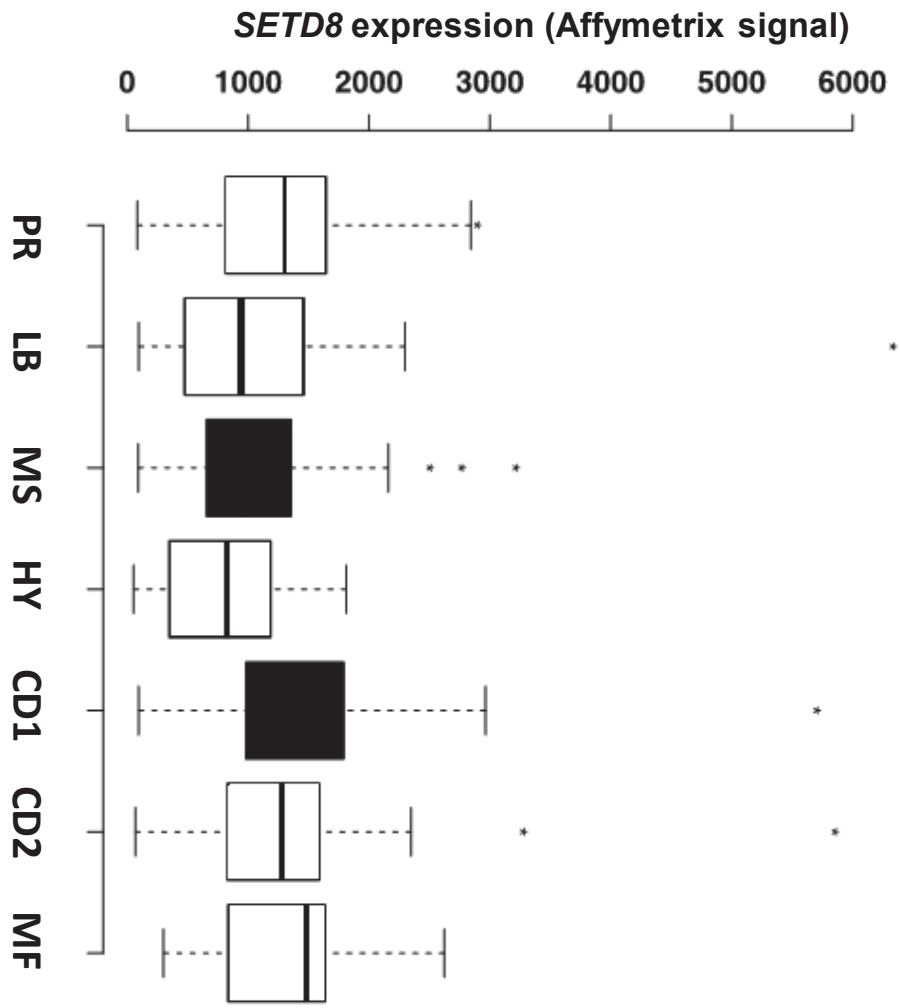


Figure 2

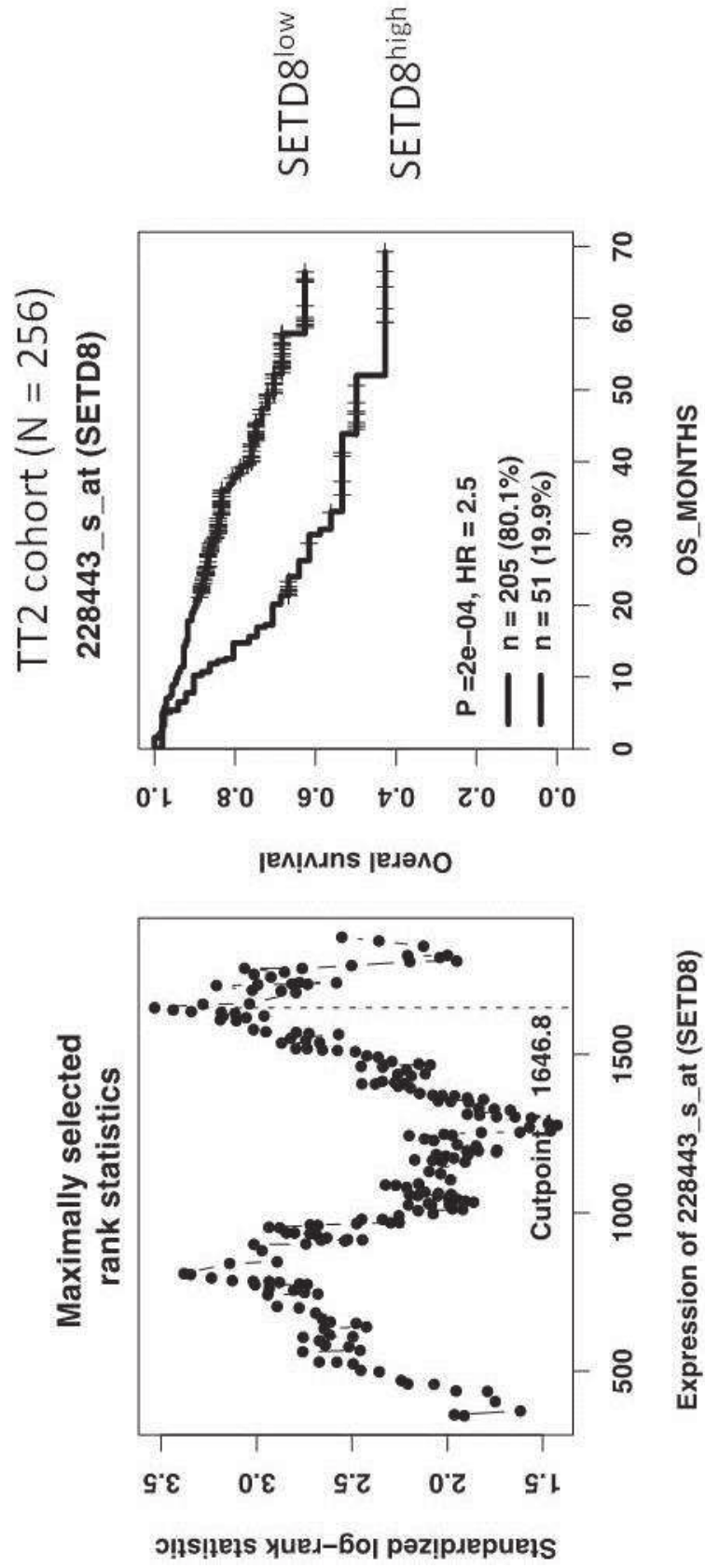


Figure 3A

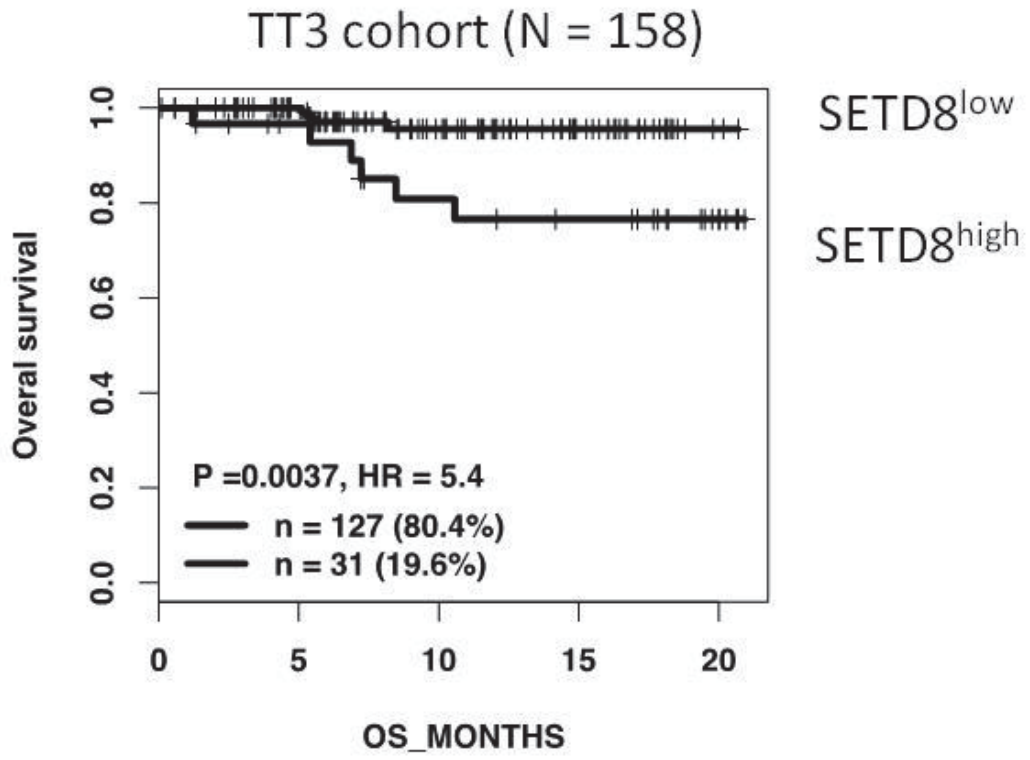


Figure 3B

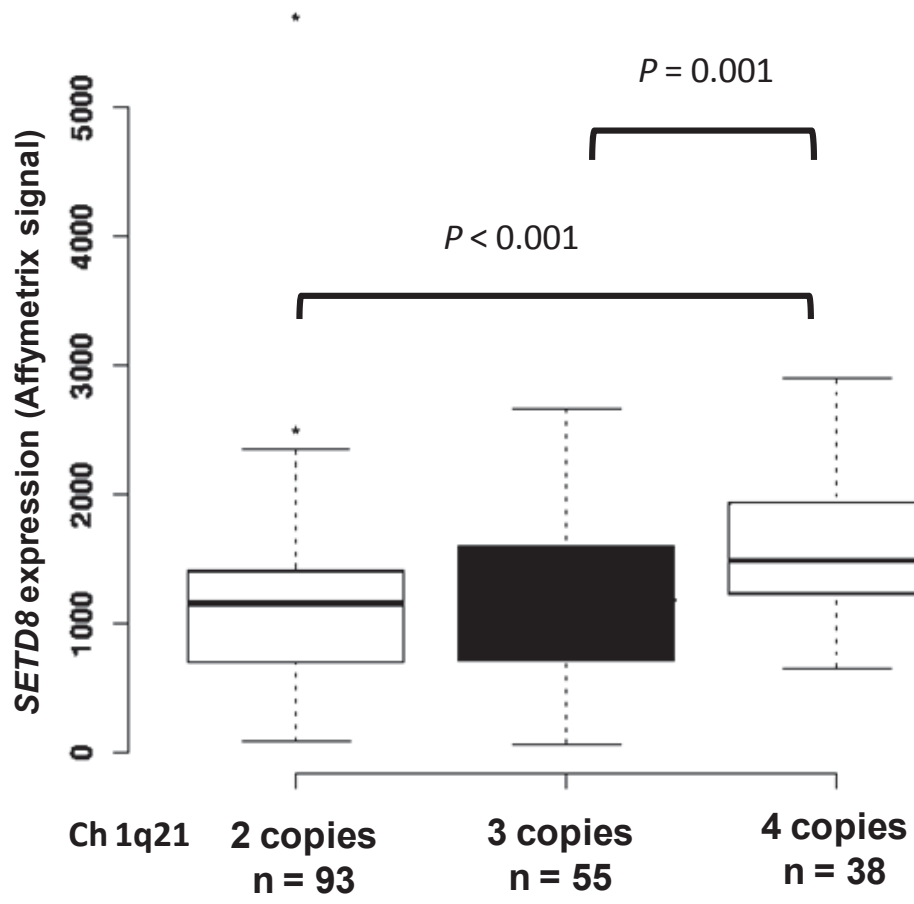


Figure 4A

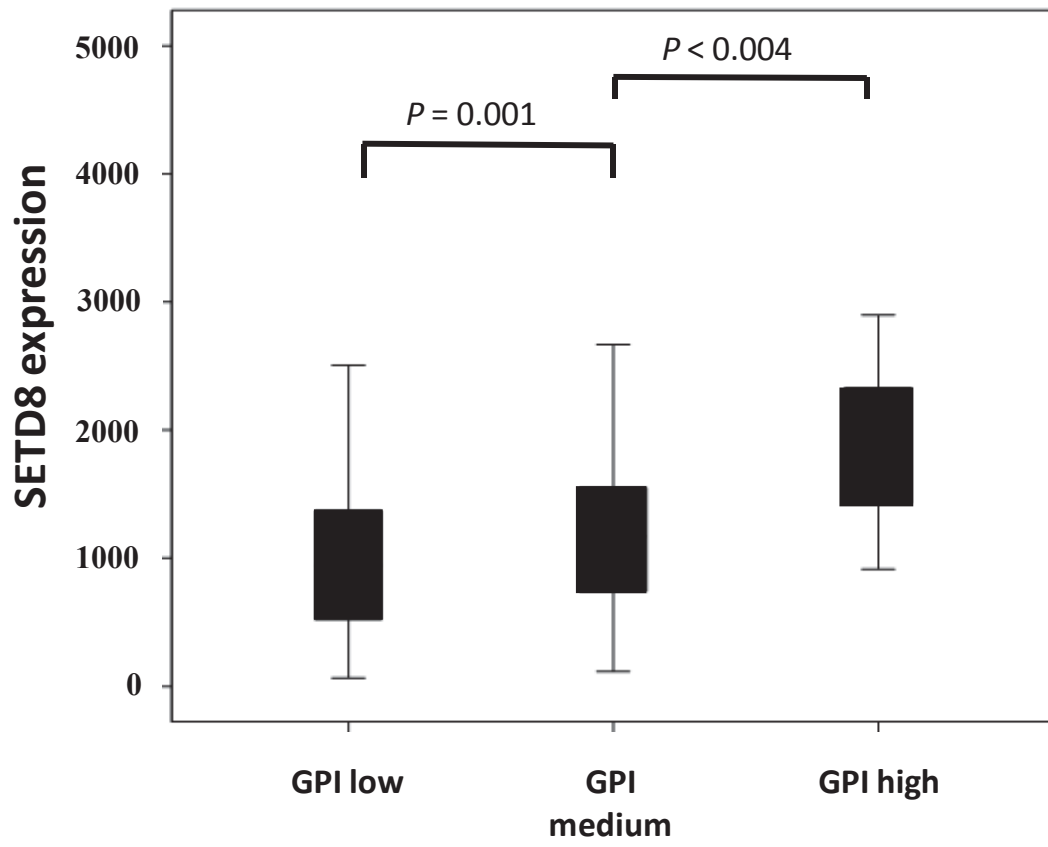


Figure 4B

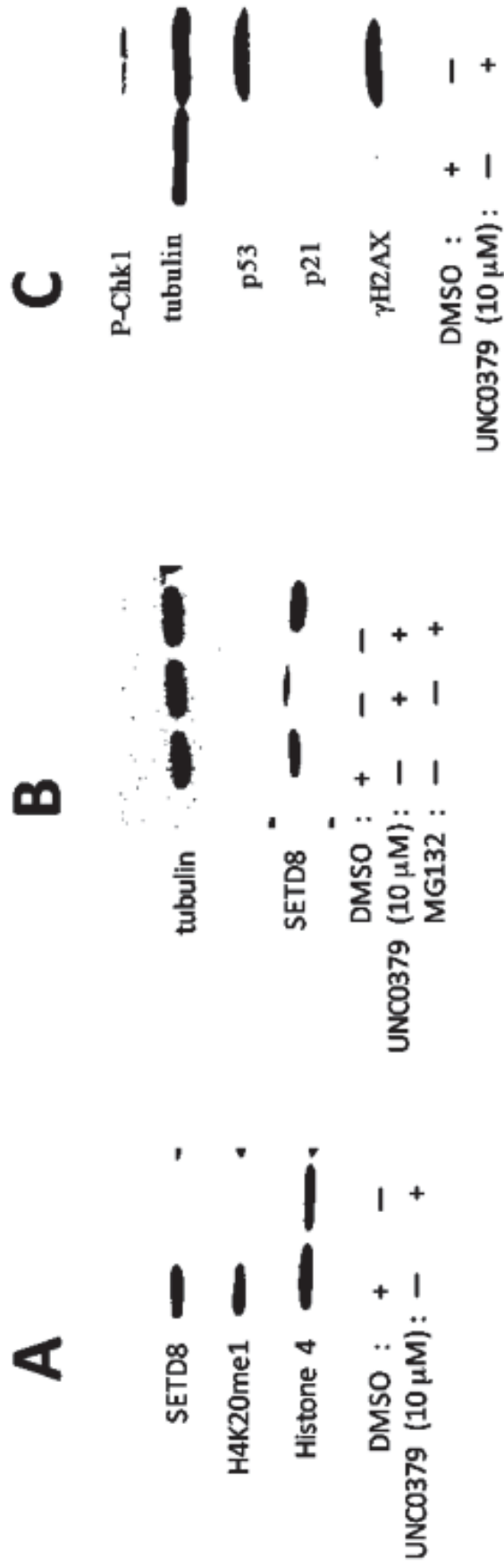


Figure 5

Figure 6A (first part)

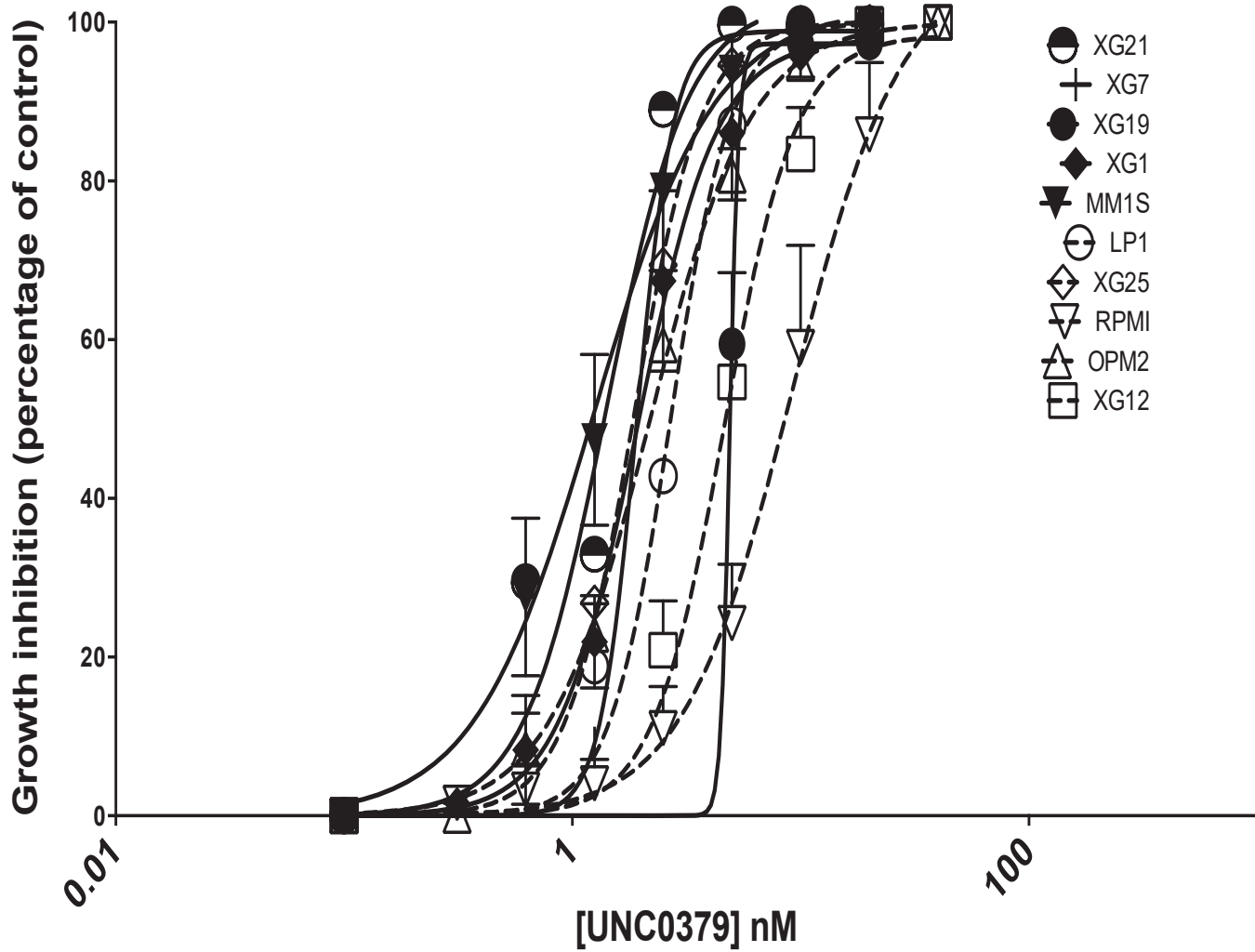
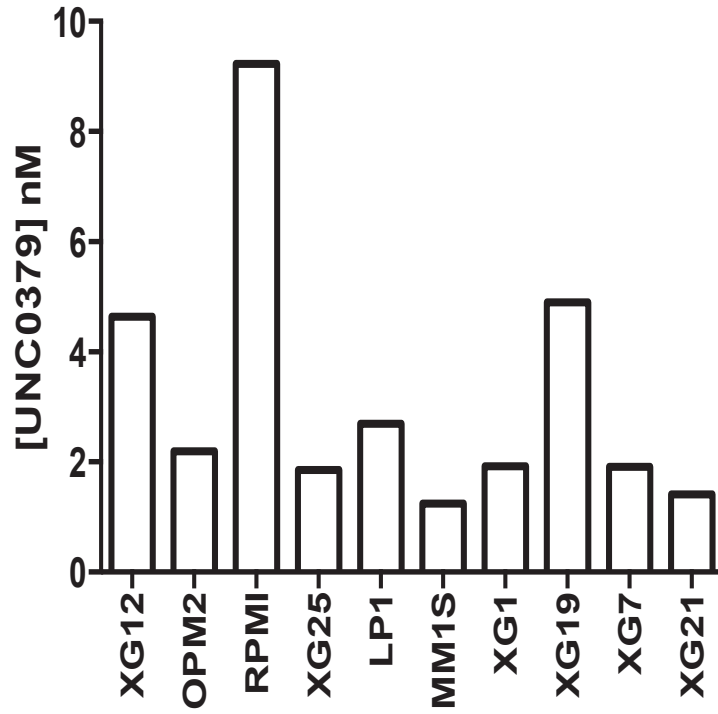


Figure 6A (second part)



| | IC50 |
|------|-----------|
| XG12 | 4.636871 |
| OPM2 | 2.1932204 |
| RPMI | 9.231498 |
| XG25 | 1.8501915 |
| LP1 | 2.693211 |
| MM1S | 1.2465082 |
| XG1 | 1.924838 |
| XG19 | 4.8992753 |
| XG7 | 1.9115778 |
| XG21 | 1.408954 |

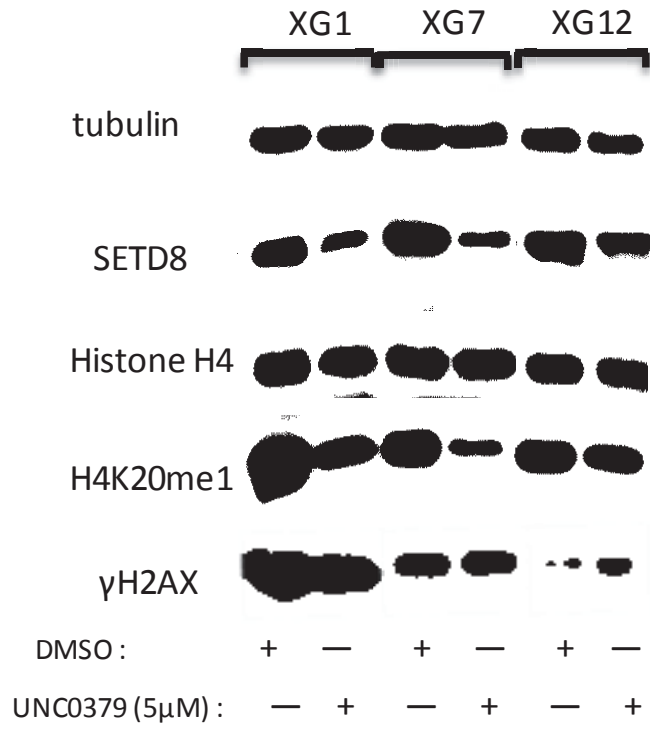


Figure 6B

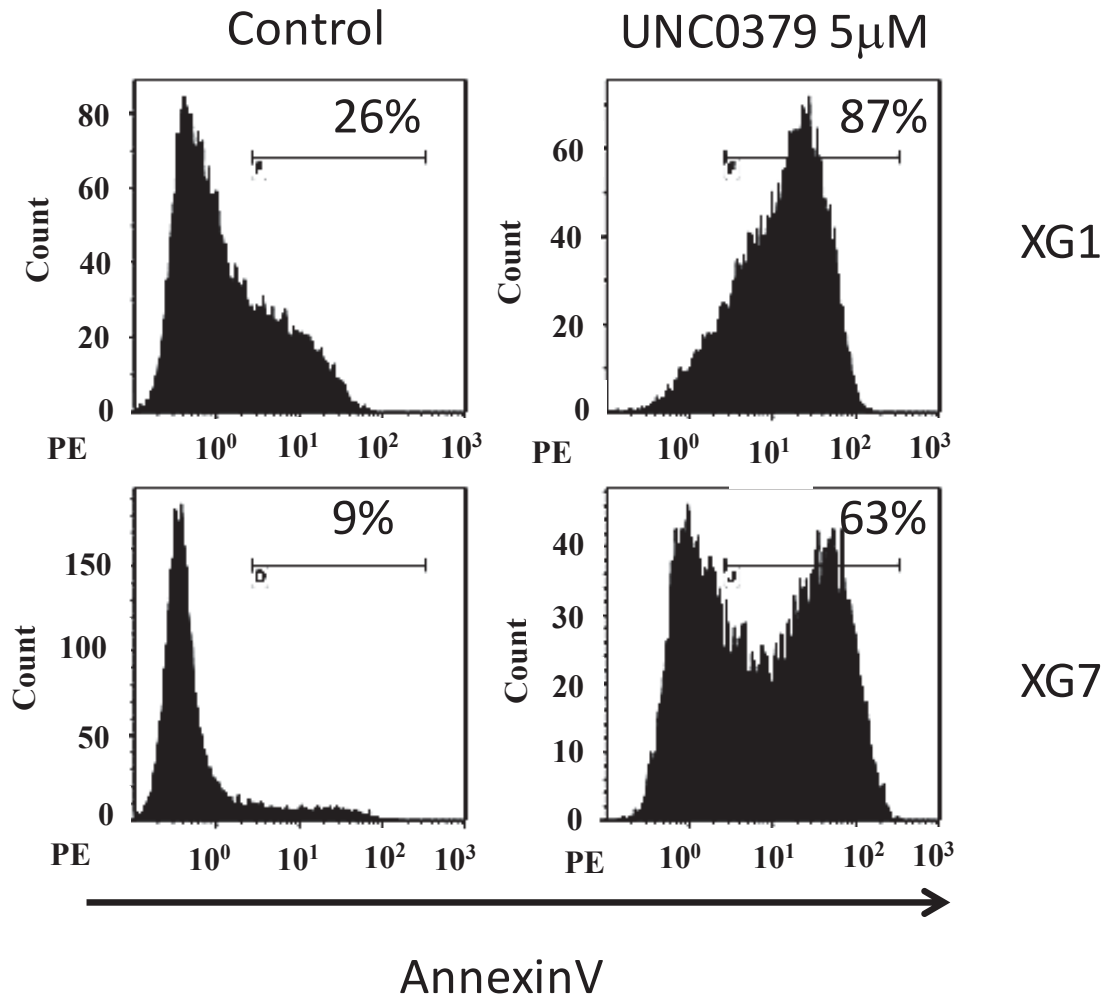


Figure 7

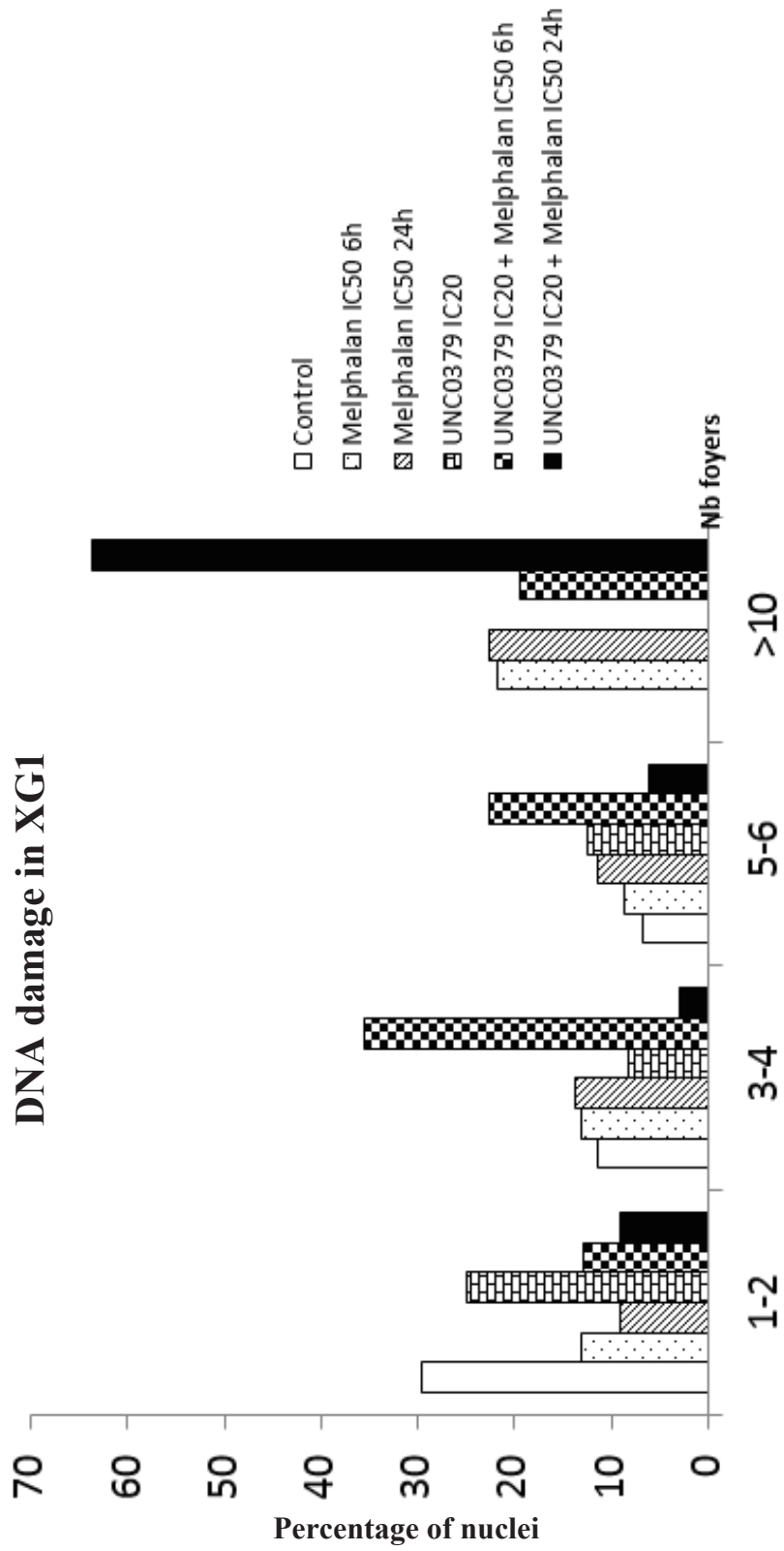
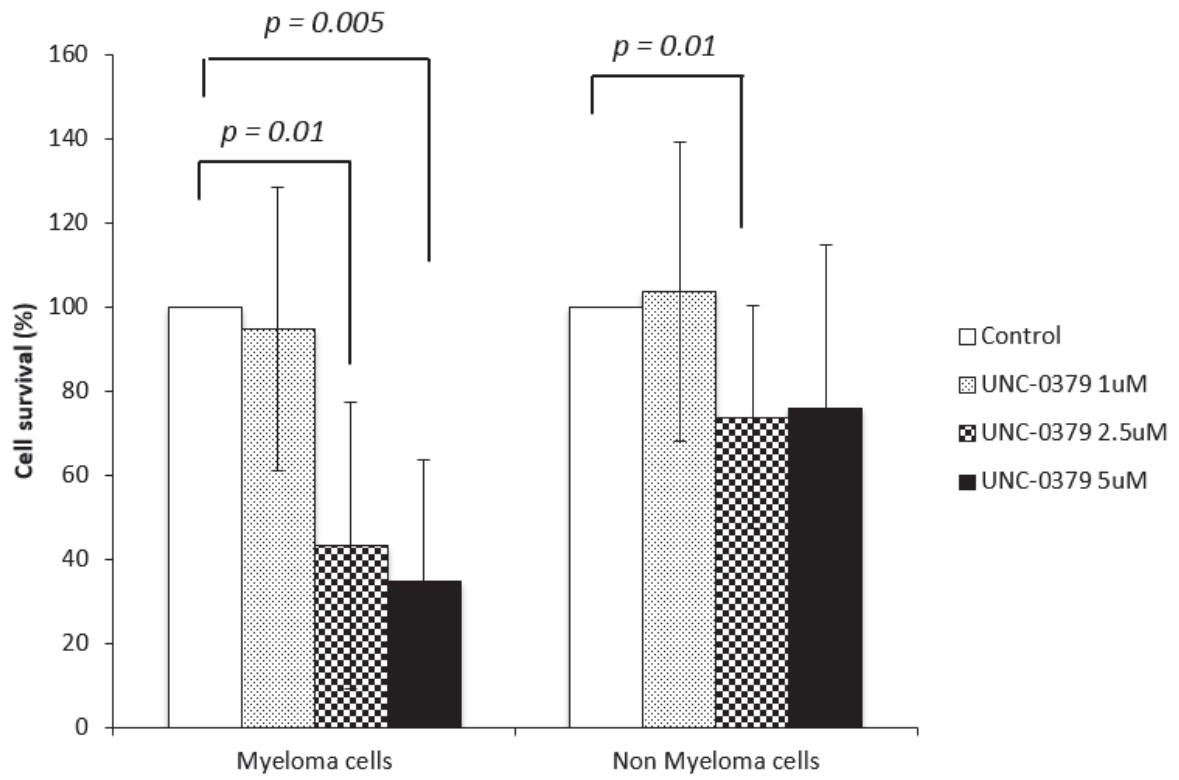


Figure 8

UNC-0379

Primary MM cells of patients; N=8 patients

Figure 9

Résumé

Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes. L'enzyme du complexe répresseur Polycomb II EZH2, capable de triméthyliser la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est impliquée dans la régulation de nombreux processus normaux, tels que le développement et la différenciation cellulaire.

Les plasmocytes jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire humorale. La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (PCD) est finement régulée par un réseau de facteurs de transcription impliqué de l'induction et le maintien de l'identité de ces deux types cellulaires. Par ailleurs, peu de mécanismes épigénétiques ont été décrits dans la PCD. En utilisant un modèle *in vitro* de PCD développé dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence une surexpression d'EZH2 dans le stade préplasmablaste (prePB) de la PCD. Grâce à l'analyse globale des séquences d'ADN associées à EZH2 et H3K27me3 dans ce type cellulaire, nous avons montré que l'enzyme était capable de réprimer l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions des lymphocytes B et des plasmocytes. EZH2 est également capable de se fixer sur le promoteur de gènes actifs dans les prePB, impliqués dans la régulation de la prolifération de ces cellules. En outre, nous avons montré que l'inhibition chimique d'EZH2 dans notre modèle résultent en une dérégulation transcriptionnelle associée à une accélération du processus de différenciation. Nos résultats suggèrent qu'EZH2 est impliqué dans le maintien de l'état transitoire, immature et prolifératif des prePBs via la régulation de gènes, dépendante et indépendante de H3K27me3, favorisant l'amplification des cellules à défaut de leur différenciation en plasmocytes.

Des anomalies de séquence ou de l'expression d'EZH2 ont été mis en évidence de nombreux cancers hématologiques et solides. Le myélome multiple (MM) est une hémopathie caractérisée par l'accumulation de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Nos travaux ont notamment permis d'identifier une surexpression des membres du complexe Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) dans les cellules de MM, en association avec leur prolifération. Afin de comprendre le rôle de PRC2 dans le MM, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité méthyltransférase d'EZH2 (EPZ-6438). L'effet de l'inhibiteur d'EZH2 sur la prolifération et la survie des cellules de MM est très hétérogène. En effet, les cellules sensibles présentent un arrêt du cycle cellulaire et entrent en apoptose. De manière intéressante, la résistance des cellules de MM à l'inhibiteur d'EZH2 pourrait être médiée induite par la méthylation des promoteurs des gènes cibles de PRC2. Nous avons ainsi établi un score (EZ-score), basé sur l'expression des gènes, permettant d'identifier des patients de mauvais pronostic pouvant bénéficier d'un traitement avec un inhibiteur d'EZH2. Nous avons également mis en évidence un effet synergique de EPZ-6438 et du Lenalidomide, un agent immuno-modulateurs utilisé en traitement conventionnelle du MM. Cette inhibition de la croissance cellulaire est notamment due à l'induction de l'expression de facteurs de transcription, spécifiques des lymphocytes B, et des suppresseurs de tumeurs en association avec la répression de l'expression de MYC. Aussi, un prétraitement avec l'inhibiteur d'EZH2 permet de surmonter la résistance des cellules tumorales au Lenalidomide.

Ces données suggèrent que le ciblage de PRC2 pourrait avoir un intérêt thérapeutique chez les patients caractérisés par un mauvais pronostic et un fort EZ-score. Ainsi, l'inhibiteur d'EZH2 pourrait également permettre de resensibiliser les patients aux chimiothérapies basées sur des agents immuno-modulateurs.

Abstract

Epigenetic mechanisms play an essential role in gene expression regulation. EZH2, the catalytic sub-unit of PRC2, is able to trimethylate the lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) and is involved in the regulation of numerous normal processes, such as development and cell differentiation. Plasma cells (PCs) play a major role in the defense of the host organism against pathogens, by producing antigen-specific antibodies. B cell differentiation into PC is mediated by a fine-tuned regulatory network of cell specific transcription factors involved in B and plasma cell identity. Although numerous key actors involved in plasma cell differentiation (PCD) have been described, most of the epigenetic mechanisms associated with this process are yet to be unveiled. Using an in vitro model of PCD developed in our laboratory, we showed that EZH2 is upregulated in the preplasmablast stage (prePB) of the PCD. By analyzing DNA sequences associated with EZH2 and H3K27me3 in this cell type, we highlighted that EZH2 is recruited to and represses through H3K27me3 a subset of genes involved in B cell and plasma cell identity. Interestingly, in prePBs and PBs, EZH2 was also found to be recruited to H3K27me3-free promoters of transcriptionally active genes known to regulate cell proliferation and DNA repair. Inhibition of EZH2 catalytic activity resulted in B to PC transcriptional changes associated with PC maturation induction together with higher immunoglobulin secretion. Altogether, our data suggests that EZH2 is involved in the maintenance of prePBs/PBs transitory immature proliferative state through H3K27me3-dependent and independent gene regulation supporting their amplification. Moreover, while EZH2 overexpression was previously shown to inhibit PCD in mice, this study highlights for the first time that EZH2 inhibition can accelerate normal human PCD by prematurely inducing a plasma cell transcriptional program.

EZH2 mutations or abnormal expression were shown to be involved in numerous hematological malignancies and solid tumors. Multiple Myeloma (MM) is a malignant plasma cell disease with a poor survival, characterized by the accumulation of myeloma cells (MMCs) within the bone marrow. We identified a significant upregulation of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) core genes in MM cells in association with proliferation. We used EPZ-6438, a specific small molecule inhibitor of EZH2 methyltransferase activity, to evaluate its effects on MM cells phenotype and gene expression profile. PRC2 targeting results in cell growth inhibition due to cell cycle arrest and apoptosis together with Polycomb, DNA methylation, TP53 and RB1 target genes induction. EZH2 inhibitor induced toxicity was heterogeneous in human myeloma cell lines and primary MM cells from patients. Interestingly, we found that MM cell resistance to EZH2 inhibitor could be mediated by DNA methylation of PRC2 target genes. We established a gene expression-based EZ-score allowing to identify poor prognosis patients that could benefit from EZH2 inhibitor treatment. We also demonstrated a synergistic effect of EPZ-6438 and Lenalidomide, a conventional drug used for MM treatment, through the activation of B cell transcription factors and tumor suppressor gene expression in concert with MYC repression. Moreover, EPZ-6438 pre-treatment was able to overcome MM cells resistance to lenalidomide. These data suggest that PRC2 targeting could have a therapeutic interest in MM patients characterized by high-risk EZ-score values, reactivating B cell transcription factors and tumor suppressor genes. EZH2 inhibitor could also re-sensitize MM patients to chemotherapies based on immunomodulatory agents.