



HAL
open science

Analyses génomiques et épigénomiques pour le développement d'une médecine de précision dans le myélome multiple

Veronika Vikova

► **To cite this version:**

Veronika Vikova. Analyses génomiques et épigénomiques pour le développement d'une médecine de précision dans le myélome multiple. Cancer. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT031 . tel-03412052

HAL Id: tel-03412052

<https://theses.hal.science/tel-03412052>

Submitted on 2 Nov 2021

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 et bioinformatique

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : CNRS UMR9002

Analyses génomiques et épigénomiques pour le développement d'une médecine de précision dans le myélome multiple

Présentée par Veronika VIKOVA

Le 08 octobre 2019

Sous la direction du Dr Jérôme Moreaux
et du Dr Alboukadel Kassambara

Devant le jury composé de

Pr Bertrand Arnulf - PU-PH
Hôpital Saint-Louis, Paris

Rapporteur

Dr Sofia Kossida - Professeur
Université de Montpellier

Examinatrice
Présidente du jury

Pr Thierry Fest - PU-PH
Université de Rennes 1

Rapporteur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

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

En biologie du cancer et bioinformatique

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : CNRS UMR9002

Analyses génomiques et épigénomiques pour le développement d'une médecine de précision dans le myélome multiple

Présentée par Veronika VIKOVA

Le 08 octobre 2019

Sous la direction du Dr Jérôme Moreaux
et du Dr Alboukadel Kassambara

Devant le jury composé de

Pr Bertrand Arnulf - PU-PH
Hôpital Saint-Louis, Paris

Rapporteur

Dr Sofia Kossida - Professeur
Université de Montpellier

Examinatrice
Présidente du jury

Pr Thierry Fest - PU-PH
Université de Rennes 1

Rapporteur



Remerciements

*Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers mon directeur de thèse, le Dr **Jérôme Moreaux**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon doctorat au sein de son laboratoire sous des conditions de travail exceptionnelles. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordé durant ces trois années qui m'ont poussé à me dépasser et à franchir constamment les limites de ma zone de confort.*

*Je remercie mon co-directeur de thèse, le Dr **Alboukadel Kassambara**, pour tout le savoir qu'il m'a transmis, sa patience, son soutien, ses conseils et sa générosité. Je ne pouvais pas rêver mieux pour débiter en bio-informatique.*

*Je remercie sincèrement le Pr **Bertrand Arnulf**, le Pr **Thierry Fest** et le Dr **Sofia Kossida** pour avoir évalué ce travail.*

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à **Françoise** et **Georges Bony** pour leur soutien et le financement de cette thèse au travers de leur association Guillaume Espoir.*

Un grand merci à l'ensemble des membres passés et présents de l'équipe du Dr Jérôme Moreaux (STI & UMR9002) ainsi qu'à l'équipe Diag2tec. Merci pour votre accueil, pour tous les moments que l'on a passé ensemble et toutes ces discussions (parfois très philosophiques ; - p) que l'on a eue autour d'un ~~bon~~ café !

*Je tiens également à remercier **Elsa Compte**, ma mentor de l'association femmes & sciences, pour tous ses précieux conseils et sa grande disponibilité.*

*D'un point de vue personnel je remercie la team **CrossFit B52** pour toute la joie, les fous rires et les soirées mémorables que l'on a passé ensemble. Merci pour tous ces WODs que l'on a partagé et qui nous ont bien fait morfler (vive le Murph !).*

*Je remercie mon conjoint, **Robin Marius**, qui me soutient depuis maintenant presque 10ans, m'encourage avec une confiance sans faille dans tous mes projets et fait ressortir le meilleur de moi-même au quotidien. Merci également à mes beaux-parents, **Martine** et **Michel Marius** pour votre gentillesse, votre soutien et vos conseils.*

*Enfin, je dédie l'ensemble de ce travail à ma famille : mes parents **Kalin Vikov** et **Maria Vikova** et à mon frère **Deian Vikov**. Je ne les remercierai jamais assez de m'avoir donné la chance de réaliser toutes mes ambitions, de toujours croire en moi et d'avoir toujours été d'un soutien inconditionnel.*

Résumé

Le myélome multiple (MM) est le second cancer hématologique le plus répandu après les lymphomes. Malgré une amélioration de sa prise en charge au cours des 20 dernières années, les traitements actuels ne permettent pas d'éviter les rechutes répétitives associées au développement de mécanismes de résistance. Les résistances aux traitements sont notamment expliquées par la forte hétérogénéité de la maladie qui rend nécessaire le développement de prises en charges adaptées aux profils moléculaires des patients. L'avènement des technologies de séquençage haut-débit permet d'accéder à des niveaux de plus en plus détaillés de l'hétérogénéité moléculaire tumorale, ce qui permettra de proposer des solutions plus performantes dans l'optique de développer une médecine personnalisée. Dans cet objectif, nous avons analysé l'exome, le transcriptome et l'épigénome de cellules primaires de patients et de lignées cellulaires de MM. Sur la base de ces analyses, nous avons non seulement mis en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie du MM mais également de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, des biomarqueurs pronostiques ainsi que des signatures d'orientation thérapeutiques. Les données et résultats de nos études constituent une ressource d'intérêt pour la communauté scientifique et permettront d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de MM.

Mots clés : myélome multiple / hématologie / médecine personnalisée / génomique / transcriptomique / épigénomique / bioinformatique

Summary

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological malignancy after lymphoma. Recent advances in treatment have led to an overall survival of intensively-treated patients of 6-7 years. However, patients invariably relapse after multiple lines of treatment, with shortened intervals between relapses, and finally become resistant to all treatments, resulting in loss of clinical control over the disease in association with drug resistance. Treatment improvements will come from a better comprehension of tumorigenesis and detailed molecular analyses to develop individualized therapies taking into account the molecular heterogeneity and subclonal evolution. In this purpose, we analyzed the exome, transcriptome and epigenome of primary MM cells from patients and human MM cell lines. Our results have highlighted new mechanisms involved in the pathophysiology of MM as well as potential new therapeutic targets, prognostic signatures and theranostic biomarkers. The data and results of our studies represent an important resource to understand the mechanisms of tumor progression and drug resistance and develop new ways to diagnose and treat patients.

Key words : multiple myeloma / hematology / personalized medicine / genomics / transcriptomics / epigenomics / bioinformatics

Table des matières

TABLE DES MATIERES	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
LISTE DES ABBREVIATIONS	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	12
LE MYELOME MULTIPLE	14
I. DEFINITION GENERALE	14
II. ORIGINE ET EVOLUTION	14
1. <i>La phase terminale de la différenciation des lymphocytes B</i>	14
2. <i>La différenciation plasmocytaire normale (NPCD)</i>	17
3. <i>Le microenvironnement</i>	19
4. <i>Genèse des plasmocytes tumoraux et progression de la maladie</i>	20
III. DIAGNOSTIC ET SYSTEME DE STRATIFICATION	22
IV. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....	25
APPROCHES OMIQUES APPLIQUEES A L'ETUDE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE DU MM ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES	29
I. GENOME	29
1. <i>Aberrations génétiques</i>	29
2. <i>Apport du NGS</i>	30
3. <i>Implications thérapeutiques</i>	34
II. TRANSCRIPTOME.....	35
1. <i>Apports de la transcriptomique dans l'étude du MM</i>	35
2. <i>Etude des mécanismes post-transcriptionnels</i>	36
3. <i>Transcriptomique, biomarqueurs et thérapie ciblée</i>	38
III. EPIGENOME.....	40
1. <i>La méthylation de l'ADN</i>	40
2. <i>Les marques histones</i>	42
3. <i>Interactions entre méthylation de l'ADN et modifications des histones</i>	44
4. <i>Approches thérapeutiques en lien avec l'épigénome</i>	46
OBJECTIFS	48
RESULTATS	49
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	95
I. ANALYSES GENOMIQUES	95
II. ANALYSES EPIGENOMIQUES	97
III. ANALYSES MULTI-OMIQUES	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102

Table des illustrations

Figures de l'introduction

- Figure 1** Utilisation des données omiques pour l'amélioration de la prise en charge des patients (p.12).
- Figure 2** Représentation de la phase terminale de la différenciation des cellules B (p.15).
- Figure 3** Principaux facteurs et interactions qui entrent en jeux dans la différenciation terminale des LB (p.16).
- Figure 4** Etapes de la différenciation plasmocytaire normale et caractéristiques majeures (p.18).
- Figure 5** Composition cellulaire des niches de MO et acteur moléculaires importants dans la survie des plasmocytes (p.19).
- Figure 6** Progression du MM et événements génétiques (p.21).
- Figure 7** Prise en charge thérapeutiques au diagnostic (p.25).
- Figure 8** Prise en charge thérapeutique à la rechute (p.27).
- Figure 9** Gènes fréquemment mutés chez les patients retrouvés dans la littérature (p.31).
- Figure 10** Représentation de l'hypothèse d'évolution linéaire et en branchement des clones tumoraux (p.32).

Tableaux de l'introduction

- Tableau 1** Critères diagnostic à chaque niveau de progression du MM (p.22).
- Tableau 2** Facteurs de risque standards, système de stratification standard et revisité (p.23)
- Tableau 3** Critères de réponse aux traitements (p.26)
- Tableau 4** Caractéristiques des sous-groupes moléculaires du MM (p.30)
- Tableau 5** Thérapies ciblant des altérations génétiques majeur en phase d'essai clinique dans le MM ou autres cancers (p.34)

Figures des projets

Projet exome p.54-61

Projet transcriptome p.82-85

Projet méthylation p.89-93

Liste des abreviations

A

Ag : antigène
AID : activation induced cytidine deaminase
AML : leucémie aiguë myéloblastique
ASCT : transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques

B

BCR : B cell antigen receptor
BER : Base excision repair

C

CGIs : îlots CpGs
ChiP : chromatin immunoprecipitation
CNV : copy number variation
CRAB : hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésions osseuse (bones)
CRE : éléments cis-régulateurs
CSR : recombinaison à commutation de classe

D

DSB : double strand break

E

EFS : event free survival
ERRBS : enhanced reduced representation bisulfite sequencing

F

FDA : food and drug administration
FDC : follicular dendritic cells
FPS : free progression survival

G

GC : centre germinatif
GEP : gene expression profiling

H

HMCL : human myeloma cell lines
HR : homologous recombination

I

ICL : interstrand crosslink
Igs : immunoglobulines

IGH : immunoglobulin heavy locus
IMWG : international myeloma working group
ISS : international staging system

J

K

L

LB : lymphocyte B
LDH : lactate déshydrogénase
LncRNA : long non coding RNA
LOH : loss of heterozygosity
LT : lymphocyte T
LT_{FH} : lymphocyte T follicular helper

M

ME : microenvironnement
MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance
miR : microRNA
MM : myélome multiple
MMC : cellules de myélome multiple
MMR : mismatch repair
MO : moelle osseuse
MRD : détection de la maladie résiduelle
MRI : imagerie à résonance magnétique
mRNA : ARN messagers

N

NER : Nucléotide excision repair
NGS : next generation sequencing
NHEJ : non homologous end joining
NPC : plasmocytes normaux
NPCD : differentiation plasmocytaire normale

O

OS : overall survival

P

PB : plasmablaste
PC : plasmocyte
PCL : leucémie plasmocytaire

PET-CT : tomographie par émission de positrons-tomographie informatisée
pre-PB : pre-plasmablaste

Q

R

RNAseq : RNA sequencing

S

SHM : somatic hypermutation
SNP : single nucleotide polymorphisme
SNV : single nucléotide variation
SMM : asymptomatic smoldering multiple myeloma

T

U

UAMS : university of arkansas of medical science

UPR : unfolded protein response

V

W

WES : whole exome sequencing

WGS : whole genome sequencing

WGBS : whole genome bisulfite sequencing

Introduction générale

Le cancer est une maladie complexe définie par une prolifération cellulaire anarchique et incontrôlée. Les cellules normales évoluent progressivement vers un état néoplasique en acquérant une succession de nouvelles capacités. Celles-ci incluent un maintien de la signalisation en lien avec la prolifération, l'échappement aux suppresseurs de tumeurs, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répliquative, l'induction de l'angiogenèse et l'activation des processus d'invasion et de métastases. Sous-jacente à ces caractéristiques, l'instabilité génomique est à l'origine de la diversité génétique clonale qui facilite l'acquisition de ces capacités [1]. Malgré des avancées considérables dans la compréhension des cancers, une grande partie des mécanismes participant à l'initiation et au développement tumoral reste inconnue ce qui est un frein au développement de thérapies efficaces.

Le domaine des omiques s'est développé depuis le lancement de l'Human Genome Project en 1990 qui visait à déterminer entièrement la séquence génétique du génome humain. Les technologies développées depuis permettent d'analyser précisément les gènes (génomique), les marques épigénétiques (épigénomique), les ARNs (transcriptomique), les protéines (protéomique), les métabolites (métabolomique) et l'imagerie médicale (radiomique) [2]. Contrairement aux méthodes classiques qui interrogent de façon individuelle les caractéristiques cellulaires, elles permettent une étude globale d'un ensemble de molécules ou de traits. A ce titre elles génèrent une grande quantité de données, dites de « haut débit », nécessitant un traitement spécifique. Durant ces 20 dernières années les évolutions technologiques dans le domaine ont été considérables. Elles ont notamment vu un passage des technologies basées sur des puces (ADN, ARN, méthylation), permettant d'interroger un nombre limité de caractères, vers le NGS (Next Generation Sequencing) permettant une lecture fine de l'ensemble du génome (WGS – Whole Genome Sequencing) ou de sa partie codante (WES - Whole Exome Sequencing), du transcriptome (RNAseq - RNA sequencing) et du méthylome (ERRBS – Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing ou WGBS – Whole Genome Bisulfite Sequencing). La baisse considérable des coûts liés à la technologie, associée au développement d'une carte du génome de référence de bonne qualité, de modèles statistiques rigoureux, de nouvelles méthodes et algorithmes d'analyse a permis de mieux comprendre les caractéristiques moléculaires des cancers et a ouvert de nouvelles opportunités pour la prise en charge thérapeutique de la maladie [3]. L'analyse des données omiques de nombreux patients a notamment ouvert la voie vers la médecine personnalisée avec la

découverte de biomarqueurs pronostiques, de scores permettant de prédire la réponse aux traitements, l'amélioration du diagnostic et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques [4] (**Figure 1**).

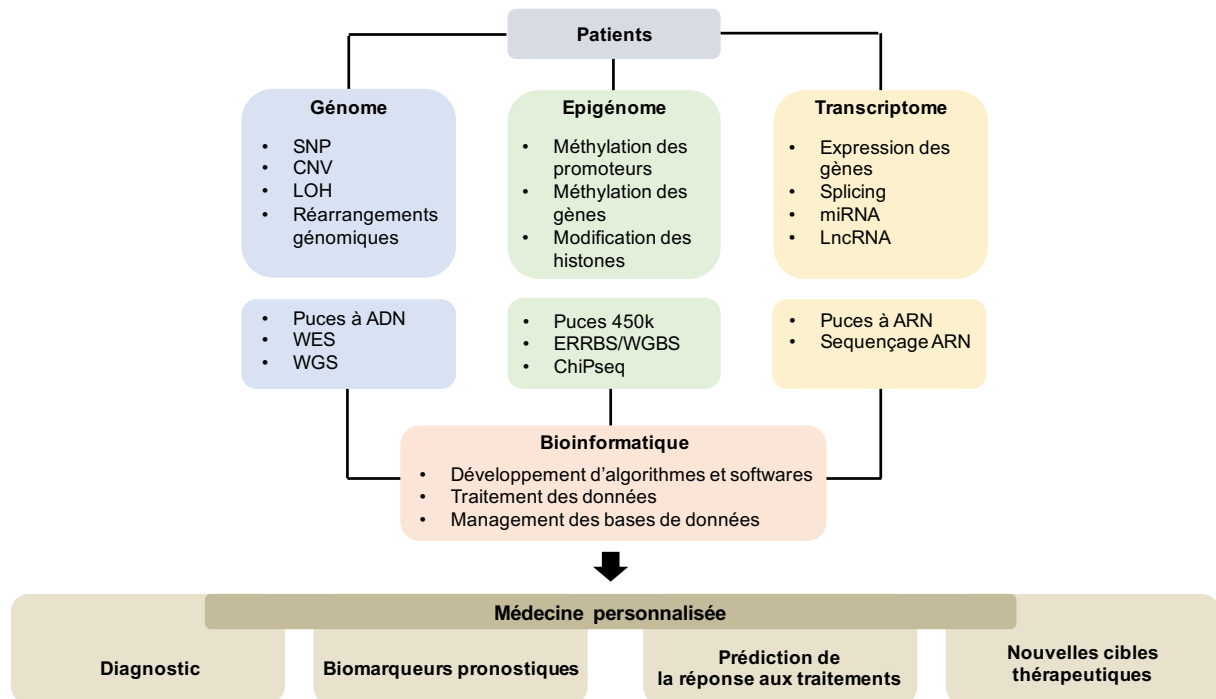


Figure 1 : Utilisation des données omiques pour l'amélioration de la prise en charge des patients [4]. SNP – single nucleotide polymorphisme ; CNV – copy number variation ; LOH – loss of heterozygosity ; WES – whole exome sequencing ; WGS – whole exome sequencing ; ERRBS – Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing ; WGBS – Whole Genome Bisulfite Sequencing ; ChIP – Chromatin Immunoprecipitation ; LncRNA – long non coding RNA

Dans ce contexte, mon travail de doctorat a porté sur l'étude de l'hétérogénéité moléculaire d'un cancer hématologique incurable, le myélome multiple (MM), par l'utilisation de données génomiques (WES), transcriptomiques (RNAseq, puces) et épigénétiques (ERRBS, puces 450k). Il se divise en trois parties majeures : la première définit le MM, ses origines et les aspects cliniques; la seconde dresse un état de l'art des connaissances sur la caractérisation génomique, transcriptomique et épigénétique du MM en mettant en évidence le potentiel thérapeutique apporté par ces connaissances; la troisième présente les résultats du projet de thèse et leur contribution dans le domaine.

Ce projet de thèse s'inscrit dans l'objectif global d'une meilleure caractérisation de la physiopathologie du MM ce qui contribuera au développement d'une médecine personnalisée.

Le myélome multiple

I. Définition générale

Le myélome multiple (MM) est un cancer hématologique caractérisé par la prolifération clonale de cellules plasmocytaires tumorales dans la moelle osseuse.

Avec une incidence s'élevant à 110 000 nouveaux cas par an dans le monde, le MM est le second cancer hématologique le plus répandu après les lymphomes. La maladie concerne les personnes âgées avec un âge médian au diagnostic s'élevant à 69 ans et comprenant 3/4 des patients diagnostiqués au-dessus de 55 ans. Les hommes sont plus touchés que les femmes avec respectivement une incidence de 7.7 et 4.9 pour 100 000 personnes. La population afro américaine est deux à trois fois plus touchée que la population caucasienne, les causes de cette différence ne sont pas connues. Certaines études ont mis en évidence une incidence plus élevée de la maladie chez des groupes de personnes ayant été exposées à des radiations nucléaires ou à des produits chimiques mais ces résultats restent controversés [5]. L'étude des facteurs génétiques a mis en évidence des loci associés à un risque significativement plus important de développer un MM et un risque deux fois plus élevé chez les patients ayant un proche de premier degré atteint. De façon générale, les causes du MM ne sont pas encore clairement définies. Les signes cliniques majeurs de la pathologie sont l'hypercalcémie, une insuffisance rénale, une anémie et des lésions osseuses. Des avancées considérables ont été réalisées concernant la prise en charge thérapeutique du MM au cours de ces 20 dernières années avec une amélioration des taux de survies de 5 à 10 ans. Néanmoins la maladie demeure sans traitement efficace dans la vaste majorité des cas et nécessite le développement de nouvelles thérapies [5–8].

II. Origine et évolution

1. La phase terminale de la différenciation des lymphocytes B

La production d'anticorps est l'un des mécanismes les plus importants pour la réponse immunitaire. Elle est responsable de l'immunité humorale en réponse à la présence d'un antigène (Ag) dans l'organisme. Cette production est assurée par des populations de cellules rares, les plasmocytes (PCs), qui représentent le stade final de différenciation de la lignée cellulaire B. Cette différenciation débute dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) par la rencontre d'un

lymphocyte B (LB) naïf avec un antigène. La reconnaissance de l'antigène se fait grâce au BCR (B cell antigen receptor) et elle conduit à l'activation de la cellule B. Cette étape est dite T-dépendante puisqu'elle nécessite l'intervention des lymphocytes T (T_{FH} : T follicular helper) pour l'activation complète du LB. Le LB ainsi activé prolifère et forme le centre germinatif (GCs) ou follicule secondaire. Ces structures transitoires sont composées de deux zones, sombre et claire, au sein desquelles se déroulent les processus étant à la base de la génération d'anticorps à haute affinité. La zone sombre est constituée de LB qui prolifèrent fortement et sont nommés centroblastes. Les LB de cette zone expriment fortement AID (activation-induced cytidine deaminase) qui catalyse la conversion des bases cytosines en bases uraciles dans l'ADN. Des mutations ponctuelles dans les gènes qui codent pour les immunoglobulines sont générés lors de la réparation de ces modifications. Ce processus porte le nom d'hypermutation somatiques (SHM) et est responsable de la formation de clones d'affinité différente pour les Ag. La zone claire est moins compacte et contient plusieurs types cellulaires. Les lymphocytes y sont appelés centrocytes et côtoient les cellules dendritiques folliculaires. Leur rôle est de capturer un antigène à long terme ce qui permettra par la suite de tester l'affinité du LB activé. Ainsi les centroblastes migrent vers la zone claire où leur spécificité aux antigènes est testée. Les clones autoréactifs ou présentant une faible affinité entrent en apoptose ou dans un nouveau cycle de SHM. Les clones présentant une haute affinité sont sélectionnés et subissent la recombinaison à commutation de classe (CSR), ce qui marque le début de leur différenciation en cellules B mémoires ou en PCs (**Figure 2**). La CSR est également initiée par AID, les bases uraciles sont dans ce cas converties en cassures doubles brins pour permettre la recombinaison. Les mécanismes sous-jacents contrôlant l'engagement du LB activé vers la voie de la différenciation plasmocytaire normale ne sont pas encore tout à fait bien établis. Ils feraient intervenir les T_{FH} et la signalisation du BCR [9,10].

Ces différentes étapes sont finement régulées par un réseau complexe de facteurs de transcriptions. Nous pouvons catégoriser les facteurs majeurs en deux groupes, ceux étant impliqués dans l'identité B et la formation du CG (*BCL6*, *PAX5*, *BACH2*) et ceux étant spécifiques aux plasmocytes (*PRDM1*, *IRF4* et *XBPI*) (**Figure 3**).

La formation et la fonction des GCs sont régies par BCL-6 (B cell lymphoma-6) qui promeut le cycle cellulaire et la prolifération en réprimant les gènes *CCND2*, *CDKN1A* et *CDKN1B* [11,12]. Il est également impliqué dans la répression des gènes responsables de la détection de la réponse des dommages à l'ADN (*P53*, *ATR* et *CHEK1*), permettant ainsi une tolérance aux mutations somatiques [12,13]. Avec *PAX5*, il promeut l'expression de AID et participe ainsi à la diversification et à l'augmentation de l'affinité des immunoglobulines [14]. Par ailleurs,

lorsque *BCL-6* et *PAX5* sont exprimés, ils inhibent les facteurs majeurs responsables de la formation des PCs [12]. *BACH2* est un répresseur transcriptionnel inhibé dans les plasmocytes. Il a été montré que ce gène retarde la différenciation plasmocytaire pour permettre la CSR des immunoglobulines (Ig) [15,16].

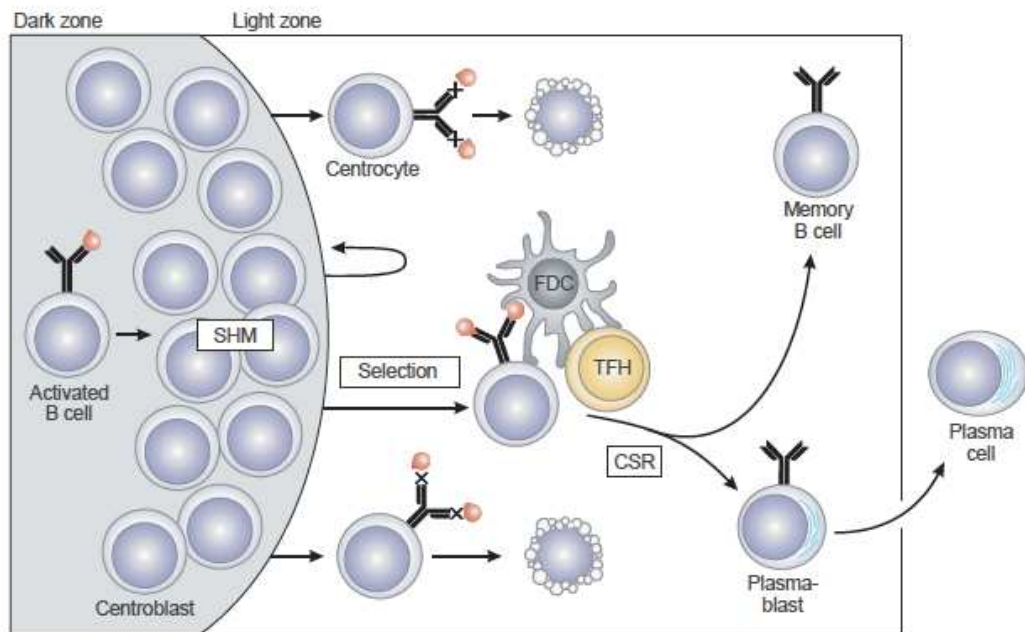


Figure 2 : Représentation de la phase terminale de la différenciation des cellules B [12]

CSR : recombinaison à commutation de classes ; FDC : cellule dendritique folliculaire ; TFH : Lymphocyte T helper ; SHM : hypermutations somatiques.

Les facteurs spécifiques aux plasmocytes sont essentiels pour l'inhibition du programme transcriptionnel des cellules B et la mise en place du programme transcriptionnel des cellules plasmocytaires. Ce dernier doit permettre aux cellules de produire une grande quantité d'immunoglobulines ainsi que leur migration et survie dans les niches de la moelle osseuse. *PRDMI* est un acteur central de la mise en place du programme de différenciation plasmocytaire. Il agit sur les facteurs de l'identité B qui interviennent dans la signalisation du BCR, dans la SHM et la CSR, dans l'interaction avec les LT, et dans l'expression de gènes clés comme *BCL6*, *MYC*, *AID* et *PAX5* [17]. Il est responsable du blocage de la prolifération, une caractéristique spécifique des PCs, et contrôle l'expression de gènes importants pour l'activité de sécrétion d'immunoglobulines tel que *XBPI* [18]. Il a été montré que ce facteur est essentiel et suffisant à la production de PC matures mais non requis pour l'initiation du programme transcriptionnel plasmocytaire [19]. *PRDMI* est réprimé dans les lymphocytes B matures par *PAX5*, *BACH2* et *BCL6* [20,21]. Dans les plasmocytes son expression est régulée par *IRF4* qui

permet la transition vers le programme plasmocytaire [22]. L'effet de *IRF4* sur la différenciation dépend de son niveau d'expression. Une faible expression d'*IRF4* est responsable de la promotion du GC et de la CSR via la régulation d'*AID*, *POU2AF1* et *BCL-6* [23]. Une forte expression d'*IRF4* participe à la différenciation plasmocytaire au travers de la répression de *BCL-6* et l'activation de *PRDM1* [22]. La fonction de base des plasmocytes est une forte sécrétion d'immunoglobulines. Celle-ci s'accompagne d'un taux élevé de protéines mal conformées et engendre un stress du reticulum endoplasmique. *XBPI* est induit en réaction à ce stress et permet la mise en place de l'UPR qui, en association avec le protéasome, régule ce phénomène [24].

La production de la forme active de XBP1 passe par la génération d'une forme alternative par épissage au travers de IRE1 qui clive l'ARNm d'une séquence de 26 nucléotides [24].

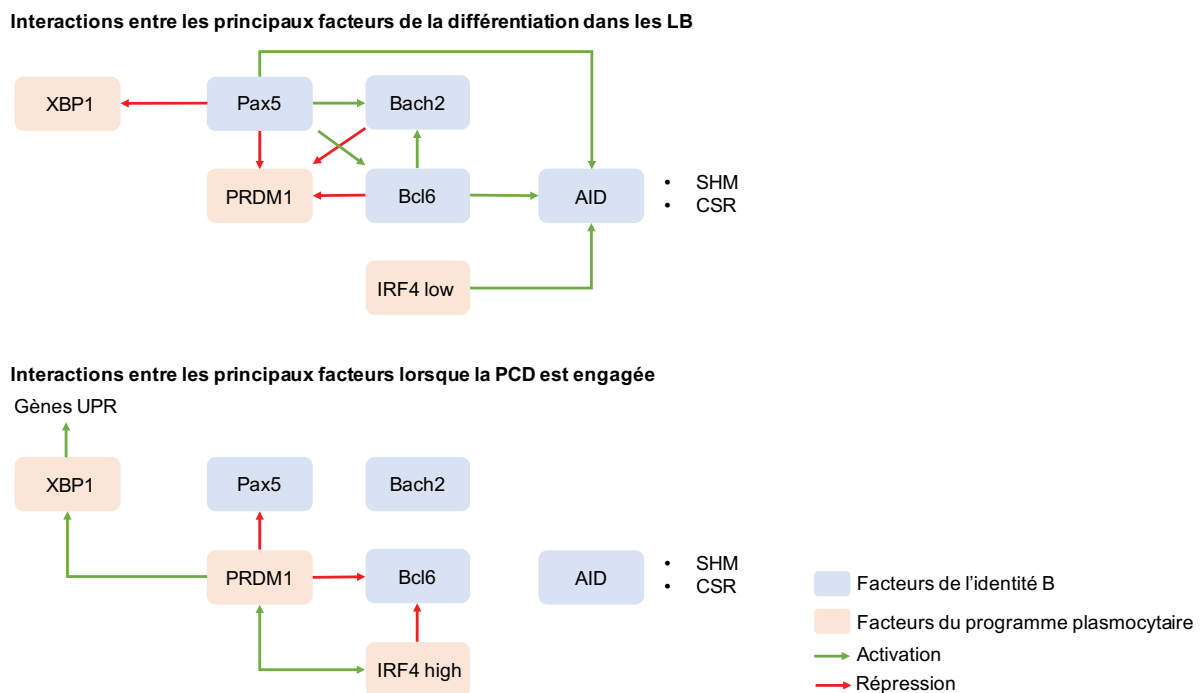


Figure 3 : Principaux facteurs et interactions qui entrent en jeu dans la différenciation terminale des LB (tiré de [12]).

2. La différenciation plasmocytaire normale (NPCD)

La NPCD comprends plusieurs étapes successives : les clones présentant une forte affinité pour l'antigène et s'engageant dans la NPCD se différencient dans un premier temps en pre-plasmablastes (pre-PB) [25] puis en plasmablastes (PB) et enfin en plasmocytes (PC) (**Figure 4**). Les pre-plasmablastes sont des cellules de courtes durées de vie et hautement

prolifératives. Ils sécrètent de faibles quantités d'Ig et commencent à exprimer *BLIMP1* et *XBPI* majoritairement sous forme non épissée alors que l'expression de *BCL6* et *PAX5* est progressivement diminuée [25,26]. Les plasmablastes ont une capacité de prolifération plus faible et peuvent se différencier en cellules plasmocytaires à longue durée de vie après leur migration dans la moelle osseuse [27,28]. Les cellules sécrétrices d'Igs présentent un changement moléculaire plus prononcé avec une inhibition de *PAX5* et *BCL6* et une forme *XBPI* épissée augmentée [25,26]. Les plasmablastes expriment *PRDM1* plus faiblement que les plasmocytes [29]. *PRDM1* va réprimer *MYC* en association avec une inhibition de la prolifération dans les plasmocytes matures comparativement aux plasmablastes [28,30,31]. La différenciation terminale pourrait avoir lieu de façon graduelle pendant le cheminement vers la moelle osseuse, avec les PC précoces présents dans les organes lymphoïdes périphériques, les PC de transitions dans le sang périphérique et les PC matures dans la MO [32] mais ce processus demeure encore mal compris. Ces étapes et les mécanismes sous-jacents aux différentes étapes de la NPCD sont beaucoup moins connus et étudiés que les étapes plus précoces de la différenciation B. De façon attendue, l'analyse de la signature d'expression de la phase terminale de la différenciation B a montré que les gènes exprimés dans les plasmocytes codent pour des protéines impliquées dans la transcription, la traduction, le transport intra-cellulaire et la glycosylation des Igs. Elle a révélé également une forte expression des gènes impliqués dans l'UPR. Les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont fortement exprimés dans les PC précoces mais réprimés dans les PC tardifs. Ces analyses ont par ailleurs révélé de nouveaux mécanismes régulateurs, notamment une modification de la chromatine associée aux changements transcriptionnels entre LB et PC [33,34]. Par ailleurs une récente étude menée *in vivo* chez la souris a mis en évidence l'implication des mécanismes épigénétiques dans la différenciation plasmocytaire [35]. Les plasmablastes et les plasmocytes ont un programme transcriptionnel différent et ces deux stades subissent des changements dans 10% de leurs méthylome (ADN) dont plus de 99% sont des déméthylations de l'ADN. Cette étape pourrait être suivie d'une reméthylation progressive au cours de l'évolution du plasmocyte. Le traitement des cellules *ex vivo* avec un inhibiteur de la méthylation (5-azaC) a pour conséquence une augmentation de la NPCD suggérant que la méthylation est un phénomène limitant dans la différenciation en relation avec la prolifération [35].

Notre équipe a développé un modèle de NPCD *in vitro* unique, représentatif des processus présents *in vivo* et qui récapitule les événements moléculaires importants. C'est un outil de choix pour étudier finement ce processus et qui comprends l'ensemble des étapes de la NPCD. En particulier, l'étude de son transcriptome a permis de mettre en évidence la régulation de

gènes importants pour la NPCD par les miRNA. Parmi eux, miR-30 régule directement *IRF4* et *PRDM1* ainsi que d'autres gènes importants comme *ELL2*, *ARID3A* et *GLCE*. Cette étude a également mis en évidence une corrélation négative entre certains acteurs du cycle cellulaire (*CCND2*, *CCNE1*, *CDK6* et *CDC25A*) et miR-16, fortement exprimé dans les LB et qui diminue au cours de la transition LB-prePB [36]. De plus, notre équipe a mis en évidence l'implication d'*EZH2* dans la NPCD avec une régulation de la division cellulaire au niveau pre-plasmablaste [37].

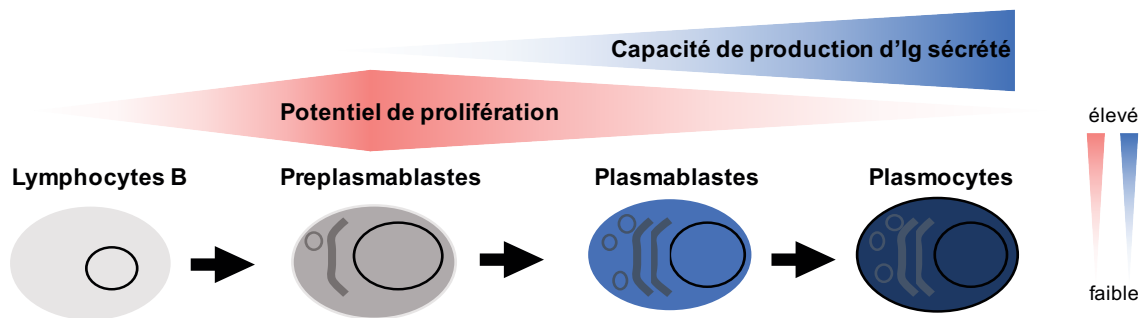


Figure 4 : Etapes de la différenciation plasmocytaire normale et caractéristiques majeures

3. Le microenvironnement

La moelle osseuse (MO) contient la majorité des cellules plasmocytaires matures des individus sains [38]. En effet, les plasmocytes (PCs) de haute affinité vont s'y nicher pour finaliser leur différenciation et survivre sur de longues périodes. La migration des PCs vers la moelle osseuse est médiée par le récepteur CXCR4 dont le ligand CXCL12 est présent à la surface des cellules endothéliales sinusoidales de la MO [39]. La MO ne contient qu'une quantité limitée de niches de survie pour lesquelles les plasmocytes entrent en compétition. Finalement, seulement une petite partie des plasmocytes parvient à s'y établir. Peu de choses sont connues dans le procédé de rétention des plasmocytes dans la MO, leur maturation et leur établissement dans les niches de survies [40].

Le microenvironnement constituant la niche médullaire est indispensable à la survie des PCs [41]. Il apparaît comme impliquant des interactions entre plusieurs types cellulaires qui produisent les signaux de survie nécessaires. Les cytokines IL-5 et IL-6, le TNF α (tumor necrosis factor α), BAFF (B-cell activating factor), APRIL (proliferation-inducing ligand) et la chemokine CXCL12 supportent la survie des plasmocytes. APRIL agit au travers du récepteur BCMA avec un effet sur l'expression de MCL1, une protéine anti-apoptotique essentielle pour la survie des plasmocytes [28]. *In vitro* l'IL-6 a été retrouvé comme le facteur de survie le plus efficace, son rôle pourrait être de maintenir l'expression de *PRDM1*. Les cellules stromales

apparaissent également comme indispensables à la survie des plasmocytes [41–43]. CXCR4 est responsable du homing des PC dans la moelle osseuse, au voisinage des cellules stromales qui produisent CXCL12 [39]. La survie des plasmocytes dans la MO serait également influencée par différents types de cellules hématopoïétiques comme les éosinophiles, les mégacaryocytes et les précurseurs myéloïdes, qui ont été retrouvés comme produisant APRIL [41] (**Figure 5**).

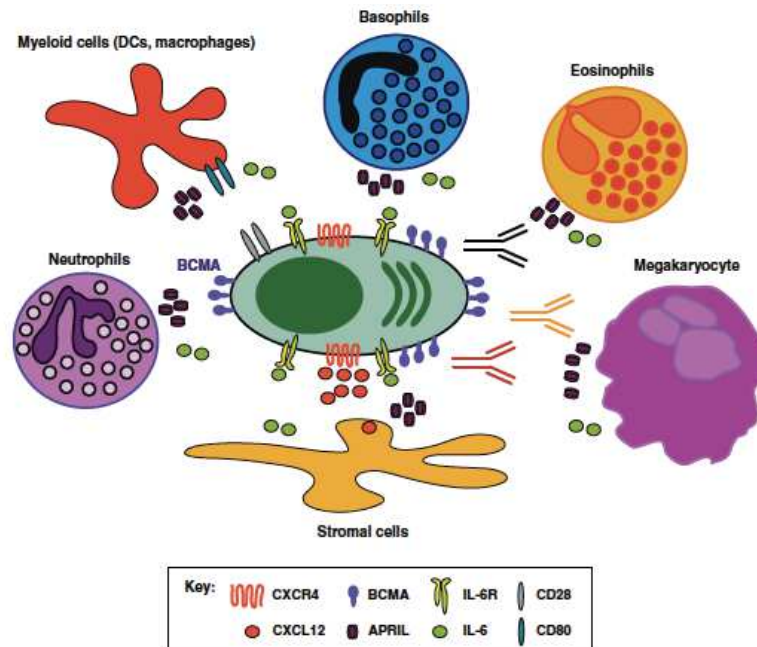


Figure 5 : Composition cellulaire des niches de MO et acteurs moléculaires importants dans la survie des plasmocytes [39]

4. Genèse des plasmocytes tumoraux et progression de la maladie

L'origine du clone tumoral est un « hit » initiateur survenant au cours de la différenciation terminale de la lignée B et qui a pour finalité l'immortalisation d'une cellule plasmocytaire. Les cellules issues de ce clone acquièrent ensuite des aberrations génétiques supplémentaires au cours de la progression de la maladie médiées par le stress réplicatif, la dérégulation de certains oncogènes/suppresseurs de tumeurs, des mutations ou des modifications épigénétiques. Ces aberrations supplémentaires dérégulent la survie et la prolifération des plasmocytes menant à des caractéristiques cliniquement reconnues (**Figure 6**). Comme vu précédemment les SHM et la CSR nécessitent la génération de mutations et de cassures d'ADN double brins au niveau des locis des immunoglobulines. Ces cassures peuvent conduire à des fusions génétiques et des translocations aberrantes. La plupart de ces anomalies sont sans conséquences. Néanmoins lorsque ces aberrations touchent des oncogènes importants, elles peuvent conférer un avantage prolifératif et conduire à la tumorigenèse. L'autre type

d'évènement initiateur de la maladie est l'hyperploïdie dont les causes ne sont pas connues [5]. L'ensemble des mécanismes sous-jacents à la myelomagenèse ne sont pas bien connus et nécessitent des études plus approfondies. Ces études concernent non seulement les plasmocytes tumoraux mais également les étapes terminales de la différenciation B et la différenciation plasmocytaire normale qui peuvent révéler des acteurs importants pouvant être dérégulés au cours de la transformation tumorale.

Ainsi, le myélome multiple (MM) est une maladie multiétape avec un stade pré-tumoral : MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) qui est un stade asymptomatique précédant presque tous les cas de MM [44]. Ce stade peut évoluer vers un stade de myélome indolent SMM (asymptomatic smoldering multiple myeloma) et finalement vers un MM symptomatique. L'évolution du stade MGUS vers le stade MM se fait à un taux de 1% par an. Le SMM à un taux de progression vers le MM de 10% par an les 5 premières années suivant le diagnostic puis de 3% les 5 années suivantes et enfin de 1,5% par an par la suite. Il n'y a pas d'évènement génétique particulier connu marquant la transition entre le MGUS et le SMM. En revanche les patients présentant certaines aberrations génétiques et épigénétiques (méthylation de l'ADN, expression de miRNA) ont plus de risque de progression vers le MM. Le MM déclaré, qui nécessite un traitement, présente des dommages caractéristiques comprenant des lésions osseuses, des atteintes rénales ainsi qu'une anémie. Le MM peut évoluer vers une forme plus agressive de la maladie, appelée leucémie à plasmocytes qui est caractérisée par un envahissement du sang par les plasmocytes tumoraux qui ont acquis une indépendance vis-à-vis de l'environnement médullaire et peuvent migrer en dehors de la MO (MM extramédullaire). Chaque étape de la maladie est caractérisée par des aberrations génétiques communes et spécifiques, le paysage génomique de la maladie n'est pas fixé et évolue au cours de la progression du MM (**Figure 6**).

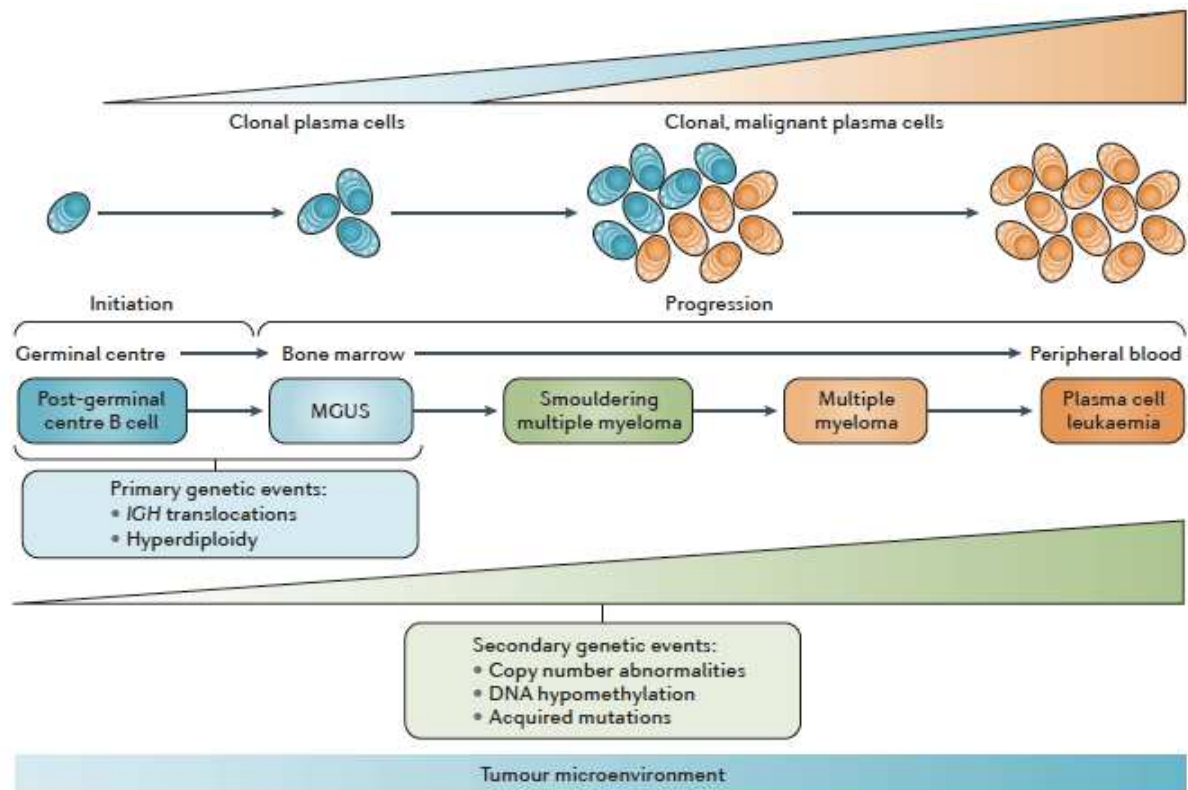


Figure 6 : Progression du MM et évènements génétiques [5]

III. Diagnostic et système de stratification

Le diagnostic du MM repose sur des tests évaluant plusieurs biomarqueurs définis par l'IMWG (International Myeloma Working Group). Les critères de diagnostic reposent sur la mesure du niveau des protéines monoclonales (protéine M), l'infiltration de cellules plasmocytaires clonales dans la moelle osseuse, le niveau de chaînes légères libres d'immunoglobulines (Chaînes légères libres d'immunoglobuline) la présence de signes cliniques (**Tableau 1**). La protéine monoclonale (M) est une protéine anormale (immunoglobuline ou partie d'immunoglobuline) produite par le clone de cellules plasmocytaires tumorales. Elle est détectée dans le sang ou l'urine par électrophorèse ce qui se traduit par la présence d'un pic monoclonale (M-spike). En plus d'être mesuré au diagnostic, c'est le marqueur privilégié pour évaluer la réponse aux traitements et réaliser le suivi de la maladie. Les signes cliniques majeurs du MM sont résumés par l'abréviation CRAB pour hypercalcémie, atteinte rénale, anémie et lésions osseuses. L'hypercalcémie est due à l'ostéolyse provoquée par la destruction osseuse induite par la tumeur et médiée par les ostéoclastes. L'atteinte est mesurée par le niveau de calcium présent dans le sang. Les lésions osseuses sont également détectées par radiographie complète du squelette. Le MRI (imagerie à

résonance magnétique) ou PET-CT (tomographie par émission de positrons-tomographie informatisée) peuvent être utilisés quand des zones symptomatiques ne sont pas associées à des atteintes détectables par radiographie. L'insuffisance rénale est provoquée par l'excès d'immunoglobuline produites par les cellules tumorales. Elle est mesurée à l'aide du niveau de créatinine, un composant chimique excrété par les reins et dont le niveau sérique augmente lorsqu'ils sont atteints. Enfin, l'anémie est provoquée par l'excès de cellules plasmocytaires tumorales dans la moelle osseuse. Ces atteintes se traduisent chez les patients entre-autres par une forte fatigue, des douleurs osseuses et des symptômes neurologiques.

Chez les patients présentant une suspicion de MM, l'examen se compose d'un test sanguin complet, d'une mesure du niveau de protéine monoclonale sérique et urinaire, d'un prélèvement de moelle osseuse et d'une radiographie. Si une protéine monoclonale est détectée, que la numération des cellules plasmocytaires est supérieur ou égale à 10% et que les signes cliniques CRAB sont présents, alors le diagnostic du MM est posé. Les patients atteints d'une gammopathie monoclonale avec un taux de cellules plasmocytaires < 10% ou un niveau de protéine M faible sont diagnostiqués avec un MGUS. Enfin, les patients présentant une protéine M sérique et urinaire augmenté, avec un nombre de plasmocytes \geq 10% dans la moelle osseuse mais sans signes cliniques CRAB sont diagnostiqués avec un SMM. Les patients atteints de MGUS et SMM étant asymptomatiques, bien souvent, le diagnostic se fait de façon fortuite lors de tests sanguins et urinaires de routine (**Tableau 1**).

Stade de progression	Définition
MGUS	Protéine M sérique < 30 g/L Cellules plasmocytaires (PC) clonales dans la moelle osseuse (MO) < 10% Absence des signes cliniques CRAB ou d'amylose due à la prolifération des plasmocytes
SMM	Protéine M sérique (IgG ou IgA) \geq 30g/L ou protéine M urinaire \geq 500m/ 24h et/ou PC de la MO 10% - 60% Absence de signes cliniques CRAB ou amylose
MM	PCs clonaux dans la MO \geq 10% avec un ou plusieurs de ces critères : - Présence de signes cliniques CRAB: Hypercalcémie : calcium (sérum) > 0,25 mmol/L (> 1mg/dL) supérieur à la limite haute normale ou > 2,75mmol/L (> 11mg/dL) Insuffisance rénale : CrCl < 40mL/min ou sérum créatinine > 177umol/L (>2mg/dL) Anémie : valeur de l'hémoglobine > 20 g/L en dessous de la valeur minimale limite normale ou < 100 g/L Lésions osseuses : une ou plusieurs lésions ostéolytiques - Un ou plusieurs de ces biomarqueurs tumoraux: \geq 60% PCs clonaux dans la MO Rapport des chaînes légères libres sériques \geq 100 Plus de 1 lésion focale sur MRI (chacune doit être de taille \geq 5 mm)

Tableau 1 : Critères diagnostic à chaque niveau de progression du MM [45]

Le MM est une maladie présentant une forte hétérogénéité dans sa réponse clinique. De nombreuses études ont identifiées des facteurs biologiques permettant de prédire le pronostic des patients. Il s'agit entre autres de la β 2-microglobuline, l'albumine et la lactate déshydrogénase (LDH). La β 2-microglobuline est une protéine retrouvée à surface de toutes les

cellules, c'est la chaîne légère du complexe d'histocompatibilité HL-A. Elle est sécrétée dans le sang par les lymphocytes B et les cellules tumorales. Les patients atteints de MM présentent un niveau élevé de cette protéine. L'albumine est une protéine soluble retrouvée dans le sérum sanguin. Sa production est inhibée par l'IL-6 lorsque le myélome est actif. Enfin, la lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme importante dans la métabolisation en sucre par les cellules. Elle est libérée dans le sang en cas de dommages cellulaires. Lorsqu'elle est retrouvée anormalement élevée chez les patients atteints de MM, elle est le témoin d'un mauvais pronostic. Ces facteurs sont regroupés dans un système de stratification des patients appelé ISS pour « International Staging System ». Ce système est divisé en trois stades (**Tableau 2**) associés à une médiane de survie spécifique. Les médianes de survie des stades I, II et III se situent respectivement à 62, 44 et 29 mois. Récemment ce système a été complété avec l'intégration de données cytogénétiques retrouvées de façon récurrente dans le MM et de mauvais pronostic (t(4 ;14), délétion(17p) et t(14 ;16)) ainsi qu'avec le niveau de LDH. La combinaison de ces facteurs permet de significativement améliorer l'estimation pronostique en FPS (Progression Free Survival) et OS (Overall Survival). En effet 26% des patients seraient affectés par erreur à un groupe de bon pronostic si seulement un des facteurs présentés dans le **tableau 2** est pris en compte [46].

Facteur pronostique	Critères
Stade ISS I II III	Sérum $\beta 2M < 35$ mg/L, sérum albumine $\geq 3,5$ g/dL Ni stade I, ni stade III Sérum $\beta 2M \geq 5,5$ mg/L
Aberrations chromosomiques par FISH (CA) Risque élevé Risque standard	Présence del(17p) et/ou translocation t(4;14) et/ou translocation t(14;16) Pas de défauts chromosomiques associés à un risque élevé
LDH Normal Élevé	Sérum LDH < limite haute de la valeur normale Sérum LDH > limite haute de la valeur normale
Stades nouveau modèle de stratification (R-ISS) I II III	Stade I ISS + CA risque standard + LDH normal Ni stade I, ni stade III ISS stade III + CA risque élevé ou LDH élevé

Tableau 2 : Facteurs de risque standards, système de stratification standard et révisité [45]. CA = Aberrations chromosomiques

IV. Prise en charge thérapeutique

L'avènement de nouvelles stratégies thérapeutiques a permis d'augmenter la médiane de survie de 5 à 10 ans durant ces 20 dernières années. Les études cliniques n'ont pas démontré un bénéfice significatif du traitement des patients atteints de MGUS ou SMM. Ainsi pour ces deux stades la prise en charge repose principalement sur un suivi régulier de l'évolution de la maladie. Les patients présentant un MM déclaré se divisent en deux groupes dont la prise en charge est différente. Les patients âgés de moins de 65 ans ou âgés de moins de 70 ans sans comorbidités sont traités en trois phases. La première est dite d'induction pour faire baisser la masse tumorale, la seconde comprend une haute dose de chimiothérapie associée à une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétique (ASCT) et la dernière est une phase de maintenance (**Figure 7**). La réponse aux traitements a été améliorée grâce à la combinaison de plusieurs molécules. Ainsi la phase d'induction est réalisée avec une association bortezomib (inhibiteur du protéasome) - dexaméthasone (corticostéroïde) combiné au thalidomide (immunomodulateurs, IMiD) (VTD), à la doxorubicine (agent intercalant) (PAD), au lenalidomide (IMiD) (RVD) ou au cyclophosphamide (IMiD) (VCD). Deux études cliniques ont comparé ces combinaisons, la première montre que le VCD est moins toxique que le PAD pour une efficacité identique [47]. La seconde montre que VTD est plus efficace que le VCD avec bonne réponse partielle mais qu'il est associé à un taux de neuropathies périphériques plus élevé [48]. Quatre à six cycles d'induction sont recommandés avant le prélèvement de cellules souches. L'ASCT est précédée par une haute dose de Melphalan (agent alkylant). Enfin, la phase de maintenance est un traitement basé sur l'utilisation d'IMiDs. En ce sens, de récentes études ont montrées que la maintenance avec le lenalidomide prolonge la FPS et l'OS [49].

Pour les patients plus âgés ou qui ne sont pas dans une condition leur permettant de subir une intensification thérapeutique, la prise en charge repose uniquement sur une chimiothérapie. Elle peut être constituée d'une combinaison bortezomib, melphalan et prednisone (corticostéroïde) (MPV) ou alors de lenalidomide associé à de faibles doses de dexaméthasone (Rd). La combinaison Melphalan/prednisone/thalidomide (IMiD) (MPT) peut également être utilisée mais il a été montré que le Rd est plus efficace en termes de FPS et OS [50]. Le Rd peut être associé au bortezomib (VRd) ce qui résulte en une amélioration du FPS ou de l'OS [51]. Par ailleurs la combinaison Bortezomib/cyclophosphamide/dexaméthasone (VCD) résulte en une bonne réponse et un FPS prolongé [45].

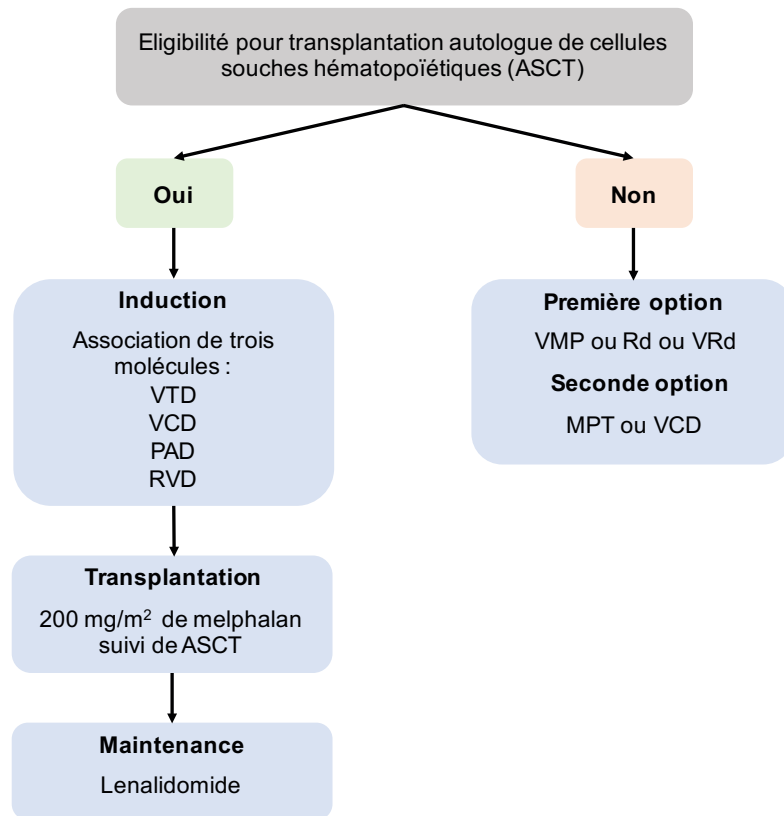


Figure 7 : Prise en charge thérapeutique au diagnostic [45]. VTD – bortezomib, thalidomide, dexaméthasone ; VCD – bortezomib, cyclophosphamide, dexaméthasone ; PAD – bortezomib, doxorubicine, dexaméthasone ; RVD – lenalidomide, bortezomib, dexaméthasone ; VMP – bortezomib, melphalan, prednisone ; Rd – lenalidomide, faible dose de dexaméthasone, VRd – lenalidomide, faible dose de dexaméthasone, bortezomib ; MPT – melphalan, prednisone, thalidomide ; VCD – bortezomib, cyclophosphamide, dexaméthasone.

La réponse à ces traitements est évaluée selon les critères décrits dans la **tableau 3** et définis par l'IMWG [52]. Plus récemment de nouveaux critères basés sur la détection de la maladie résiduelle (MRD) ont été introduits [53]. Les cellules tumorales résiduelles sont identifiées à l'aide de cyométrie en flux ou séquençage haut débit. De plus des techniques d'imageries très sensibles (PET-CT) peuvent être utilisées pour détecter la maladie résiduelle en dehors de la moelle osseuse.

Type de réponse	Critères
Réponse complète moléculaire	PCR allèle spécifique, sensibilité 10 ⁻⁵
Réponse complète immunophénotypique	Absence de plasmocytes clonaux aberrants dans la moelle osseuse avec un minimum de 1 million de cellules total analysée par cytométrie en flux (4 couleurs)
Réponse complète stringente	Ratio des chaînes légères libres normales Absence de plasmocytes clonaux par immunohistochimie ou cytométrie en flux (2-4 couleurs)
Réponse complète	Disparition de la protéine M sérique et urinaire < 5% de plasmocytes dans la moelle osseuse
Bonne réponse partielle	Protéine M sérique et urinaire détectables par immunofixation mais pas par électrophorèse ou ≥ 90% de réduction de protéine M sérique et protéine M urinaire < 100mg / 24h
Réponse partielle	≥ 50% de réduction de la protéine M sérique et réduction en 24h de la protéine M urinaire de plus de 90% ou en dessous de 200 mg/24h
Progression/Rechute	Evolution de plus de 25% d'un ou plusieurs des signes suivants : - Augmentation de la protéine M sérique et urinaire - Apparition ou développement de lésions ostéolytiques et de localisations plasmocytaires extra osseuses - > 10% plasmocytes dans la moelle osseuse - Hypercalcémie (anémie ou élévation de la créatinémie)

Tableau 3 : Critères de réponse aux traitements [45,52,54]

A la rechute le choix de la thérapie dépend de plusieurs paramètres comme l'âge, les comorbidités, les précédents traitements (type, efficacité, tolérance), le nombre de lignes de traitements réalisées, les options thérapeutiques restantes, l'intervalle depuis la dernière thérapie et le type de rechute (clinique ou biochimique) [55]. Ces traitements sont présentés **Figure 8**. En particulier, à ce stade du traitement, l'utilisation de nouvelles molécules a été approuvée : le Panobinostat (inhibiteur Pan HDAC), le Carfilzomib, le Ixazomib (inhibiteurs du protéasome) et le Pomalidomide (IMiDs : immunomodulateurs). En plus de ces molécules, des anticorps thérapeutiques ont été développés et approuvés pour les traitements à la rechute. Il s'agit de l'Elotuzumab, un anticorps monoclonal ciblant SLAMF7 (signaling lymphocytic activation molecule F7) [56] et du Daratumumab un anticorps monoclonal qui cible CD38 [57,58]. Les patients jeunes peuvent avoir recours à une seconde ASCT lorsqu'ils ont bien répondu à la précédente et avec une FPS > à 24 mois [59]. Lorsque cela est possible les patients peuvent être inclus dans des essais cliniques.

En complément des traitements précédemment évoqués, des soins supplémentaires sont mis en œuvre pour gérer la maladie osseuse, les anémies, les infections et les atteintes rénales.

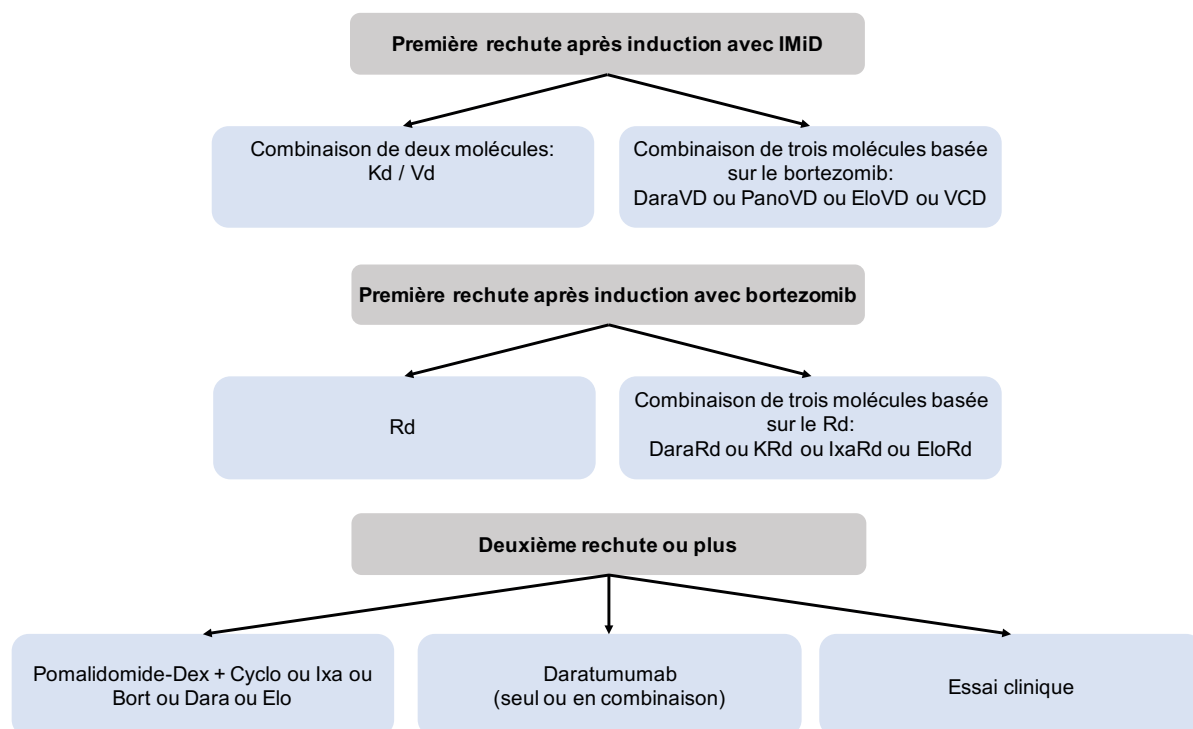


Figure 8 : Prise en charge thérapeutique à la rechute [45]. Kd – carfilzomib et faible dose de dexaméthasone ; Vd – bortezomib et faible dose de dexaméthasone, peut être associé au daratumumab (DaraVD), panobinostat (PanoVD), elotuzumab (EloVD) ou à la dexaméthasone (VCD). Rd – lenalidomide, faible dose de dexaméthasone, peut être associé au daratumumab (DaraRd), carfilzomib (KRd), izaxomib (IxaRd) ou au elotuzumab (EloRd). Dex – dexaméthasone ; Bort – bortezomib ; Dara – daratumumab ; Elo – elotuzumab.

Avec un nombre d’options thérapeutiques croissantes, l’un des challenges à venir est le développement de solutions permettant d’orienter de façon précise les patients vers une option thérapeutique qui sera la plus optimale selon les caractéristiques de leur maladie au moment des rechutes. Par ailleurs, malgré l’amélioration continue de la prise en charge, la vaste majorité des patients atteints de MM rechutent et présentent des multi-résistances aux traitements. Ces rechutes peuvent notamment être expliquées par la forte hétérogénéité moléculaire de la maladie. Dans l’objectif d’apporter de nouvelles solutions à ces problématiques, il est nécessaire de réaliser une étude détaillée de l’hétérogénéité du MM afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, les mécanismes de résistance aux traitements et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Approches omiques appliquées à l'étude de l'hétérogénéité moléculaire du MM et implications thérapeutiques

I. Génome

1. Aberrations génétiques

Le MM présente de nombreuses anomalies chromosomiques ayant pour conséquence des caryotypes très complexes. Les patients sont principalement divisés en deux groupes. Le premier est le groupe hyperdiploïde qui est caractérisé par la trisomie d'un ou plusieurs des chromosomes pairs (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21) [60], les mécanismes sous-jacents à cette trisomie particulière restent inconnus. Le deuxième groupe implique une translocation entre le locus de l'*IGH* (14q32) et des gènes présentant des propriétés oncogènes. Les translocations les plus fréquentes sont la t(11 ;14) et la t(6 ;14), dérégulant la cycline D1 [61], la t(4 ;14) dérégulant *FGFR3* et *MMSET* [62,63] ainsi que la t(14 ;16) dérégulant *MAF* [64,65] (**Tableau 4**). La dérégulation de la transition G1/S du cycle cellulaire au travers de la perturbation des cyclines D est un évènement précoce de la myélomagenèse qui affecte tous les sous-groupes de patients. En effet, les cyclines D apparaissent aussi comme surexprimées chez les patients t(14 ;16) au travers de *MAF* qui se fixe sur le promoteur de *CCND2* pour l'activer [66]. Les patients t(4 ;14) présentent également une surexpression de *CCND2*, les mécanismes sous-jacents à cette dérégulation ne sont pas connus. Par ailleurs, la dérégulation bi-allélique de *CCND1* apparaît dans 40% des MM, la plupart étant hyperdiploïdes [66]. Tous ces évènements sont classifiés comme primaires et doivent être associés à des évènements secondaires pour que les cellules entrent en phase anormale de prolifération (**Figure 6**). Les évènements secondaires impliquent typiquement des mutations activatrices dans des voies de signalisations ayant un rôle dans la prolifération, l'immortalisation et la résistance à l'apoptose. Les gènes fréquemment retrouvés dérégulés sont *MYC* (15% des patients), *NRAS* et *KRAS* (30-40% des patients), *BRAF*, *PI3K*, *AKT* et *TP53*. Ce dernier peut être inactivé soit par la délétion du bras court du chromosome 17 où il se situe et/ou par la présence de mutations inactivatrices. La perte bi-allélique de *TP53* est de très mauvais pronostic chez les patients à la rechute [67]. La voie NF- κ B est activée de façon constitutive chez 20% des patients. Cette activation est due à la délétion de certains inhibiteurs (*TRAF2*, *TRAF3*, *CYLD*, *clAP1/clAP2*) ou par activation de gènes régulant positivement cette voie (*NFKB1*, *NFKB2*, *CD40*, *LTBR*, *TACI* et *NIK*) [68,69]. Elle est particulièrement importante puisqu'elle est impliquée dans le control de l'interaction entre les cellules du MM et leur environnement dans la moelle osseuse. La suractivation de

cette voie favorise l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis du microenvironnement ce qui conduit à une prolifération extra-médullaire des cellules de MM [70]. Par ailleurs, la dérégulation de facteurs clés de la NPCD comme *XBPI*, *PRDMI* et *IRF4* ont un impact crucial sur la physiopathologie du MM [71,72]. Les évènements secondaires comprennent également la perte du chromosome 13 (50% des patients présentant la t(4 ;14)) [73] sur lequel est situé le suppresseur de tumeur Rb1; le gain du bras long du chromosome 1 (33% des patients), associé à un mauvais pronostic [74] et la perte du bras court du chromosome 17 (del17p) (10% des patients) [75].

Les causes de la progression du stade MGUS vers le stade MM actif ne sont pas encore bien élucidé. Une récente étude a mis en évidence que la fréquence de gain et pertes de chromosomes incluant l'hyperdiploidy, gain 1q, del 13q est plus faible dans les MGUS en comparaison avec les MM. Ces aberrations pourraient donc participer à l'évolution de la pathologie, en créant un background génétique favorable mais ne sont pas les initiateurs de la progression. Il en est de même pour les SNV de façon générale (Single Nucleotide Variation - exoniques, non synonymes, synonymes et totaux). En revanche les altérations de *TP53* et les translocations de *MYC* sont retrouvées dans les MM mais pas dans les MGUS suggérant qu'elle pourrait être de bons candidats pour expliquer le déclenchement de la maladie [76].

2. Apport du NGS

Les technologies de séquençage sur whole genome (WGS) ou whole exome (WES) ont permis de dresser un portrait plus précis du paysage mutationnel du MM. Il a été montré que le MM présentait environ 35 mutations non-synonymes par échantillon. Cette valeur se situe entre celles retrouvées dans les leucémies aigues (~ 8 mutations non synonymes/échantillon) et celles retrouvées dans les tumeurs épithéliales plus complexes comme le cancer du poumon (~ 540 mutations non synonymes) [75]. Il n'a pas été identifié une mutation majeure caractérisant le MM et étant commune aux différents groupes. Le paysage mutationnel observé est très hétérogène avec des gènes fréquemment mutés comme *KRAS* (20%), *NRAS* (20%), *TP53* (10%), *DIS3* (10%), *FAM46C* (10%) et *BRAF* (10%). D'autres gènes sont retrouvés mutés à des fréquences plus faibles mais de façon récurrente comme *TRAF3*, *PRDMI*, *CYLD*, *RBI*, *IRF4*, *EGR1*, *MAX*, *HIST1H1E* et *ACTG1* [79–81] (**Figure 9**).

Sous-groupes/ Caractéristiques	Cytogenetiques	Expression CCND	Gènes fortement exprimés	Gènes faiblement exprimés	Risque	Frequence
CD-1	t(11;14)	CCND1 CCND3	INHBE ETV1 MACROD2	CD9 NOTCH2NL	Faible	4-9%
CD-2	t(11;14) t(6;14)	CCND1 CCND3	cd79a cd20 VPREB3	CCND2	Faible	11%-17%
MF (MAF/MAFB)	t(14;16) t(14;20)	CCND2	IL6R c-MAF MAFB	DKK1 CCND1	Elevé	6%-10%
MS (MMSET)	t(4;14) gain 1q	CCND2	MMSET FGFR3 PBX1 IL-6R	CCND1 DUSP2 SYK PAX5	Elevé	15%-17%
LB (Low Bone disease)	Trisomies de HY Exceptions frequentes présentant del13 et gain 1q, rares gain du chromosome 11	CCND1 CCND2	EDN1 IL6R SMAD1 CST6 ARHE	DKK1 STAT1 STAT2	Faible	12%-17%
PR (Proliferation)	gain 1q	CCND2 CCND1	CCNB1 MCM2 CDC2 BIRC5 CCNB2 AURKA	CXCR4 CD27	Elevé	11%
HY (Hyperdiploide)	Trisomies +3; +5; +9; +11; +15; +19	CCND1	TRAIL DKK1 CCR5 FRZB GNG11	CCND2 CD52 TAGLN2 CKS1B OPN3	Faible	26%-32%

Tableau 4 : Caractéristiques des sous-groupes moléculaires du MM. Tableau tiré de [77] et [78]

Les mutations de ces gènes affectent de nombreuses voies de signalisation : NFkB, MAPK, cycle cellulaire, régulation épigénétiques, migration cellulaire, interaction cellules-cellules. Beaucoup des gènes mutés sont connus comme étant des oncogènes et d'autres, non connus, ont été révélés comme impliqués dans la tumorigenèse. Par exemple, *FAM46C*, un gène codant pour une poly(A) polymérase, a été plusieurs fois décrit comme étant l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans le MM et a été associé à un mauvais pronostic. Les études ont montré qu'il agissait d'un gène suppresseur de tumeur et qu'il était statistiquement associé à un caryotype hyperdiploïde [81,82].

Grâce au WGS, il est possible d'élargir les études aux régions non codantes du génome pour trouver de nouveaux gènes candidats impliqués dans la tumorigenèse. Une récente étude a recherché les mutations se trouvant sur les régions des éléments cis-régulateurs (CREs) et sur les promoteurs modulant l'expression des gènes. En particulier les résultats de cette étude ont mis en évidence des CNVs (Copy Number Variation) au niveau des CREs de *MYC* et des SNVs

dans un enhancer de *PAX*. De plus les auteurs ont montrés qu'une même voie de signalisation peut être ciblée par des mutations se trouvant dans les régions codantes et les régions non codantes. Ce profil mutationnel a été retrouvé pour les gènes *IRF4*, *PRDM1*, *BCL6*, *PAX5* qui sont essentiels à la différenciation plasmocytaire normale [83].

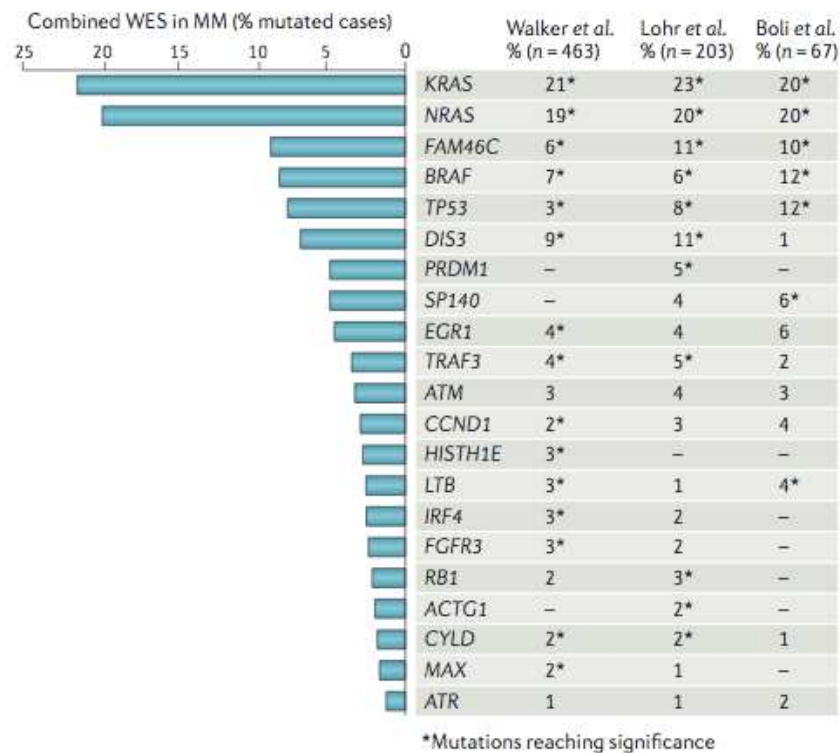


Figure 9 : Gènes les plus fréquemment mutés chez les patients atteints de MM [84].

Le NGS a permis d'étudier plus en détail l'hétérogénéité et l'évolution clonale du MM. Ainsi, *Lohr et al.* ont montrés que la majorité des échantillons ont une hétérogénéité clonale allant de 3 à 7 sous-clones détectables [80]. Ce chiffre est probablement sous-estimé du fait de la sensibilité de la technologie ou de la limitation spatiale du prélèvement. En effet, une récente étude a démontré l'existence d'une hétérogénéité spatiale dans 75% des patients et propose un modèle de sélection clonale dans les stades précoces avec des évolutions multirégionales dans les phases avancées [85]. Plusieurs théories d'évolutions des clones existent et sont aujourd'hui étudiées dans le MM (**Figure 10**). L'évolution linéaire fait partie du dogme traditionnel de la biologie du cancer, présenté par Peter Nowell en 1976, qui stipule que les cellules tumorales évoluent de façon linéaire par l'acquisition et l'accumulation de nouvelles altérations génétiques conduisant à une augmentation de l'agressivité de la maladie [86]. Récemment plusieurs études ont challengé ce dogme en démontrant l'existence d'une évolution clonale en branchements en accord avec le modèle de l'évolution Darwinien. Dans le MM, *Keates et al.* ont montré, au travers de l'analyse de CNAs (copy number alteration), que l'évolution tumorale

des patients n'était pas fixée dans une trajectoire d'évolution mais qu'elle pouvait passer d'un type d'évolution à un autre au cours de la maladie [87]. Ces résultats sont confirmés par *Bolli et al.* qui ont identifiés plusieurs type d'évolution à la rechute : pas d'évolution, réponse clonale différentielle au traitement, évolution linéaire et évolution en branchements [81]. Cette étude et d'autres ont démontrés la présence de clones et sous clones de façon alterné à différents points durant la maladie, suggérant une pression de sélection induite par le traitement [83,87]. Par exemple, une étude longitudinale de 4 patients t(4 ;14) en WGS au diagnostic, à la première rechute, à la seconde rechute et au stade de leucémie plasmocytaire (PCL) a révélé que les séquences des variants apparaissent et disparaissent au cours de la progression. En comparant le stade PCL à la deuxième rechute les clones semblent beaucoup plus divergents qu'entre le diagnostic et la seconde rechute, ce qui suggère une augmentation de la divergence d'évolution au cours du temps et de l'agressivité de la maladie. De plus, cette étude a révélé que les mutations de *RBI*, critique dans la régulation du cycle cellulaire, et *ZKSCAN3*, un modulateur de *CCND2*, n'ont été retrouvées que dans la PCL suggérant qu'ils sont associés à la transformation leucémique. La délétion bi-allélique de *TP53* a été également retrouvée uniquement au stade PCL [88]. Ainsi, le traitement par chimiothérapie pourrait impacter le fitness de certains sous clones plus que d'autres et de ce fait pourrait altérer la composition tumorale et promouvoir un sous-clone particulier. *Keates et al.* montrent également que les sous clones tumoraux peuvent soit être en compétition, coexister ou stimuler la croissance de clones existants [87]. L'apparition d'un sous-clone majoritaire pourra donc être conditionné par les traitements, l'interaction avec les autres sous-clones ou encore par l'adaptation au microenvironnement pour lequel les clones sont en compétition.

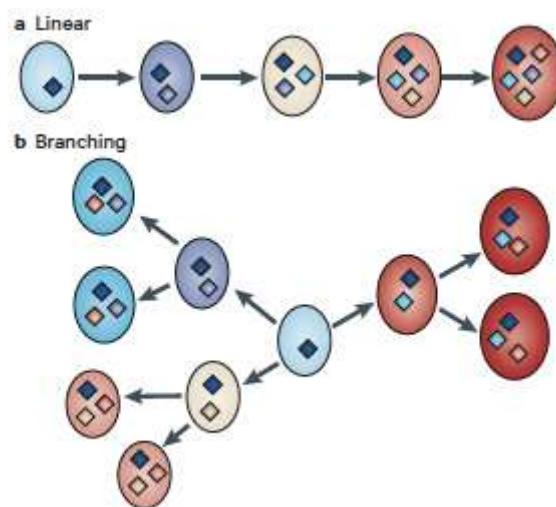


Figure 10 : Représentation de l'hypothèses d'évolution linéaire et en branchement des clones tumoraux [75]

3. Implications thérapeutiques

Les connaissances sur les anomalies génomiques du MM peuvent être prises en compte à deux niveaux pour améliorer la prise en charge thérapeutique. Le premier consiste à trouver de nouveaux marqueurs pronostiques qui amélioreront le système de stratification des patients. Dans cet objectif *Walker et al* ont proposé un nouveau modèle pronostique combinant l'ISS avec plusieurs informations génomiques incluant les mutations des gènes *TP53*, *ATM* ou *ATR*, *ZFH4* ou *CCND1*, del(17p), t(4 ;14), amp(1q) et la translocation de *MYC*. Les mutations dans *CCND1* et dans la voie de la réparation de l'ADN (*TP53*, *ATM*, *ATR* et *ZNFHX4*) sont associés à un impact négatif sur la survie. *IRF4* et *EGR1* sont au contraire associés avec une survie favorable [89]. Ce modèle a été décrit comme plus sensible que le modèle classique dans la détection précoce de la progression de la maladie et la prédiction du risque de mortalité mais il doit toutefois être validé dans des cohortes supplémentaires.

Le second niveau consiste en la découverte de mutations dites « actionnables » c'est-à-dire sur lesquelles on peut agir pour traiter les patients. Ces découvertes s'inscrivent dans l'objectif du développement d'une médecine de précision avec le traitement d'un patient présentant une mutation particulière par une thérapie adaptée. Les mutations de *KRAS* et *NRAS* qui font partie des plus communes ressortent comme des cibles thérapeutiques majeures tout comme la voie NF-kB. Des inhibiteurs qui ciblent spécifiquement l'oncogène muté ont déjà été développés et sont en phase d'essai clinique (**Tableau 5**), comme par exemple le Vemurafenib, un inhibiteur de BRAF. Il a été montré que les patients présentant la mutation BRAF V600-E ont une bonne réponse à ce traitement. Cependant, cette mutation n'étant pas clonale, il est possible que le traitement favorise la croissance de sous-clones BRAF-WT présentant d'autres mutations [90]. En effet les mutations de BRAF ne sont présentes que dans 6% des patients et dans moins de 30% de cellules tumorales. Ainsi, L'hétérogénéité et l'évolution clonale apparaissent comme une limite à la médecine de précision. Ils ont pour conséquence une réponse partielle aux traitements du fait de la suppression d'un seul sous-clone laissant l'avantage aux sous-clones résistants. Certaines stratégies pourraient être mises en place pour améliorer leur efficacité par exemple en ciblant les mutations fondatrices, en combinant plusieurs traitements qui ciblent différents sous-clones ou en retraitant un patient avec une molécule déjà utilisée si un clone sensible réapparaît au cours de la prise en charge [91]. La thérapie ciblée pourrait éventuellement être envisagée uniquement pour les patients avec un seul clone [80]. Tous ces points nécessiteront de nouvelles approches permettant de couvrir précisément l'hétérogénéité clonale.

Alteration	Frequence	Molecule	Stade de développement
Mutation de KRAS	> 20%	Selumetinib	Phase II (MM)
Mutation de NRAS	20%	Cobimetinib	Phase III (autre)
Translocation de MYC	18%	Inhibiteur BET	Phase I (MM)
Mutation de FGFR3, t(4;14)	13%	BGJ398	Phase II (autre)
		AZD4547	Phase III (autre)
Mutation de BRAF	8%	Vemurafenib	Phase II (MM)
del(1p) avec perte de CDKN2C	30%	Palbociclib	Phase II (MM)
t(11;14) et dérégulation de CCND1	19%	Palbociclib	Phase II (MM)
t(6;14) et surexpression de CCND3	1%	Palbociclib	Phase II (MM)

Tableau 5 : Thérapies ciblant des altérations génétiques majeures en phase d'essai clinique dans le MM ou d'autres cancers (tiré de [84]).

II. Transcriptome

1. Apports de la transcriptomique dans l'étude du MM

L'étude du transcriptome, initialement avec les technologies de puces à ARN puis plus récemment avec le séquençage nouvelle génération, a apporté des connaissances importantes concernant les voies de signalisations dérégulées et les gènes impliqués dans la myelomagenèse. En particulier, ce sont les études des profils d'expression (GEP, gene expression profiles) des cellules primaires de patients au diagnostic qui ont permis d'identifier 7 sous-groupes moléculaires de MM présentant une valeur pronostique [77,92,93]. Ces sous-groupes sont caractérisés par les aberrations cytogénétiques majeures du MM et l'expression dérégulée de gènes clés. Les caractéristiques de chacun des sous-groupes moléculaires sont résumés dans le **tableau 4**.

Nous avons précédemment décrit que le MM présentait différentes étapes de progressions (MGUS, SMM et MM) qui ne sont pas clairement définies d'un point de vue moléculaire. L'étude du transcriptome a permis de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre ces étapes ce qui pourrait participer à une meilleure caractérisation de celles-ci. En particulier, il a été montré que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre NPC et le MGUS est significativement plus élevé qu'entre les étapes MGUS et MM. Ces gènes sont impliqués dans des mécanismes importants pour la progression de la maladie comme les processus métaboliques, la prolifération, la réparation de l'ADN et l'apoptose, avec un enrichissement de ces voies dans les cellules de MM en comparaison avec celles du MGUS [78,94]. Ainsi, AKT1/2 ont été retrouvés comme surexprimés dans le MM vs MGUS ce qui est cohérent avec les études montrant la contribution de la voie PI3K/Akt dans le développement

du MM [94]. Par ailleurs, une étude menée sur une large cohorte de patients comparant ces différents stades a montré que la dérégulation de la voie de signalisation MYC est centrale dans la progression du MM. En effet, l'activation de la signature MYC a été retrouvée dans environ 67% des cas de MM de l'étude alors qu'elle n'était pas présente dans les étapes de NPC ou MGUS. De même les auteurs ont identifiés une augmentation de l'expression des voies Ras et E2F [95].

Comme évoqué précédemment, les cellules du MM sont fortement dépendantes de leur microenvironnement. De plus en plus de résultats d'études suggèrent que le microenvironnement (ME) tumoral joue un rôle essentiel dans la maintenance et la progression de nombreux cancers. Il est connu que les cellules du MM sont fortement dépendantes de leur microenvironnement qui produit des facteurs de croissance essentiels régulant des voies de signalisations impliquées dans la croissance, la survie, la migration et la résistance aux traitements. C'est ce que l'étude des interactions ME-MM en transcriptomique a révélé avec l'activation de voies de signalisations tels que NF-kB, Notch et Ras par le ME dans les cellules de MM [78]. Dans ce domaine, notre équipe a publié une étude portant sur l'analyse de profils d'expression des ostéoclastes, révélant l'expression de 4 gènes spécifiques codant pour des chimiokines (*CCL2*, *CCL7*, *CCL8* et *CCL13*) ayant un récepteur commun, *CCR2*, présent à la surface des cellules de MM. Grâce à ces chimiokines, les ostéoclastes attirent les cellules de MM puis induisent leur survie et leur prolifération au travers la sécrétion de facteurs de croissance [96]. Ces études pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant des voies importantes dans les interactions ME-MM.

2. Etude des mécanismes post-transcriptionnels

L'expression d'un gène donné est mesurée par le niveau de transcrite d'ARN présent dans la cellule. Les transcrits d'ARN peuvent être sujets à des modifications post-transcriptionnelles affectant leurs quantité, séquence ou caractéristiques ce qui induit une modification de la protéine et des effets biologiques en aval. Le remplacement progressif des technologies de micro-array par le NGS a permis l'étude globale de ces modificateurs qui comprennent notamment les ARN non codants tels que les miRNA et les long non coding RNAs (lncRNA). Les miRNA sont de petits RNA non codants (~22 nucléotides) et sont associés à l'initiation et la progression tumorale en régulant ~30% des gènes à un niveau post-transcriptionnel [97]. Ils sont responsables de la dégradation ou de l'inhibition de la traduction de leurs mRNA cibles. De nombreuses études montrent que les miRNA sont impliqués dans la myelomagenèse et sont

associés aux sous-groupes moléculaires des patients ou alors sont prédictifs de la réponse des patients aux traitements. Notre équipe a révélé 24 miRNA exprimés de façon aberrante dans le MM et qui présentent également des changements au cours du temps dans leurs expression durant la différenciation. Parmi ces miRNAs, miR-155 a été décrit comme étant associé au groupe cytogénétique t(4 ;14), miR-21 comme associé avec le groups t(11 ;14) et 11 autres ont été associés à la del13q [36]. Les miR-17 et miR-886-5p ont été identifiés comme des facteurs pronostiques dans une cohorte de 163 patients au diagnostic [98]. Par ailleurs, miR-192, miR-194 et miR-215 contrôlent *MDM2* et *IGF-1R*, des gènes impliqués dans l'apoptose, le contrôle du cycle cellulaire et l'invasion tumorale. En particulier, ces miRNA sont contrôlés par *TP53*, connu comme étant de très mauvais pronostique dans le MM lorsqu'il est dérégulé [99]. Les long non-coding RNA participent à la régulation de l'expression des gènes, entre autres via le recrutement de complexes de modification de la chromatine et la régulation de l'épissage [100]. Dans le MM de nombreuses études ont révélé la dérégulation des lncRNA avec un impact sur le cycle cellulaire, la résistance aux traitements et la prolifération tumorale [101]. Par exemple, *MALAT1* a été retrouvé comme étant impliqué dans la progression des plasmocytes normaux vers le MM. Ses gènes cibles appartiendraient à la voie de signalisation du protéasome, il apparait donc comme une cible thérapeutique intéressante. Un autre lncRNAs, *MEG3*, régulé positivement par *TP53*, jouerait un rôle de suppresseur de tumeur. Plus de la moitié des patients ont une perte de l'expression de *MEG3*, il pourrait être impliqué dans la différenciation ostéogénique des cellules mésenchymateuses [101]. Beaucoup d'autres lncRNA ont été décrits comme présentant une expression différentielle au cours de la progression de la maladie. Néanmoins leurs fonctions et implication dans la physiopathologie du MM ne sont pas encore bien comprises [102].

L'épissage alternatif est également un événement post-transcriptionnel critique impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la survie. Il a été montré qu'une dérégulation de l'épissage est sous-jacente à des processus pathologiques conduisant notamment au cancer. L'analyse de l'implication de l'épissage dans la myelomagenèse est encore à ses débuts. Certaines équipes ont mis en évidence des événements d'épissage récurrents dans le MM, touchant un gène spécifique comme DCC (deleted in colorectal carcinoma gene) [103]. D'autres études pilotes ont cherché à comparer de façon globale le profil d'épissage entre les cellules plasmocytaires normales (PCN) et les cellules de myélome multiple (MMC) dans de larges cohortes de patients. Les résultats préliminaires montrent de nombreux gènes différentiellement épissés entre PCN et MMC ainsi qu'entre les patients

t(4 ;14) et non-t(4 ;14). De plus certains des isoformes présentent une valeur pronostique en EFS et OS [104].

3. Transcriptomique, biomarqueurs et thérapie ciblée

Tout comme pour l'étude du génome, l'analyse du transcriptome a ouvert un nouveau champ des possibles en termes de prise en charge des patients atteints de MM. Les applications majeures résident dans l'identification de patients à risques, la prédiction de la réponse aux traitements et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'analyse détaillée des profils transcriptomiques des cellules du MM offre l'opportunité de prédire l'évolution de la maladie et la survie des patients (biomarqueurs pronostiques). Les patients identifiés à haut risque peuvent notamment être inclus dans des essais cliniques qui étudient des thérapies différentes des prises en charges standard. Plusieurs études ont mis en évidence des associations entre le GEP et l'OS pour construire ces signatures. Ainsi, les signatures en provenance des analyses de l'University of Arkansas of Medical Sciences (UAMS) [105] et des données issues de l'essai clinique HOVON-65/GMMG-HD4 [106], regroupent respectivement 70 et 92 gènes et identifient les patients de haut risque au diagnostic et à la rechute. Une autre étude de l'UAMS a également trouvé une signature permettant d'identifier les patients présentant un SMM avec un risque de progression plus élevé que des patients ayant un profil de progression MGUS-like [107]. Cette signature pourrait permettre de débiter le traitement au moment le plus adapté en cohérence avec une étude clinique montrant que la survie des patients est améliorée lorsque la thérapie est initiée tôt pour les patients présentant un SMM de risque élevé [108]. Enfin, la signature obtenue dans l'étude de l'Intergroupe Francophone du Myélome comprend 15 gènes impliqués dans le cycle cellulaire identifiant les patients à haut risque [109]. D'autres signatures stratifient les patients en regroupant des gènes impliqués dans la mort cellulaire [110], la prolifération [111] ou encore codant pour les protéines du centrosome (centrosome index) [112]. Par ailleurs, un groupe a récemment évalué si l'intégration des signatures existantes pouvait être prédictive au diagnostic et à la rechute. Les résultats montrent qu'une combinaison de signatures pronostiques permet une meilleure stratification par rapport à une signature seule [113]. Ainsi, les profils d'expression des patients (GEP) constituent un outil de pronostique fiable qui a été validé dans différents essais cliniques. En pratique l'application clinique reste limitée car aucun consensus universel n'a été adopté pour une utilisation générique adaptée à toutes les populations de

patients. En revanche, il existe des applications en local, comme par exemple à Montpellier et à Heidelberg où les facteurs pronostiques sont intégrés en routine clinique [114].

L'analyse du GEP peut être utilisée pour prédire la réponse aux traitements dans l'objectif d'une prise en charge plus adaptée (biomarqueurs prédictifs). *Terragna et al.* ont identifiés une signature d'expression dans le contexte du traitement par combinaison de trois molécules, le bortezomib, le thalidomide et la dexaméthasone chez les patients au diagnostic. Cette signature prédit une réponse complète au traitement avec une médiane de précision à 75% [115]. Une signature de 17 gènes a été identifiée prédisant la rechute précoce à 1 an des patients traités par thérapie à haute dose, une situation qui concerne 15% des patients [116]. Une autre étude a identifié une signature de 8 gènes prédisant une réponse complète correcte à 71% chez des patients ayant subi un traitement d'induction thalidomide-dexaméthasone suivi d'une autogreffe. Les patients prédits comme ayant une réponse complète, ont montré un taux de réponse complète statistiquement plus élevé après autogreffe et un temps de progression plus long en EFS et OS [117]. Enfin notre équipe a construit deux scores prédisant la sensibilité des cellules de MM aux inhibiteurs des ADN méthyltransférases (DNMTi) [118] et aux inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) [119].

Dans l'objectif du développement d'une médecine de précision, l'analyse du transcriptome peut permettre d'estimer l'activation ou la dérégulation de certaines voies de signalisations et donc fournir des informations importantes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et sélectionner le bon traitement. Par exemple la présence de niveau élevé de DKK1, qui est également prédictif des lésions osseuses, peut être exploitée pour une utilisation des molécules anti-DKK1 [120,121].

D'autre part, des traitements ciblant les miRNA sont en cours de développement et pourront être une nouvelle option thérapeutiques intéressante. A titre d'exemple, *Di Martino MT et al.* ont développé un miR-34a synthétique responsable de l'inhibition des protéines cibles clés impliquées dans la progression du MM et ayant un effet anti-tumorale chez la souris [122].

D'autres petites molécules affectant la fonction des miRNA sont en cours de développement. L'épissage de *XBPI* est une cible thérapeutique intéressante. Cette protéine est essentielle dans la différenciation plasmocytaire normale et fait partie de l'UPR (unfolded protein response) en réponse à un stress du réticulum endoplasmique. Elle est indispensable pour la prise en charge des protéines présentant une mauvaise conformation, avec une nécessité d'en produire un variant épissé pour le contrôle de l'UPR. Il a été montré que les stratégies permettant de cibler et inhiber l'épissage de *XBPI*, augmentaient la sensibilité du MM au bortezomib, un inhibiteur

du protéasome [123]. Une étude plus approfondie du spliceosome du MM pourrait permettre de trouver d'autres cibles de ce type.

L'étude du transcriptome a permis de révéler de nombreux biomarqueurs pronostiques et prédictifs ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. Beaucoup des données transcriptomiques ont été générées dans le contexte de traitements spécifiques comme le thalidomide, lenalidomide et bortezomib avec et sans autogreffe. Ces données devront être réévaluées en parallèle de l'évolution des traitements dans le MM. En particulier le développement de nouvelles prises en charges comme les thérapies basées sur les anticorps (elotuzumab, daratumumab), de nouveaux IMiDs et inhibiteurs du protéasomes [124,125] modifient considérablement le pronostic et nécessiteront de nouvelles études de GEP [78]. Par ailleurs l'évolution du transcriptome est un facteur important à prendre en compte pour l'obtention d'une information complète, en ce sens il sera intéressant de réaliser ces études tout au long de l'évolution de la maladie : au diagnostic, au cours de la réponse et à la rechute.

III. Epigénome

L'épigénétique est définie comme l'étude des changements héréditaires de l'expression des gènes qui n'impliquent pas d'altération des séquences d'ADN [126]. Les modifications épigénétiques jouent d'importants rôles dans de nombreux mécanismes biologiques comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, l'expression des gènes de façon tissu spécifique ou encore l'inactivation du chromosome X [126]. La méthylation de l'ADN et la modification post-traductionnelles des histones sont des processus importants et complémentaires responsables de la régulation épigénétique. Leur dérégulation est à l'origine de l'expression aberrante de certains gènes critiques et peut être ainsi responsable de l'initiation du cancer, son développement et sa progression [127,128]. De récentes études ont montré que les modifications épigénétiques ont un impact non seulement sur l'initiation et la progression du myélome multiple mais également sur l'hétérogénéité clonale et la réponse aux traitements [129,130].

1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est définie par l'ajout covalent d'un group méthyle au cycle aromatique des résidus cytosines des dinucléotides CpG (CpG). Les CpG sont concentrés sur de larges clusters appelés îlots CpG (CGIs). Ce sont typiquement des régions de 300 à 3000

paires de bases qui sont retrouvées à proximité ou dans 40% des promoteurs de gènes chez les mammifères. Ils représentent 3 à 6 % des cytosines totales du génome [131]. La méthylation est régulée par deux grands types d'enzymes, les DNMTs (DNA methyltransferase) et les TETs (Ten-eleven translocation). Les DNMT transfèrent un groupe méthyle à partir d'une S-adenosyl-L methionine (SAM). Il y'a trois DNMT majeurs : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. DNMT1 maintient la méthylation déjà existante à la suite de la réplication de l'ADN. DNMT3a et DNMT3b sont dites « *de novo* » et sont responsables de la mise en place des motifs de méthylation durant le développement. Les TETs sont des DNA hydroxylases qui sont impliquées dans la deméthylation de l'ADN via l'oxydation des 5-methylcytosines (5mC) en 5-hydroxymethylcytosines (5hmC). La méthylation peut avoir un effet sur l'expression des gènes en empêchant directement la fixation des facteurs de transcription ou alors en recrutant des protéines comprenant un domaine MBD (methyl CpG-binding domain). Ces protéines à leur tour recrutent des enzymes modifiant les histones et des complexes de remodelage de la chromatine.

Dans un contexte tumoral, des changements du niveau de méthylation sont retrouvés dans certaines régions du génome. Ces changements peuvent intervenir dans les promoteurs des gènes ou à leur proximité (CGI shores), dans le corps du gène ou alors dans des régions non codantes. Il peut s'agir d'hyperméthylation, dont l'effet attendu est répressif, ou alors d'hypométhylation avec un effet attendu activateur. Des dérégulations des DNMTs, TETs et des protéines MBD sont retrouvées dans de nombreux cancers [126]. De façon générale, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une hypométhylation globale de l'ADN du génome, associée avec une chromatine plus active, et par une hyperméthylation spécifique au niveau des îlots CpG de certains promoteurs [131]. Cette hyperméthylation a pour conséquence une hétérochromatine transcriptionnellement inactive et a été associée avec une méthylation des marques H3K9 [132]. Dans le MM, l'hypométhylation globale de l'ADN est retrouvée et marque la transition de la phase MGUS à MM déclaré [133,134]. Il a également été observé une reméthylation massive à la transition myélome – leucémie plasmocytaire [133]. Ainsi il existe des profils épigénétiques spécifiques aux différentes étapes de la maladie [135]. La méthylation de l'ADN, en particulier l'hypométhylation globale, a été corrélée avec la progression du MM [136] et un mauvais pronostic [137]. Contrairement aux autres cancers, des hyperméthylations spécifiques ont été retrouvées en dehors des CGIs, associées à des régions enhancers introniques. Il a été montré que ces régions sont déméthylées au cours de la NPCD suggérant l'acquisitions de caractéristiques de cellules non différenciées par les cellules du MM ou alors le maintien d'une signature épigénétique d'un myélome progéniteur [138].

D'autres gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose ont été retrouvés hyperméthylés dans les échantillons MM par rapport aux normaux [133]. Parmi ceux-là *CDKN2B*, *CDKN2A*, *INK4a* (p16) et *INK4b* (p15) [133,139] ainsi que certains membres de la voie WNT (*SFRP1/2/4/5*, *DKK3*, *WIF1*, *DPC*) et de la voie JAK/STAT (*SPH1*, *SOCS1/3*) [140–142]. *TP53*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *DAPK*, *CDH1*, *PTGS2* et *DCC* ont également été retrouvés comme hyperméthylés au cours de la progression du MM [143]. Il est à noter que beaucoup de ces études ont été réalisées en étudiant le niveau de méthylation des promoteurs de gènes uniques alors que de nombreuses études montrent aujourd'hui que les conséquences transcriptionnelles de la méthylation de l'ADN dépendent fortement du contexte génétique. Ainsi il est nécessaire de réaliser des études à l'échelle du génome. Ce type d'étude est actuellement rendu possible avec l'essor des nouvelles technologies de séquençage et notamment le ERRBS (Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing).

Les cause des aberrations épigénétiques du MM ne sont pas encore connues. Il a été observée une expression de *DNMT1* plus élevée dans le MM en comparaison avec les cellules plasmocytaires normales. En revanche, l'effet de cette dérégulation sur le niveau de méthylation n'est pas démontré [130]. Le miR-29b, connu comme ciblant *DNMT3a/b*, est fréquemment sous-exprimé dans le MM, avec pour conséquence une surexpression de *DNMT3a/b*. Une étude chez la souris a démontré que la transfection *in vivo* avec un miR-29b synthétique avait pour conséquence une réduction globale de la méthylation et une inhibition de la croissance tumorale. Il augmente également l'efficacité de la 5-azacitidine, un agent deméthylant [144]. De plus, miR-22 a été retrouvé comme ciblant directement *TET2* et comme étant surexprimé dans le MM [145,146].

2. Les marques histones

Les histones sont des protéines qui s'associent à l'ADN pour former la chromatine. En régulant le niveau de compaction de la chromatine, elles contrôlent l'accessibilité de la machine transcriptionnelle aux promoteurs. Plus précisément, la structure de la chromatine est régulée par des groupes de huit histones (2X H2A, H2B, H3 et H4) qui forment les nucléosomes et autour desquels s'enroule l'ADN. Les domaines N-terminaux des histones (queux histones) peuvent être modifiés de façon post-traductionnelle. Ces modifications peuvent, entre-autres, être des méthylations, acétylations, phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations et deaminations qui affectent l'interaction de l'ADN avec les histones et des autres protéines. Elles jouent ainsi

un rôle important dans la régulation de l'expression. Les acétylations interviennent sur le résidu lysine (K) et sont associées à une chromatine transcriptionnellement active. Les méthylations interviennent sur les résidus arginine et lysine et sont associées à la fois à des régions actives ou réprimées. L'état transcriptionnel de la chromatine dépendra alors du résidu modifié, du type de méthylation (mono, di ou tri-méthylation) et de la position génomique (promoteur, enhancer ou gène). De récentes études montrent que ce serait la combinaison des différents types de patterns qui régulerait l'expression de ces gènes, plus que les marques à un niveau individuel. De plus, les modifications histones sont dynamiques et s'influencent entre elles.

La marque H3K36me₂ (Histone H3 lysine 36 di-méthylation) est associée à un statut transcriptionnellement actif de la chromatine et est distribuée aussi bien au niveau des promoteurs que des gènes. Cette marque est catalysée par des lysine methyltransferases telles que NSD1, MMSET (NSD2) et NSD3 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1/2/3). *MMSET* est surexprimé chez ~15% des patients atteints de MM du fait de la translocation chromosomique t(4 ; 14) qui place son loci sous le contrôle de l'enhancer des Ig. La conséquence de cette dérégulation est une altération globale de la méthylation des histones, augmentant la marque activatrice H3K36me₂ et la perte de la marque répressive H3K27me₃ (Histone 3 lysine 27 tri-méthylation) [147]. Ces modifications ont pour conséquence une expression aberrante de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou l'adhésion cellulaire [148].

La marque H3K27me est catalysée par PRC2 (polycomb repressive complexe 2) via sa sous-unité catalytique EZH2. EZH2 régule des gènes cibles impliqués dans de nombreux processus biologiques (pluripotence, prolifération, survie, différenciation, réponse aux dommages à l'ADN) et joue un rôle oncogénique important dans les cancers hématologiques. Dans le MM, EZH2 a été retrouvé surexprimé en comparaison avec les cellules plasmocytaires normales conduisant à des patterns de méthylation de H3K27 aberrants [149]. Cette surexpression a été associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MM [150]. L'expression de EZH2 peut être augmentée par l'IL-6, la voie MYC ou directement par le miR-26a [151]. Plusieurs études montrent une interaction entre les processus de méthylations contrôlés par MMSET et EZH2. En effet, une équipe a récemment montré que malgré une diminution des marques H3K27 du fait de la dérégulation de MMSET, des loci spécifiques présentent un niveau de recrutement de EZH2 élevé conduisant à leur hyperméthylation au niveau de cette même marque [152]. De plus, les cellules qui présentent une surexpression de MMSET sont sensibles aux inhibiteurs d'EZH2 [152] qui conduit à une diminution globale de la méthylation des marques H3K27 et une induction de l'apoptose [153]. Ces résultats suggèrent que EZH2 et les marques H3K27me₃ favorisent la fonction oncogénique de MMSET/ H3K36me₂ dans le MM.

Il a en effet été montré que EZH2 pouvait augmenter l'activité de MMSET en inhibant des miRNA suppresseurs de tumeur ciblant le mRNA de MMSET [154]. Ainsi, une dérégulation de ce mécanisme de contrôle aurait un impact majeur sur la progression tumorale ainsi que sur la réponse aux traitements.

La marque H3K9me1 (Histone 3 lysine 9 mono-méthylation) est essentielle pour la formation de l'hétérochromatine et est aussi bien associée à la répression au niveau des promoteurs que à une chromatine active au niveau des gènes. Cette marque est régulée par des méthyltransférases contenant le domaine SET (SUV39H1/2, G9a) et des deméthylases (KDM3A/B et KDM1A). Ces protéines ont été retrouvées comme dérégulées dans le MM avec des rôles dans la croissance et l'adhésion cellulaire ainsi que l'initiation tumorale [129]. Certaines d'entre elles, comme KDM6A, ont été retrouvées associées à un mauvais pronostic (OS) [155].

L'acétylation des histones, une marque d'activation transcriptionnelle, est régulé par des histones acétyltransférases (HATs) et deacétylases (HDACs). Certaines de ces HATs, telles que EP300 et CREBBP, ont été retrouvées comme mutées chez les patients atteints de MM et dans les lignées cellulaires [155,156]. De plus, les HDACs sont retrouvées comme surexprimées chez les patients atteints de MM et un niveau élevé d'HDACs de classe I (HDAC 1-3 et 8) est associé à un mauvais pronostic [157].

3. Interactions entre méthylation de l'ADN et modifications des histones

L'un des mécanismes qui entre en jeu dans l'interaction entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones est médié par un groupe de protéines qui ont la capacité de se fixer à l'ADN méthylé. Elles comprennent les MeCP2 (methyl CpG binding protein 2), les MBD1 (methyl-CpG binding domain protein 1) et ZBTB 33 (zinc finger and BTB domain containing protein 33). En se fixant sur les promoteurs méthylés, elles y recrutent les HDACs et les histone lysines méthyltransférases [158,159]. Par ailleurs plusieurs études ont suggéré un lien entre les marques H3K36me3 et la méthylation *de novo*. Ces marques sont catalysées par SETD2 [160] et ont été corrélées avec un enrichissement de la méthylation de l'ADN et une déplétion des acétylations d'histones [160]. Ainsi, on pourrait supposer l'existence de mécanismes où la méthylation de H3K36 joue un rôle dans le recrutement de DNMT3a/b [161]. Il a en effet été montré que DNMT3a contient en sa partie N-terminale un domaine PWWP qui est impliqué dans la reconnaissance de H3K36me3. L'interaction PWWP-H3K36me3 augmente l'activité de DNMT3a pour la méthylation du nucléosome [162]. Par ailleurs, une équipe a récemment montré que l'inactivation de SETD2 dans des cellules rénales tumorales

générerait une hyperméthylation de l'ADN au niveau des sites ectopiques H3K36me3, des loci intergénomiques et des enhanceurs [163]. De façon plus globale, cette même équipe a montré que l'hyperméthylation intervient dans de larges régions différenciellement méthylées qui sont conservées entre différents types de tumeurs présentant une mutation de SETD2. Les gènes surexprimés suite à ces modifications apparaissent comme impliqués dans le retour des cellules à un état moins différencié [163]. D'autres travaux ont montré le lien entre méthylation de l'ADN et H3K4 au travers de DNMT3L qui reconnaît cette marque non méthylée et induit une méthylation *de novo* de l'ADN par le recrutement ou l'activation de DNMT3a [164]. Ces résultats suggèrent que la méthylation de l'ADN et la méthylation de la marque H3K4 pourraient être mutuellement exclusives. De la même façon, une analyse des données issues de séquençage ChIP et après traitement au bisulfite ont révélé que la marque H3K27me3 et la méthylation de l'ADN sont mutuellement exclusives au niveau des CGIs et compatibles pour le reste du génome. Une perte de la méthylation des CpG est associée à une altération de H3K27me3 [165]. De façon intéressante, les promoteurs qui présentent des marques H3K27me3 dans les cellules embryonnaires ont plus de probabilités d'être méthylés au niveau de l'ADN durant la carcinogenèse et la différenciation. Une hypothèse sur ce phénomène est que l'inhibition de ces gènes est initiée par la voie polycomb durant le développement puis que ces gènes subissent de façon ciblée une inhibition sur le long terme via l'acquisition de méthylation de l'ADN dans les tissus où polycomb n'est pas exprimé [166,167]. Par ailleurs PRC2 pourrait être associé à TET1. En effet il a été montré que PRC2 et TET1 forment un complexe dans les cellules embryonnaires de souris. Une inhibition de la sous-unité Suz12 de PRC2 a généré une réduction des 5hmC spécifiquement au niveau des régions présentant des marques H3K27me3. Ce mécanisme pourrait participer à l'exclusion de la méthylation de l'ADN des îlots CpGs (CGIs) qui sont occupés par les protéines polycomb [168]. Il a également été montré que KDM2B interagit avec PRC1 pour permettre son recrutement au niveau des CGIs [169,170].

Ainsi, de plus en plus de résultats montrent l'existence d'une interaction entre la méthylation de l'ADN et les marques histones. Néanmoins il est nécessaire de réaliser des études plus approfondies pour mieux comprendre cette mécanistique épigénétique et son implication dans la physiopathologie du MM.

4. Approches thérapeutiques en lien avec l'épigénome

Plusieurs traitements ciblant des modifications épigénétiques ont été développés et ont démontré une efficacité significative pre-clinique et clinique dans les hémopathies malignes. La 5-Azacitidine (Vidaza) et la 5-aza-deoxycytidine (Decitabine) sont des analogues de la cytosine conduisant à une inhibition de la méthylation de l'ADN. Ces molécules sont approuvées par la FDA et ont montré une efficacité dans les syndromes myélodysplasiques et l'AML. Il a été montré qu'elles ont un effet cytotoxique dans les cellules du MM sans avoir d'effet délétère sur les cellules normales. La 5-azacytidine induit des dommages à l'ADN (DSB – double strand break) et sa réponse est médiée principalement par ATR. Cette molécule présente un effet synergique avec la Doxorubicine et le Bortezomib [171]. La decitabine induit également des dommages à l'ADN et la formation de loci RAD51 et/ou 53BP1 marqueurs respectifs de la HR (homologous recombination) et du NHEJ (non homologous end joining). Elle présente un effet synergique avec l'HDACi JNJ-585 qui a un effet négatif sur le HR [172]. De façon notable, notre équipe a construit un score basé sur 47 gènes modifiés par la decitabine dans les lignées de MM et a montré qu'il était prédictif pour la survie des patients (OS) [118]. De plus ce score est également prédictif de la réponse au traitement à la 5-azacytidine dans les lignées de MM et les cellules primaires de patients [173]. Des études cliniques sont menées pour tester l'efficacité de la 5-azacytidine seule ou en combinaison avec le lenalidomide et la dexaméthasone [174].

Les inhibiteurs de HDAC (HDACi) sont actuellement utilisés dans le traitement de nombreuses hémopathies malignes. L'effet des HDACi comprends l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition du protéasome. HDAC6 est une cible particulièrement intéressante pour la thérapie du MM car elle est impliquée dans l'UPR (Unfolded Protein Response), un mécanisme sur lequel repose la prise en charge d'accumulation d'agrégats protéiques, particulièrement important chez les PCs. Un inhibiteur de cette protéine (WT161) a montré un potentiel intéressant *in vitro* et *in vivo* seul ou en combinaison avec des inhibiteurs des protéasomes [175]. Le Ricolinostat, un autre inhibiteur de HDAC6 présente un effet anti-MM en combinaison avec le carfilzomib, le lenalidomide et la dexaméthasone [176,177].

MMSET étant dérégulé chez une large proportion de patients et associé à un risque de progression élevée, il apparaît comme une cible thérapeutique intéressante. Il a été montré qu'une forte expression de MMSET est responsable de la résistance au Melphalan et que son inhibition augmente l'efficacité des chimiothérapies dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de MM

[178]. Récemment une équipe a développé une molécule ciblant MMSET (LEM-06) ouvrant de nouvelles possibilités d'études biologiques et de développements thérapeutiques [179].

Plusieurs inhibiteurs de EZH2 ont été récemment développés et ont démontré un effet anti-tumoral dans les hémopathies malignes. Certains sont évalués en essais cliniques, comme le Tazemetostat (EPZ-6438), pour les tumeurs hématopoïétiques et solides. Notre équipe a identifié un effet synergique entre le Tazemetostat et le Lenalidomide. Elle a également construit un score permettant d'identifier les patients qui pourraient bénéficier d'un traitement basé sur l'inhibition d'EZH2 [180].

L'effet anti-MM des IMiDs passe par la voie Cereblon. Néanmoins *Endo et al.* ont montré que ces molécules pouvaient impacter la méthylation de l'ADN en inhibant DNMT1, DNMT3a/b et augmenter l'expression de PU1, un suppresseur de tumeur, au travers de la déméthylation de son promoteur [181].

Ainsi les études précédemment réalisées ont montrées que les profils de méthylation ont un impact tout aussi importants que les anomalies génomiques ou les profils transcriptomiques dans le MM. Des analyses plus approfondies de l'épigénome pourront permettre de mieux comprendre la tumorigénèse, la physiopathologie de la maladie, les mécanismes de résistance aux traitements ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Objectifs

Le myélome multiple est une pathologie qui présente une forte hétérogénéité moléculaire associée à une hétérogénéité clinique. Avec le développement des technologies de séquençage et du domaine des omiques la caractérisation de la complexité de la maladie est de plus en plus fine. Elle concerne différentes strates des processus biologiques régulant les fonctions cellulaires avec non seulement des dérégulations au niveau génétique (aberrations chromosomiques, mutations) et transcriptionnel (niveau d'expression) mais également au niveau post transcriptionnel (miRNA, lncRNA, épissage) et épigénétique (méthylation de l'ADN, modification des marques histones). Les études de ces dérégulations ont d'ores et déjà permis d'apporter de nouvelles solutions aux problématiques de prise en charge de la maladie avec l'amélioration des systèmes pronostiques, la découverte de nouveaux biomarqueurs prédictifs à la réponse aux traitements et de nouvelles cibles thérapeutiques. Le développement du NGS permet d'accéder à des niveaux de détails de l'hétérogénéité plus élevés ce qui permettra de poursuivre dans cette dynamique et proposer des solutions de plus en plus performantes dans l'optique de développer une médecine de précision. C'est dans cet objectif que s'inscrit ma thèse au travers de l'analyse des données issues de WES, RNAseq et ERRBS/450k de cellules primaires de patients (MMC) et lignées cellulaires de MM (HMCLs). Ainsi, nous avons étudié les données issues de WES d'une cohorte unique de 30 lignées de myélome multiple, représentatives de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie, afin de proposer le premier paysage mutationnel des HMCLs et révéler de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus nous avons travaillé sur l'analyse des données de transcriptome de 674 patients au diagnostic (étude MMRF CoMMpass) afin de proposer un nouveau score pronostic basé sur le RNAseq. Enfin nous avons analysé les données issues de ERRBS de 44 patients et les données de puces 450K de 21 lignées de MM afin de mesurer l'implication de la méthylation de l'ADN au niveau pronostic, dans la réponse aux traitements et dans la physiopathologie du MM.

Resultats

Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance

Veronika Vikova, Michel Jourdan, Nicolas Robert, Guilhem Requirand, Stéphanie Boireau, Angélique Bruyer, Laure Vincent, Guillaume Cartron, Bernard Klein, Olivier Elemento, Alboukadel Kassambara*, Jérôme Moreaux*

* These authors contributed equally to this work and share last authorship

Theranostics 2019; 9(2): 540-553. doi: 10.7150/thno.28374

Les lignées cellulaires de myélome multiple (HMCLs) sont indispensables aux travaux de recherche sur le MM et ont contribué fortement à la compréhension des processus sous-jacents à la progression tumorale. Elles sont une ressource illimitée de cellules tumorales et représentent une alternative aux cellules primaires de patients qui ne peuvent pas être maintenues *in vitro*. La caractérisation du paysage mutationnel des HMCLs permettra de fournir une base pour choisir des lignées pertinentes afin d'étudier un aspect particulier de la biologie du MM, pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou pour cribler de potentielles molécules thérapeutiques. Dans cette étude nous avons dressé le premier paysage mutationnel d'une cohorte de 30 HMCLs à partir de données WES. Par ailleurs nous avons évalué la sensibilité des HMCLs à 10 molécules thérapeutiques. Nous avons identifié une liste de 236 gènes dont les mutations ont été prédites comme affectant la structure de la protéine codée. 76% de ces gènes ont été retrouvés dans les cellules primaires de patients, suggérant que la cohorte de lignées est représentative de l'hétérogénéité des patients d'un point de vu mutationnel. Parmi ces gènes nous avons retrouvé des gènes connus comme impliqués dans la physiopathologie du MM (*TP53*, voie MAPK, *ATM*, *CCND1*, *RBI*, *FAM46C*) et également de nouveaux gènes impliqués dans des voies des signalisations clés (JAK-STAT, PI(3)K-AKT, réparation de l'ADN, épigénétique). De façon intéressante, l'analyse des variants alléliques a révélé la présence de 1 à 4 sous-clones, un nombre qui est également retrouvé dans les cellules primaires de patients. Ce résultat suggère que les lignées peuvent être utilisées pour étudier l'effet du traitement du MM sur l'évolution sous-clonale. De façon importante nous avons trouvé une association significative entre les mutations de plusieurs gènes et la réponse à des traitements conventionnels et ciblés dans le MM. Ainsi, ces résultats fournissent une ressource unique pour identifier de nouveau gènes associés avec la physiopathologie du MM dont certains d'entre eux pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques et biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements.

Volume 9 | Number 2 | January 2019

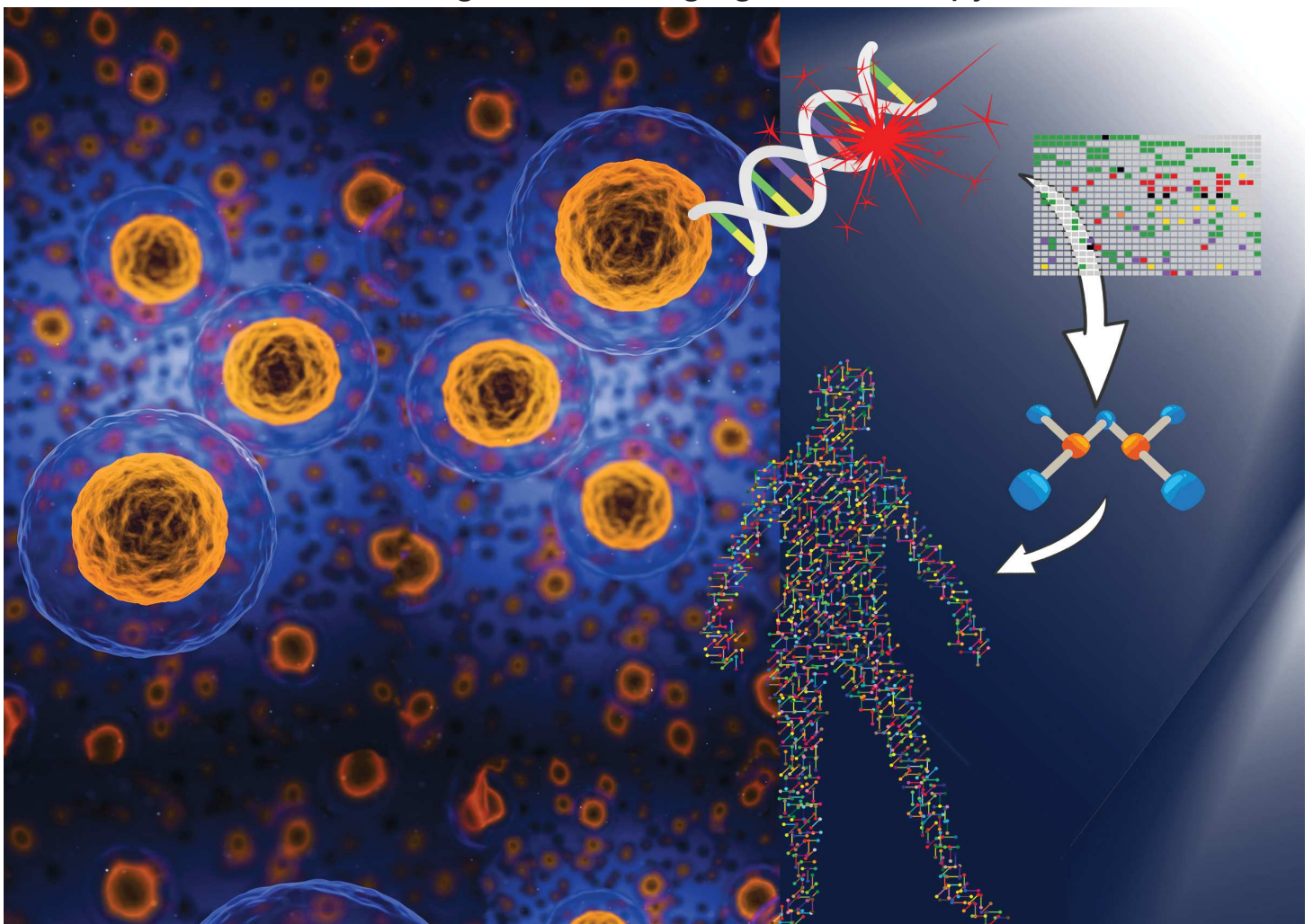
ISSN: 1838-7640

2017 IF
8.537

OPEN ACCESS

Theranostics

The Forum for Diagnostics, Imaging, and Therapy Research



Front Cover:

Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance

Vikova V. et al. pp.540



IVYSPRING
INTERNATIONAL PUBLISHER

Research Paper

Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance

Veronika Vikova¹, Michel Jourdan¹, Nicolas Robert², Guilhem Requirand², Stéphanie Boireau², Angélique Bruyer¹, Laure Vincent⁴, Guillaume Cartron^{3,4,5}, Bernard Klein^{1,2,3}, Olivier Elemento⁶, Alboukadel Kassambara^{1,2,✉}, 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
4. CHU Montpellier, Department of Clinical Hematology, Montpellier, France.
5. Univ Montpellier, UMR CNRS 5235, Montpellier, France.
6. Englander Institute for Precision Medicine, Institute for Computational Biomedicine, Weill Cornell Medical College, 1305 York Avenue, New York, NY 10021, USA;

*These authors contributed equally to this work and share last authorship.

✉ Corresponding author: Jérôme Moreaux, Laboratory for Monitoring Innovative Therapies, Department of Biological Hematology, Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier, 80, av. Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, IGH - Institute of Human Genetics, CNRS UMR 9002. <http://www.igh.cnrs.fr/>. Phone: +33 (0)4 67 33 79 03; fax: +33 (0)4 67 33 70 36; mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2018.07.08; Accepted: 2018.12.12; Published: 2019.01.01

Abstract

Human multiple myeloma tumor cell lines (HMCLs) have been a cornerstone of research in multiple myeloma (MM) and have helped to shape our understanding of molecular processes that drive tumor progression. A comprehensive characterization of genomic mutations in HMCLs will provide a basis for choosing relevant cell line models to study a particular aspect of myeloma biology, or to screen for an antagonist of certain cancer pathways.

Methods: We performed whole exome sequencing on a large cohort of 30 HMCLs, representative of a large molecular heterogeneity of MM, and 8 control samples (epstein-barr virus (EBV)-immortalized B-cells obtained from 8 different patients). We evaluated the sensitivity of HMCLs to ten drugs.

Results: We identified a high confidence list of 236 protein-coding genes with mutations affecting the structure of the encoded protein. Among the most frequently mutated genes, there were known MM drivers, such as *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *ATM* and *FAM46C*, as well as novel mutated genes, including *CNOT3*, *KMT2D*, *MSH3* and *PMS1*. We next generated a comprehensive map of altered key pathways in HMCLs. These include cell growth pathways (MAPK, JAK-STAT, PI(3)K-AKT and TP53 / cell cycle pathway), DNA repair pathway and chromatin modifiers. Importantly, our analysis highlighted a significant association between the mutation of several genes and the response to conventional drugs used in MM as well as targeted inhibitors.

Conclusion: Taken together, this first comprehensive exome-wide analysis of the mutational landscape in HMCLs provides unique resources for further studies and identifies novel genes potentially associated with MM pathophysiology, some of which may be targets for future therapeutic intervention.

Key words: human multiple myeloma cell lines, exome sequencing, mutational landscape

Introduction

Multiple myeloma (MM) is the second most widespread hematological cancer; it is characterized by the accumulation of malignant plasma cells within the bone marrow.

Despite the survival improvement brought by current treatments, the majority of patients relapses and succumbs to the disease with a median survival of 6 years [1].

MM is a highly heterogeneous disease at genetic and clinical levels [2–4]. Recent studies, using next-generation sequencing, have revealed the complex mutational landscape of MM patients as well as a considerable intraclonal heterogeneity in association with drug resistance and tumor progression [5–7]. Given these observations, the improvement of MM treatment might come from personalized medicine, taking into account the patients' genetic background [6].

A major difficulty in advancing the understanding of drug resistance in MM is the availability of primary tumor cells. MM cells can survive for several days of culture, but cannot be expanded *in vitro* for the vast majority of patients. This represents a serious limitation for a meaningful biological study on the resistance mechanisms. An alternative strategy is to use MM cell lines as an unlimited source of tumor cells.

Human multiple myeloma cell lines (HMCLs) have been widely used for the understanding of MM biology, the identification and validation of target genes, and the screening of potential anti-myeloma drugs. However, biological studies in MM are often performed with a restricted number of HMCLs that are poorly characterized at the molecular level and do not reflect the heterogeneity of MM patients. In the past few years, we have derived a large cohort of patient-derived HMCLs that remain dependent on the addition of exogenous MM growth factors, thereby reflecting primary tumor conditions [8]. Using these myeloma cell lines, we recently described that they recapitulate the molecular heterogeneity found in MM primary tumors by analyzing the gene expression profile [8]. However, the mutational landscape of human myeloma cell lines has never been described.

A comprehensive characterization of genomic mutations in myeloma cell lines would advance our understanding of myeloma pathophysiology and could also provide a basis for choosing relevant cell line models to study a particular aspect of myeloma biology, or to screen for an antagonist of specific cancer pathways.

In this study, we present, for the first time, the mutational landscape of human myeloma cell lines. We conducted whole-exome sequencing (WES) on 30 HMCLs, representative of the molecular heterogeneity of MM, and 8 control samples (EBV-immortalized B-cells from 8 of the same patients). We identified a high confidence list of 236

protein-coding genes with mutations likely affecting the structure of the encoded protein. These genes include well-known MM drivers such as the tumor suppressor *TP53*, the MAPK pathway (*KRAS*, *NRAS* and *BRAF*), the ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*), cyclin D1 (*CCND1*), the RB transcriptional corepressor (*RB1*) and the family with sequence similarity 46 Member C (*FAM46C*) [6,9]. Additionally, we identified novel mutated genes involved in key pathways, including JAK-STAT, PI(3)K-AKT, DNA repair and chromatin modifier pathways. Interestingly, we found that mutations in *KRAS*, *FAM46C*, *KMT2D*, *PMS1* and *USP6* were significantly associated with drug resistance.

Methods

Samples

XGs human myeloma cell lines (HMCLs) were obtained as previously described [8]. AMO-1, LP1, L363, OPM2, MOLP2, MOLP8, Lopra and SKMM2 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and RPMI8226 from ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA). JLN3 was kindly provided by Dr. Van Riet (Bruxelles, Belgium) and MM1S by Dr. S. Rosen (Chicago, USA). HMCLs were authenticated according to their short tandem repeat profiling and their gene expression profiling using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays deposited in the ArrayExpress public database under accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088. HMCLs characteristics, obtained from previously published analysis results [8], are available in **Table S1**. EBV-immortalized B-cells from 8 different patients have been used as control cells. The patients are those from whom the XG1, XG3, XG5, XG10, XG13, XG14, XG16 and XG19 cell lines were generated.

WES

WES was performed on 30 HMCLs and 8 control samples (EBV-immortalized B-cells from 8 of the same patients). We also performed and analyzed the WES of purified primary MM cells from 59 patients in order to compare mutated genes between HMCLs and primary tumor cells. Forty-three newly diagnosed patients and patients at relapse (N=16) were treated by high-dose chemotherapy plus autograft. Lines of treatments of patients at relapse were described in **Table S2**. Bone marrow samples were collected after patients' written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and institutional research board approval from Montpellier University hospital (DC-2008-417).

The WES library preparation was done with 1000 ng of input DNA. Sequences of exome were enriched

using SureSelect^{xt} kit and SureSelect^{xt} All Exons v5 library (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Paired-end exome sequencing was performed on the enriched exome sequences using the illumina NextSeq500 sequencing instrument (Helixio, Clermont-Ferrand, France), generating 75 bp paired-end reads with 100X average coverage per sample.

Analysis of single nucleotide variants

The workflow of data analysis is illustrated in **Figure 1A**. Read pairs were mapped to the reference human hg19 genome using the Bowtie 2 aligner version 2.3.2 [10]. SAMTools version 1.5 [11] was used to convert Sequence Alignment Map (SAM) files to sorted Binary Alignment Map (BAM) files. Indel Realignment and base quality recalibration steps were completed with GATK 3.8-1 [12]. BCFtools version 1.5 [11] was utilized to detect variants from the BAM file and outputs into a Variant Call Format (VCF) file. We used ANNOVAR version 2017Jul16 [13] to annotate the variants. Mutations were determined by applying a series of filters on the ANNOVAR output. Firstly, we filter out mutations present in control EBV (Epstein-Barr Virus) samples and in dbSNP database (version 138). Synonymous and intronic variants as well as mutations located in segmental duplications were removed, along with variants present in greater than 1% of the 1000 genome project [14] and/or Exome Sequencing Project (ESP6500). Secondly, we prioritize mutations by filtering them based on four deleterious predictors included in the ANNOVAR software (SIFT, PolyPhen2, FATHMM and LRT). Variants are considered for further analyses only if they are predicted deleterious by at least one of the deleterious predictors. Finally, we retain only mutations that were present in COSMIC [15] and/or OncoKB [16] databases. The MAF (Mutation Annotation File Format) file format was used to store the genomic mutations of the different cell lines in the same file. We used the maftools [17] R/Bioconductor package to summarize, analyze and visualize the MAF files. Copy Number Variations (CNV) and IgH translocations were determined by the CNV-seq method [18] and fluorescence in situ hybridization (FISH) [8,19], respectively. Significant mutual exclusive mutations were assessed with the maftools R package [17]. The subclonal heterogeneity was inferred by clustering variants according to their allele frequencies using maftools R package [17]. The subclonal heterogeneity could be inferred by clustering variants according to their allele frequencies [20,21]. inferHeterogeneity function uses density based finite or infinite (dirichlet process) mixture models, to cluster and classify variants into

subclones [22,23]. The presence of different subclones are visualized using density plots of variant allele fraction VAF. Variants on copy number altered regions were excluded. Pathway enrichment analyses were performed using the R package ReactomePA [24] and Kegg database [25–27].

HMCLs response to drug treatment

HMCLs were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with fetal bovine serum (FBS, Eurobio, Les Ulis, France) (10%) and Interleukin 6 (IL6, Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA) for XG cell lines. We evaluated the sensitivity of the cell lines to ten drugs, including Bortezomib (Euromedex), Melphalan (HAC Pharma), Lenalidomide (Selleckchem), Pomalidomide (Selleckchem), IKK2 inhibitor (AS602868), CDK inhibitor (AT7519 CDK1/2/4/5/6/9i, Selleckchem), TSA (Trichostatin A, HDACi, Sigma), SAHA (Suberanilohydroxamic acid, HDACi, Selleckchem), Panabinstat (HDACi, Selleckchem) and Dexamethasone. For a given drug, HMCLs were treated with different concentrations. The IC₅₀ was determined at day 4 using the CellTiter-Glo assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA), as previously described [28,29]. The data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments that were carried out on sextuplet culture wells (**Table S3**). The subset of HMCLs used for analyses were characterized, for drug response, in previous studies [28,30–34] and selected according to the different molecular subgroups previously described by transcriptomic analyzes [8].

Statistical analyses

All statistical calculations were carried out using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The classification of HMCLs into multiple groups based on their mutation profile was done by unsupervised multiple correspondence analysis (MCA) and hierarchical clustering using the R packages FactoMineR [35] and factoextra [36]. Wilcoxon test was used to evaluate the significance of the association between mutated genes and response to treatment.

Results

Landscape of mutations in HMCLs

We performed WES on 30 HMCLs as well as on EBV-immortalized B-cells from 8 patients (used to derive 8 XGs cell lines), which are used as control cells. However, no cell line represents a hyperdiploid subgroup. Two cell lines, XG16 and XG27, are characterized by the absence of recurrent

translocation. XG16 is characterized by chromothripsis, including a huge number of chromosomal rearrangements involving localized genomic regions; it is associated with poor outcome in MM [37].

First, we sought to identify exonic variants, non-synonymous variants and variants predicted to be deleterious, as these are the candidates for cancer pathogenesis and drug targets. We identified 9570 non-synonymous exonic mutations in the cell lines, as specified in the Methods section. These mutations involve a total number of 4743 unique genes. Next, we focused on mutations present in COSMIC and/or OncoKB databases, which contain previously reported, mutated genes in cancers or those having oncogenic functions. We identified a high confidence list of 236 protein coding genes with mutations affecting the structure of encoded protein (Table S4). In these genes, we detected 576 variants (range: 8 – 32; median: 19 per cell lines), including 468 point mutations and 108 insertions/deletions (INDELS). The point mutations include 459 missense and 9 nonsense mutations (Figure S1A-B). Ranking by mutation type indicates an excess of C > T transitions (Figure S1C).

As recurrently mutated genes in HMCLs could represent novel candidate driver genes in MM progression, we investigated the most frequently mutated genes in HMCLs. The top 50 most frequently mutated genes are illustrated in Figure 1B. Twenty-two of the 50 genes were mutated in at least 5 out of the 30 cell lines (17%). These genes include *TP53* (47%), *CNOT3* (43%), *KRAS* (37%), *KMT2D* (33%), *NRAS* (30%), *ATM*, *MN1* and *MSH3* (27%), *FAM46C* (23%), *KMT2B* and *SETD2* (20%), and *EZH2* and *PMS1* (17%). Importantly, some of these genes, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *ATM*, and *FAM46C*, have been previously reported to be a target of recurrent mutations in newly diagnosed MM patients [6,9]. Notably, 86% of the frequently mutated genes in HMCLs were also found to be mutated in at least one primary tumor sample from myeloma patients (Figure 2A-B). One hundred and seventy-nine out of the 236 (76%) identified mutations were also described in primary MM cells from newly diagnosed patients in previous studies [6,9,38,39]. Among them, *CIC*, *KRAS* and *NRAS* were the most frequently mutated genes in patients and were identified at diagnosis (Figure 2A) and relapse (Figure 2B). Interestingly, *FAM46C* mutation was more frequent at relapse than at newly diagnosed patients, underlying its role as a myeloma driver gene. *KMT2D* and *SETD2* were mutated only in patients at relapse (Figure 2A-B). Forty percent of the mutations identified in patients present at a higher frequency in HMCLs,

including *TP53*, *CNOT3* and *KMT2D* mutations (Table S5). Moreover, variant allele frequency analysis of mutated genes revealed that HMCLs present one to four subclones, a range that was comparable to MM patients samples (Table S6A-B). This is consistent with previous results demonstrating that HMCLs derived in the presence of IL-6 display a molecular heterogeneity which overlaps one of MM patients [8].

Further analyses were performed, using the 22 frequently mutated genes, to classify HMCLs into multiple groups based on their mutational profile. Unsupervised MCA followed by hierarchical clustering produced 2 major dendrogram branches with 5 subgroups (Figure 3A). Group 1 (LP1, OPM2, SKMM2, XG26, XG23, XG24, L363, XG1, XG16, XG12, and XG13) is mainly characterized by *NRAS*, *CNOT3* and *LRP1B* mutated (MUT) and *KRAS*, *MN1*, *ATM*, *USP6* and *KMT2B* wild type (WT) genes; group 2 (XG25 and XG7) is associated with mutations in *PMS1*, *USP6*, *SETD2*, *KMT2B* and *FAM46C*; group 3 (RPMI, XG11, XG29, Lopra, XG27, MM1S, AMO1, XG20, and XG6) is mainly characterized by the presence of mutations in *KRAS*, *ATM* and *MN1* as well as *CNOT3* WT; group 4 (XG19, JJN3, XG2, and XG28) is characterized by *KMT2B* mutations; cell lines of group 5 (MOLP8, XG5, MOLP2, and XG30) were associated with mutations in *MAP3K1*, *EZH2* and *SETD2* (Figure 3A). We investigated the link between the groups defined by the mutational profile and major MM cytogenetic abnormalities (Figure 3B). No significant association between the molecular heterogeneity defined by the mutational profile and the recurrent IgH translocations was identified (Figure 3B). *Del1p*, *1q gain*, *del13q* and *del17p* were respectively found in 70%, 50%, 56% and 43% of HMCLs. Notably, 10 cell lines are characterized by *TP53* mutation and *del17p* underlining HMCLs with *TP53* bi-allelic event, known to be associated with a dramatic impact on survival in MM (Table S1) [40]. Furthermore, 5 cell lines are associated with *del1p* and *FAM46C* mutations double-hit events (Table S1) [40].

Mutations in key pathways controlling cell growth

Many canonical pathways known to be involved in MM cell survival and proliferation were mutated, including JAK-STAT, PI(3)K-AKT and MAPK (Figure 4A). Mutation of genes involved in the MAPK pathway was the most prevalent (25/28 HMCLs, 89%). In this pathway, the most frequently mutated genes were *KRAS* (39%), *NRAS* (32%), *MAP3K1* (18%) and *BRAF* (11%) (Figure 5A). In addition to these recurrently mutated genes, we found occasional mutations in other genes involved in MAPK

signaling, including *MAP2K2* (7%), *RAC1* (4%), *RAF1* (4%) and *NF1* (4%). Mutations in *KRAS* and *NRAS* were mutually exclusive (Figure S2A). This suggests that mutations occurring simultaneously in these genes might be lethal for cancer cells or that the second mutation did not confer a selective advantage. According to that, *KRAS* and *NRAS* mutations could represent good candidates for therapies based on synthetic lethality. Mutations in the JAK-STAT pathway included *STAT3* (11%), *RUNX1* (11%), *EPAS1* (7%), *JAK3* (7%) and *STAT6* (4%) (Figure 4A and 5A). Mutated genes in the PI(3)K-AKT pathway

include *TSC2* (11%), *TBX3* (7%), *PTEN* (7%), *IKBKB* (4%) and *TSC1* (3%). Notably, several receptors activating these pathways were also mutated, including *ERBB3* (14%), *EGFR* (11%) and *IGF1R* (11%) (Figure 4A and 5A). Additionally, mutations in p53/cell-cycle pathway were detected in 76% of the cell lines (Figure 4B and 5B). The most recurrently mutated genes include *TP53* (61%), *ATM* (35%), *CCND1* (13%), *CDKN2A* (13%) and *RB1* (9%). Importantly, mutations in *CCND1*, *TP53* and *ATM* are associated with a negative impact on survival [38].

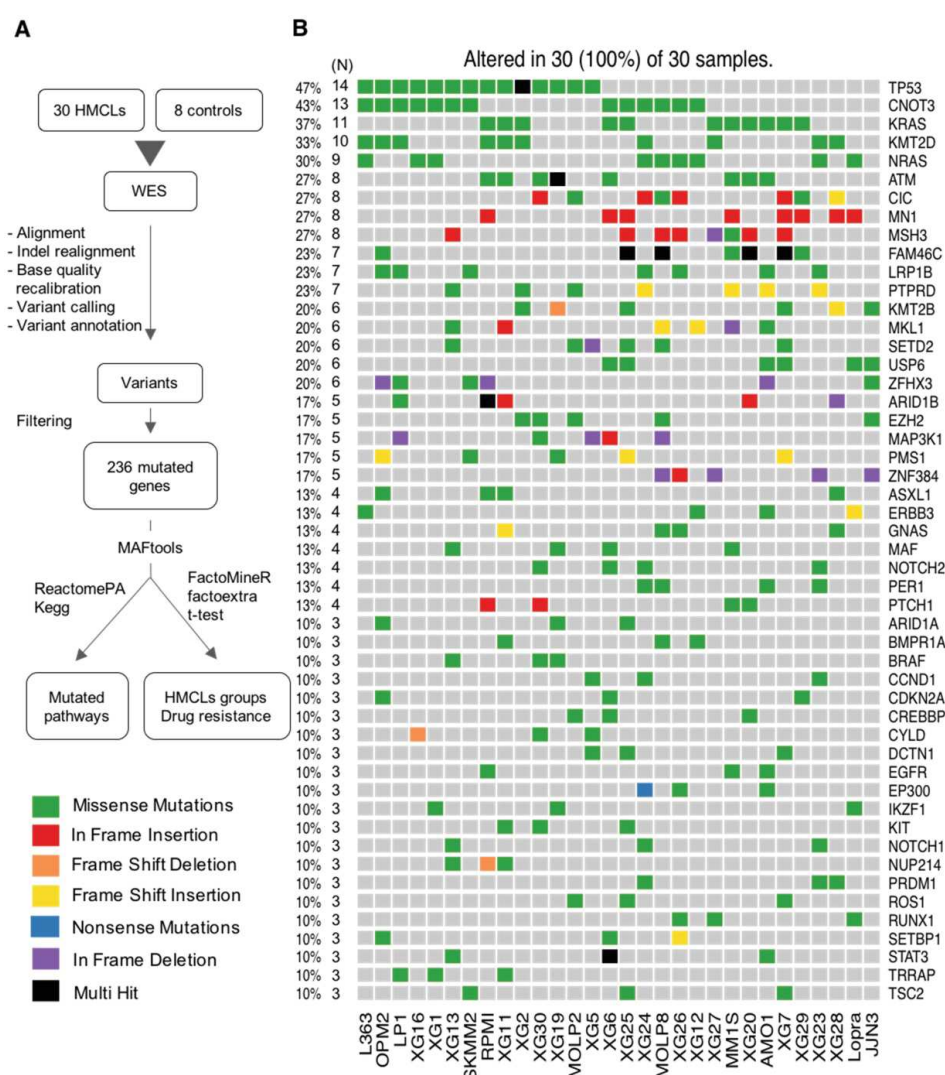


Figure 1. Analysis workflow and human myeloma cell lines (HMCLs) mutational landscape. (A) Exome sequencing data from MM cell lines and control samples EBV-immortalized B-cells were processed in three steps (alignment, variant calling and variant annotation). In order to find mutations, obtained variants were filtered according to four criteria described in the methods section. Mutations were prioritized using four deleterious predictors included in the ANNOVAR software (SIFT, PolyPhen2, FATHMM and LRT). Mutated genes present in COSMIC and/or OncoKB databases were kept for further analyses. Selected mutated genes were analyzed with the R package MAFtools. Pathway enrichment analysis was done with R package ReactomePA and Kegg database. HMCLs were classified into groups based on their mutational profile using the R packages FactoMineR and factoxtra. **(B)** Oncoplot of the top 50 most frequently mutated genes in the HMCLs. Colored squares show mutated genes, while grey squares show non mutated genes. Each color represents a different type of mutations: missense (green), in frame insertion (red), frame shift deletion (orange), frame shift insertion (yellow), nonsense mutations (blue), in frame deletion (purple) and multi hit (black). Percentages above the heatmap represent mutation rate among all cell lines presenting at least one mutated gene of the tested gene list. N is the number of cell lines mutated for a given gene.

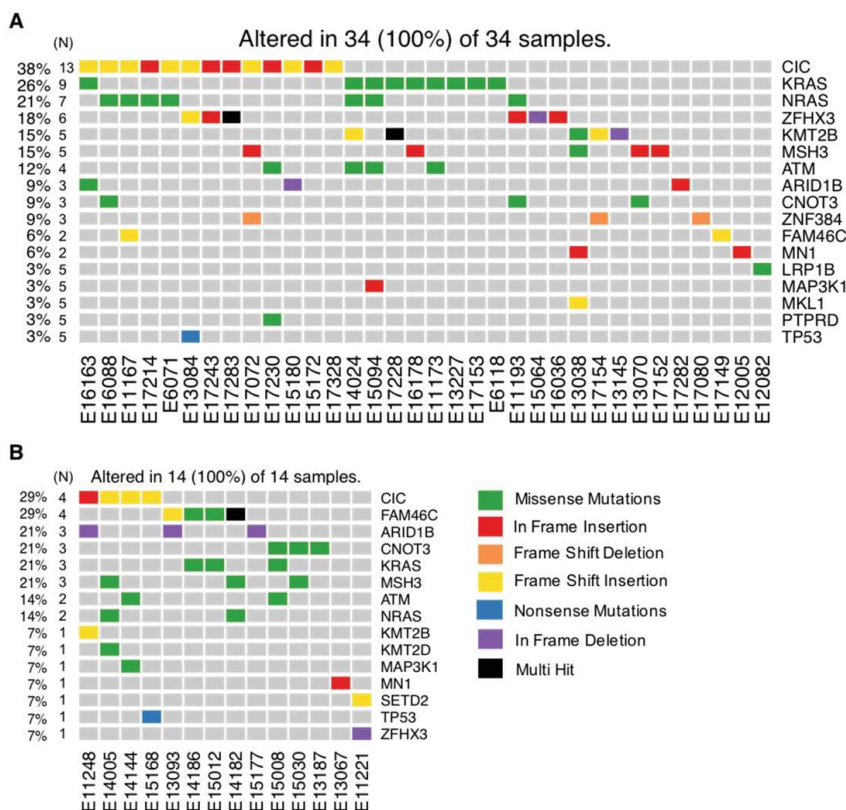


Figure 2. Frequently mutated genes in HMCLs shared with MM patients at diagnosis and relapse. Exome-seq data of 59 MM patients including 43 newly diagnosed and 16 relapsing were processed with the analysis workflow. **(A)** Oncoplot of frequently mutated genes in HMCLs (N >= 5) shared with patients at diagnosis. **(B)** Oncoplot of frequently mutated genes in HMCLs (N >= 5) shared with patients at relapse. Eleven patients without detectable mutations were not included in the figure. N is the number of patients mutated for a given gene.

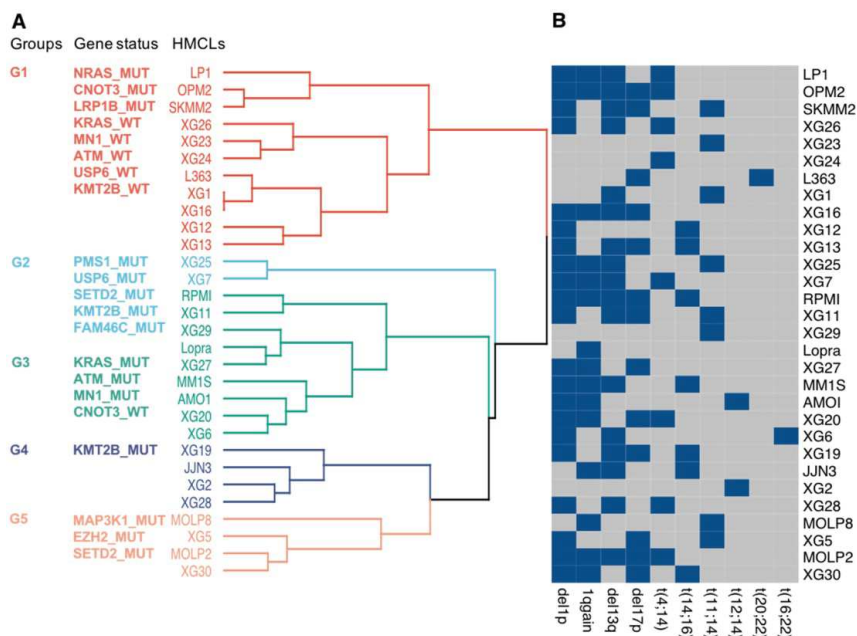


Figure 3. Classification of HMCLs into groups. **(A)** HMCLs were classified into multiple groups based on their mutation profile using multiple correspondence analysis followed by hierarchical clustering. The dendrogram shows five sub-groups with associated mutations. **(B)** HMCLs characteristics. Heatmap showing main CNV and translocations in MM for all cell lines. Blue squares, unlike grey squares, show the presence of the feature in the cell line.

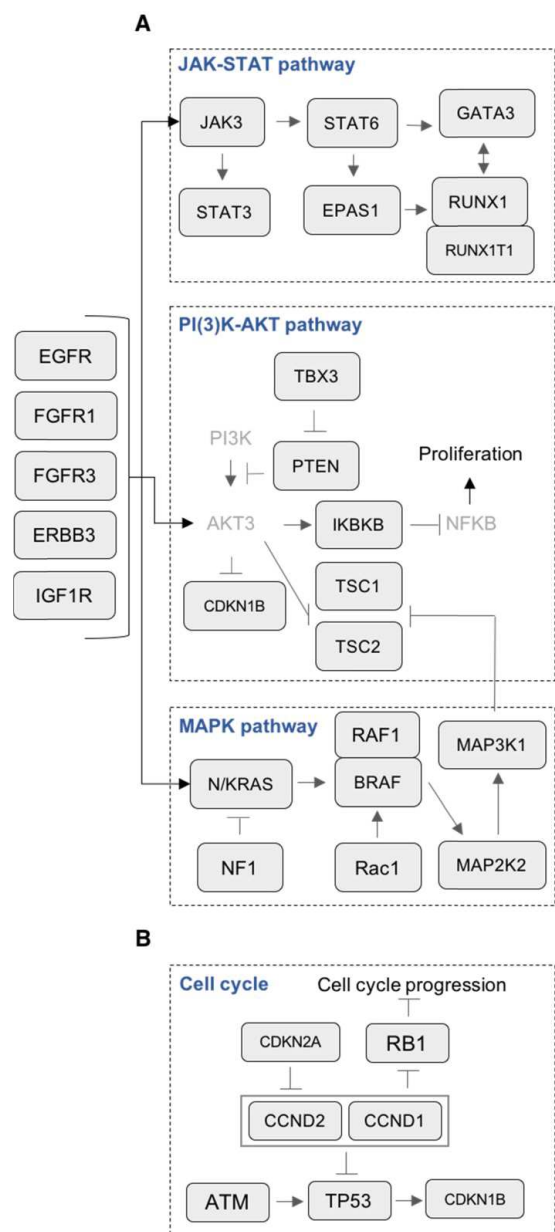


Figure 4. Mutations in key pathways controlling cell growth. (A) Representation of mutated genes in the JAK-STAT pathway, PI(3)K-AKT pathway, MAPK pathway and receptors. Mutated genes are shown in squares. Gene names in light grey color are non-mutated. **(B)** Representation of mutated genes involved in cell cycle.

Mutations in DNA repair pathways

DNA repair is one of the most important biological mechanisms involved in cancer development and drug resistance [41]. Depending on the type of DNA damage, specific DNA repair pathways are used to restore genetic information. Base excision repair (BER), nucleotide excision repair

(NER) and mismatch repair (MMR) operate on nucleotide lesions occurring on single strands. For double-strand breaks, there are two major pathways, including non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). The alteration of DNA repair pathways can promote tumorigenesis and can induce drug resistance. Notably, multiple lines of evidence underlie the close link between DNA damage repair pathways and response to treatment in MM as well as patients' survival [38,42,43]. Our analysis revealed mutations in 16 DNA repair genes (**Figure 6A and 7A**). *ATM* is the most frequently mutated DNA repair gene (MR: 38%), mainly with missense mutations. Other frequently mutated DNA repair genes include *MSH3* (38%; in frame insertion, frame deletion and missense), *PMS1* (24%; missense and frame shift insertion) and *FANCG* (10%; missense). In addition to these recurrently mutated genes, we found occasional mutations in other key genes: *TP53BP1*, *BLM*, *BRCA1*, *ERCC4*, *FANCA*, *FANCD2*, *FANCF*, *MLH1*, *MUTYH*, *PMS2*, *WRN* and *XPA* (**Figure 6A and 7A**).

Mutations in epigenetic modifiers

Our analysis revealed mutations in several chromatin-modifying or chromatin-regulatory key genes, including histone demethylases (*KDM5C*, *KDM5A*, and *KDM6A*), histone methyltransferases (*KMT2A/B/C/D*, *EZH2*, and *SETD2*), genes in polycomb complex (*ASXL1/L2* and *MGA*) and SWI/SNF chromatin remodeling complex (*ARID1A* and *ARID1B*). *KMT2D*, *KMT2B*, *SETD2*, *ARID1B* and *EZH2* were the most frequently mutated genes with various types of alterations (**Figure 6B and 7B**).

Evaluating the association between HMCL mutation profile and response to treatment

We analyzed the relationship between the mutational status of HMCLs and response to conventional drugs in MM (Bortezomib, Melphalan, Dexamethasone and IMiDs) as well as targeted inhibitors (HDAC, CDK and IKK inhibitors). Three pan-HDAC inhibitors have been tested, including Panobinostat, SAHA and TSA.

Importantly, we found a significant (p-value < 0.05) association between several key mutated genes and resistance to drugs, including Panobinostat (*FAM46C* and *KRAS*), Dexamethasone (*KMT2D*), TSA (*PMS1*) and SAHA (*USP6*) (**Figure 8A**).

Additionally, other gene mutations were significantly (p-value < 0.05) related to drug sensitivity, including Lenalidomide (*KMT2D* and *TP53*) and Panobinostat (*TP53*) (**Figure 8B**). Recently, Sievers et al. described key proteins required for the anti-myeloma effects of IMiDs using a CRISPR-Cas9

screen [44]. Investigating mutations in the network involved in IMiDs activity, we identified mutations of *CAND1*, *IKZF1*, *IKZF3*, *NCOR1*, *EDC4*, *PPP6C*, *UBE2D3* and *UBE2M* in our panel of cell lines (Figure 9A-B). Of major interest are HMCLs with a mutation of at least one of these genes that exhibited a significant, 5.4-fold higher resistance to pomalidomide (Figure 9B).

Taken together, this analysis has highlighted key genes with potential importance in drug resistance in MM. Further biological studies will be needed to understand the role of these genes in MM cell response to treatment.

Discussion

HMCLs are invaluable biomedical research tools that have been extensively used to understand MM physiopathology as well as for drug screening. In this study, we report, for the first time, the mutational landscape of the largest HMCLs cohort to date, which is a representative of the large molecular spectrum of the disease. We identified a list of 236 mutated

protein-coding genes, including genes involved in critical pathways such as MAPK (*KRAS*, *NRAS*, *MAP3K1* and *BRAF*) (Figure 4A and 5A), JAK-STAT (*RUNX1*, *STAT3*, *EPAS1*, *JAK3* and *STAT6*) (Figure 4A and 5A), PI(3)K-AKT (*PTEN*, *TSC1/2*, *TBX3* and *IKBKB*) (Figure 4A and 5A), TP53/cell cycle (*TP53*, *CCND1*, *CDKN2A* and *RB1*) (Figure 4B and 5B), DNA repair pathways (*ATM*, *MSH3*, *PMS1* and *FANCG*) (Figure 6A and 7A) and chromatin modifiers (*KMT2D*, *KMT2B*, *SETD2*, *ARID1B* and *EZH2*) (Figure 6B and 7B), as well as in growth factor receptors (*ERBB3*, *EGFR* and *IGF1R*) (Figure 4A and 5A).

Importantly, among the most recurrently mutated genes in HMCLs, there were the previously identified genes in primary MM cells, including *TP53* (47%), *KRAS* (37%), *NRAS* (30%), *ATM* (27%) and *FAM46C* (23%) (Figure 1B)[6,9]. Mutations in CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 3 (*CNOT3*, 43%) and the Lysine Methyltransferase 2D (*KMT2D*, 33%) also appear at high frequencies, highlighting their potential importance in MM tumor progression.

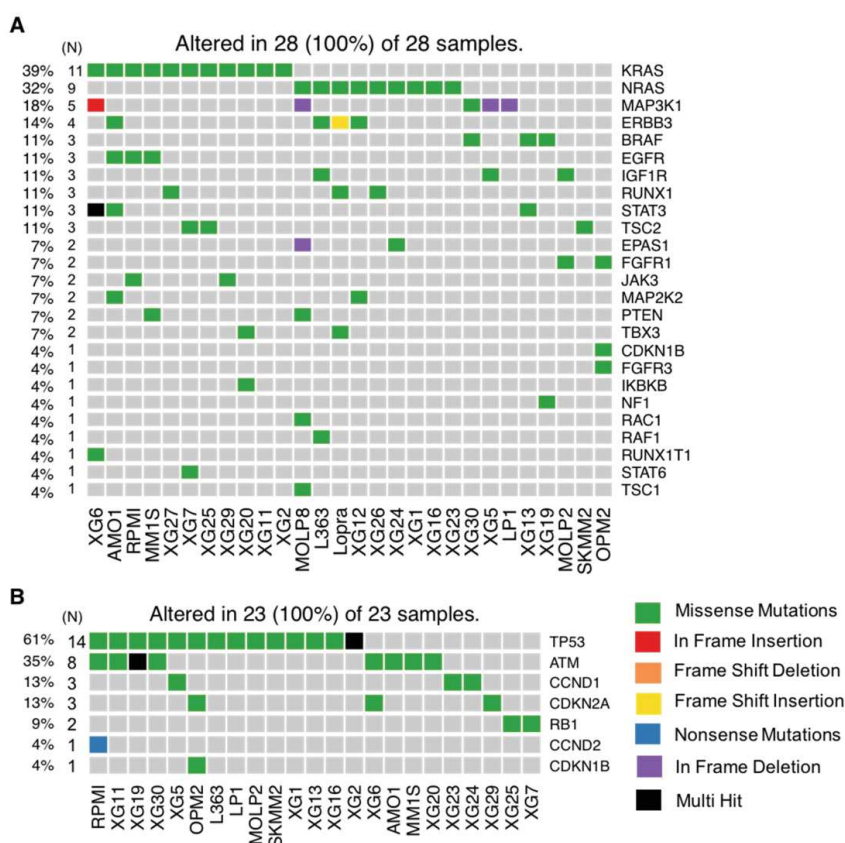


Figure 5. HMCLs mutational portrait for genes involved in cell growth. (A) Oncoplot of all proliferation-mutated genes. Twenty-eight cell lines out of 30 have at least one mutated gene belonging to the proliferation group. **(B)** Oncoplot of all cell cycle mutated genes. Twenty-three cell lines out of 30 have at least one mutated gene belonging to the cell cycle group.

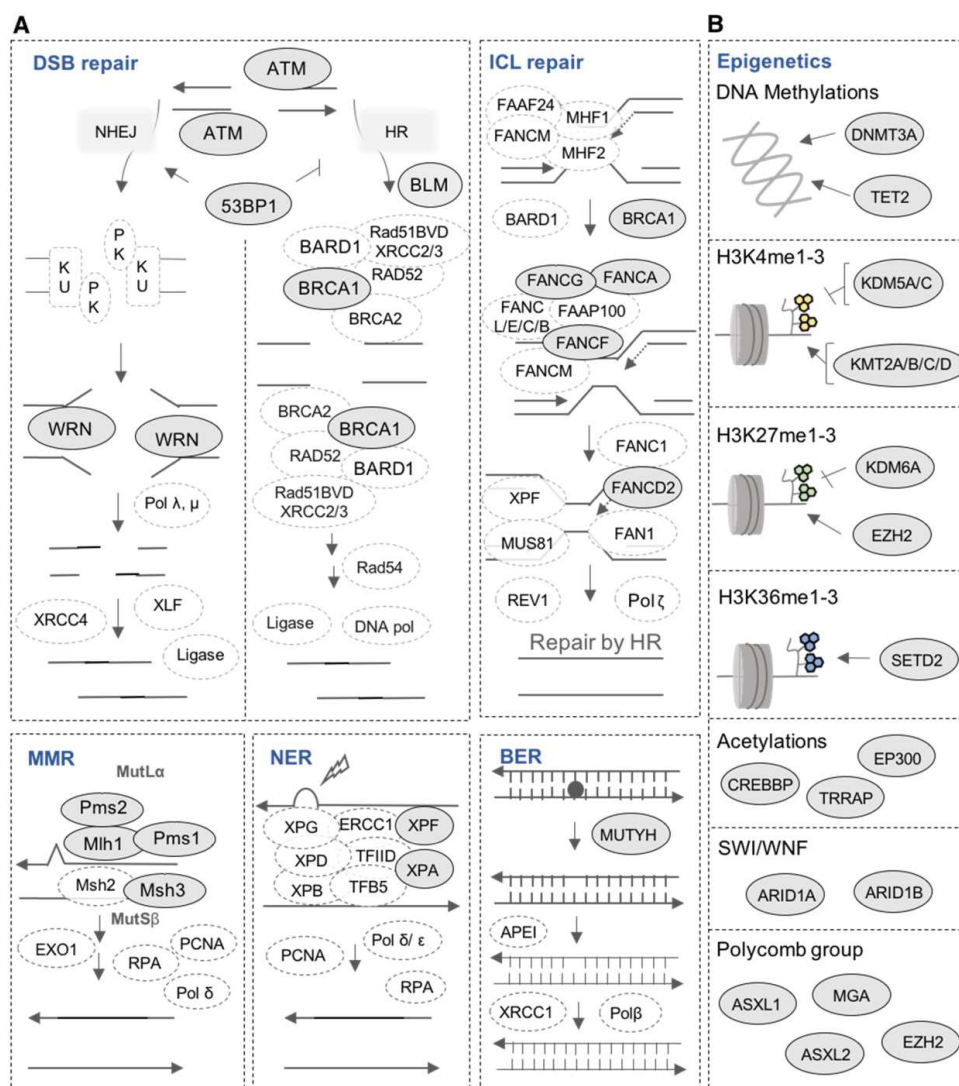


Figure 6. Mutations in DNA repair pathways and epigenetic factors. (A) Representation of mutated genes in the main DNA repair pathways. Mutated genes are shown in filled ellipses. **(B)** Representation of mutated epigenetic factors according to the type of epigenetic modifications they generate.

CNOT3 is part of the CCR4-NOT complex, which is one of the major deadenylases in eukaryotes. Thus, *CNOT3* plays an important role in mRNA stability regulation [45]. Moreover, *CNOT3* has been shown to contribute in early B cell development through the regulation of p53 mRNA stability and Igh rearrangement [45]. In addition, *CNOT3* has been identified as a tumor suppressor in T-ALL [46].

KMT2D has recently emerged as one of the most frequently mutated genes in a variety of cancers [47]. Additionally, *KMT2D* is involved in normal B cell differentiation; *KMT2D* deregulation promotes lymphomagenesis [48]. Mutations in *KMT2D* identified thus far point to its loss-of-function in pathogenesis and suggest its role as a tumor

suppressor in various tissues. Previous studies support that *KMT2D* has distinct roles in neoplastic cells, as opposed to normal cells, and that inhibiting *KMT2D* may be a viable strategy for cancer therapeutics [47,48].

Other novel mutated genes with potential importance in MM biology include *PTPRD* (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type D, 23%) (Figure 1B), *LRP1B* (LDL Receptor-Related Protein 1B, 23%) (Figure 1B), *SETD2* (SET Domain Containing 2, 20%) (Figure 1B, 6B and 7B), *EZH2* (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2, 17%) (Figure 1B, 6B and 7B) and *FANCG* (FA Complement Group G, 7%) (Figure 6A and 7A). *PTPRD* is a protein tyrosine phosphatase signaling molecule that is known to be

involved in oncogenic transformation. It has been reported as frequently lost in many cancers and is associated with tumor-suppressor activity [49]. *LRP1B* belongs to the low-density lipoprotein (LDL) receptor family. *LRP1B* is a putative tumor suppressor and *LRP1B* silencing has been observed in renal and thyroid cancers [50,51]. Mutations in *SETD2* have been found in 12% of B-cell acute lymphoblastic leukemia and in a range between 1% and 2% of B-cell lymphoma; they have also been found in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia (AML) [52]. More recently, *SETD2* mutations were also reported in MM [39]. This gene has a key role in DNA repair since it is required for DNA mismatch repair and for DNA double-strand break repair

[53,54]. Moreover, it has been shown that *SETD2* mutations lead to resistance to DNA-damaging agents in leukemia [55]. *EZH2* (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2) is known to be deregulated in MM [56]. Recently, few studies highlighted the interest to target *EZH2*, with or without being associated with other drugs such as Bortezomib or IMiDs, to overcome MM drug resistance [30,57,58]. *FANCG* is involved in Fanconi anemia, a disorder that is characterized by an impaired bone marrow function and that predisposes to AML [59]. Furthermore, high expression of Fanconi anemia genes is associated with poor prognosis in B cell malignancies, including MM [42,60].

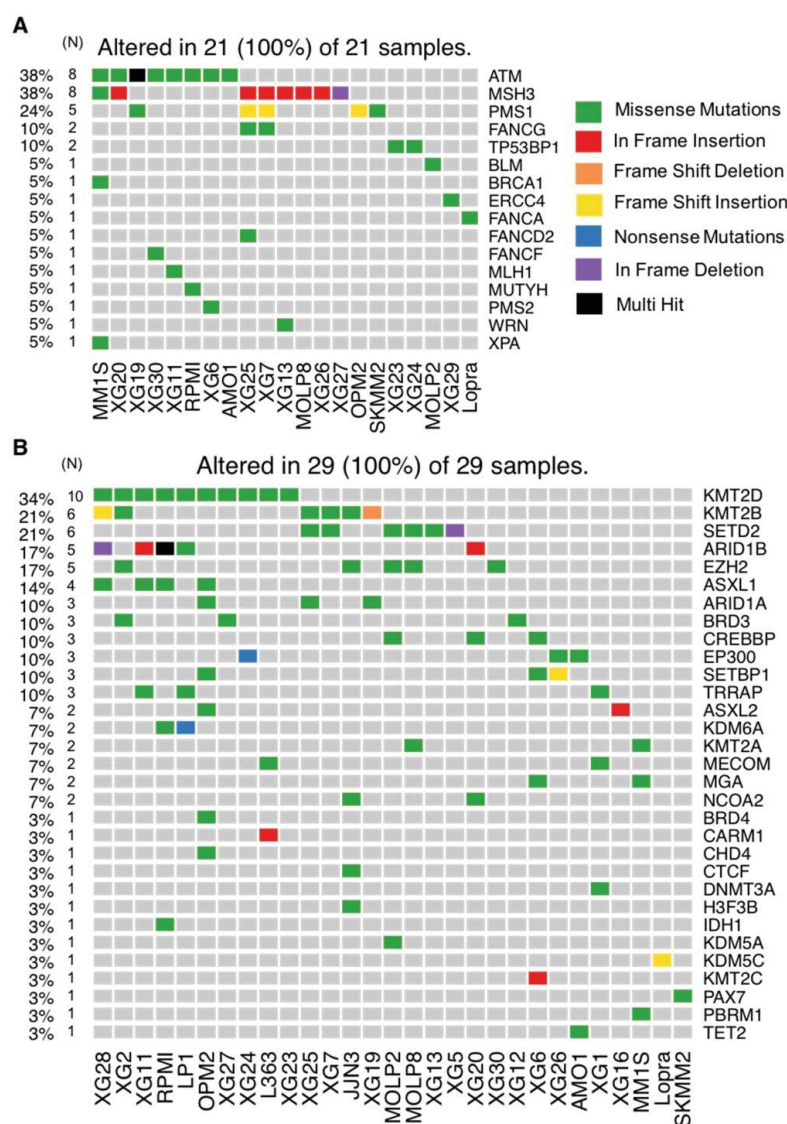


Figure 7. HMCLs mutational portrait for genes involved in DNA repair pathways and epigenetic factors. (A) Oncoplot of all DNA repair mutated genes. Twenty-one cell lines out of 30 have at least one mutated gene belonging to DNA repair pathway. (B) Oncoplot of all mutated epigenetic factors.

Altogether, these data underline mutations of reported tumor suppressor genes that may play a key role in MM progression. It will be of interest to investigate multi-omics analyses integrating RNA-seq, mutations and single nucleotide polymorphisms (SNP) analyses to identify significant associations between genetic abnormalities in this large cohort of MM cell lines.

Interestingly, our analysis reveals that HMCLs present one to four subclones, a range that is similar to primary tumor samples (Table S6A-B). These results suggest that HMCLs can be used to study the effect of MM treatments on subclonal evolution, which is critical to understand the mechanisms underlying relapse from chemotherapy and drug resistance. In this context, analysis of the subclonal composition and phylogenetic pattern of the HMCLs at single cell level will be of particular interest [61].

It is noteworthy that our analysis highlighted mutual exclusive mutations in HMCLs between *KRAS* and *NRAS*, implying that they did not occur together in the same cell lines. Mutual exclusivity is important for the understanding of cancer progression and functional relationships between the alterations. Moreover, genes mutated in a mutually exclusive fashion can be interesting for targeted treatment through a synthetic lethality approach [62].

We also identified 10 HMCLs characterized by *TP53* bi-allelic events and 5 HMCLs presenting del1p and *FAM46C* mutation double hits (Table S1). These cell lines represent a potent model to identify therapeutic strategies in order to improve the survival of patients characterized by these bi-allelic inactivations and poor outcome [40].

HMCLs are potent tools not only to study molecular mechanisms underlying MM but also for first-line tests to decipher drug effects on MM cells. In this study, we found a significant association between mutated genes and drug resistance or sensitivity. These genes include *FAM46C*, *KMT2D*, *KRAS*, *PMS1*, *USP6* and *TP53* (Figure 8A-B). Further studies are needed to validate their biological role in treatment response. *FAM46C* is described as one of the most frequently mutated genes in MM in several studies and its function is largely unknown [63]. Recently, it has been described as a potential onco-suppressor and a non-canonical poly(A) polymerase specific to B-cell lineage [63]. Furthermore, double-hit events involving *FAM46C* are associated with poor outcome in MM patients after relapse [40]. *FAM46C* mutation was associated with higher resistance of HMCLs to Panobinostat, an histone deacetylase inhibitor (HDACi). HDACi are known to activate NFκB through inhibition of *HDAC3*-mediated deacetylation

of the p65/RelA NFκB subunit [64]. This NFκB activation by HDACi participated in the biological rationale of combining HDACi with proteasome inhibitors in MM [65]. According to that, MM cells with *FAM46C* mutations could be associated with lower dependence on NFκB pathway. Notably, we also found significant associations between *TP53* mutations and sensitivity to Panobinostat and Lenalidomide (Figure 8B). These data underlined previous observations indicating that MM cells sensitive to Panobinostat are significantly enriched in genes related to high tumor metabolism and growth compared to resistant ones associated with a more quiescent state [28]. *TP53* bi-allelic event is also associated with a dramatic impact on survival in MM patients after relapse, whereas *TP53* mutations were not associated with a prognostic impact [40]. The higher sensitivity of *TP53* mutated

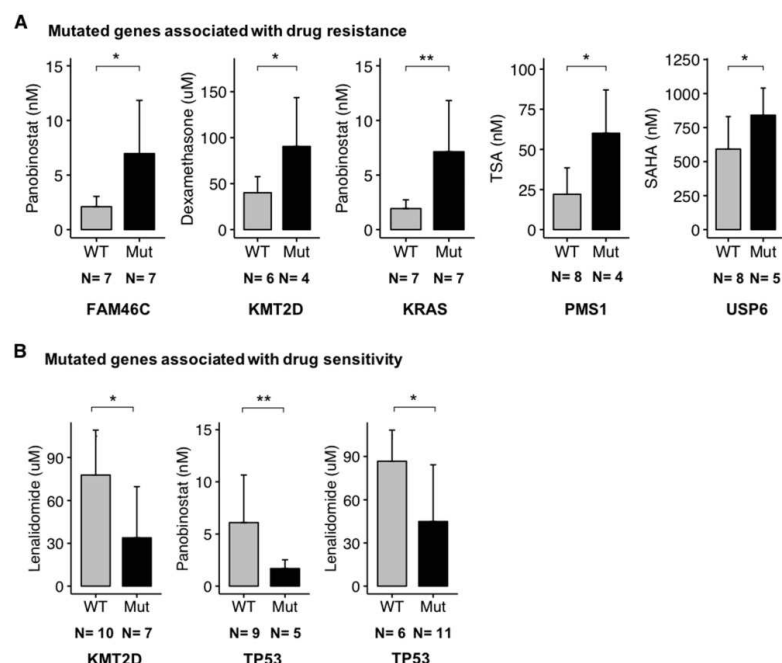


Figure 8. Association between mutated genes and drug response. HMCLs have been treated with a conventional drug used in MM (Dexamethasone, IMiDs) and targeted inhibitors (TSA, SAHA, and Panobinostat). For a given drug, bar plots are the IC₅₀ of the drug according to the mutated genes. The IC₅₀ values in cell lines were compared using Wilcoxon test. (A) Mutated gene associated with drug resistance. (B) Mutated genes associated with drug sensitivity. N is the number of cell lines tested with a given drug and involved in the statistical test. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01. Error bars represent mean standard deviation.

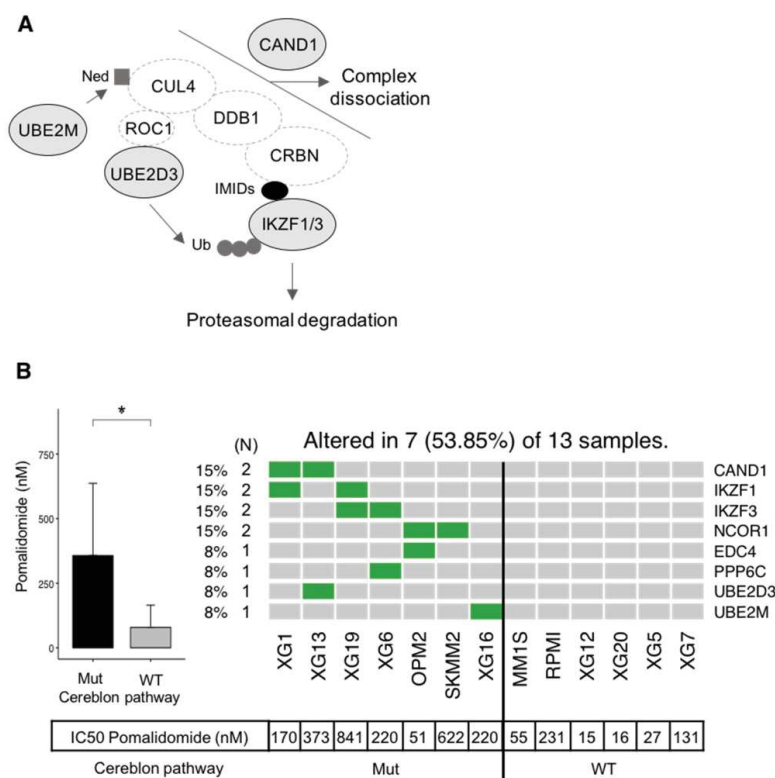


Figure 9. Association between mutated genes involved in the cereblon pathway and resistance to Pomalidomide. (A) Representation of mutated genes involved in IMiD-mediated CRL4^{CRBN} activity. Mutated genes are shown in filled ellipses. **(B)** Seven HMCLs presenting missense mutations of genes involved in the cereblon pathway as well as six HMCLs without mutations (WT) have been treated with Pomalidomide. IC₅₀ of Pomalidomide for each tested HMCL is shown in the table below the heatmap. IC₅₀ of mutated (Mut) and wild type (WT) HMCLs were compared using Wilcoxon test. *: p-value < 0.05. Error bars represent mean standard deviation.

HMCLs to Panobinostat HDACi and Lenalidomide could be of clinical interest in MM patients with *TP53* MM driver mutations. Furthermore, mutations in genes required for IMiD-mediated CRL4^{CRBN} activity [44] have been found to be associated with significant resistance to pomalidomide in our panel of HMCLs. These genes included *IKZF1* and *IKZF3* that are ubiquitinated and degraded by CRL4^{CRBN}, *CAND1* and *UBE2M* cullin-RING ligase regulators, *UBE2D3* E2 ubiquitin-conjugating enzyme and other genes of unclear function (*PPP6C*, *NCOR1* and *EDC4*) (Figure 9). These data illustrate the mechanistic importance of acquired mutations in known genes required for IMiD-mediated toxicity and could open new avenues of therapies aimed at overcoming these processes.

Conclusions

In summary, this study provides a comprehensive map of mutations in HMCLs. Our data provide unique resources for further studies and could help identify novel, critical genes and pathways potentially associated with MM progression. The determination of actionable mutations potentially

associated with drug resistance/sensitivity may open the way for alternative targeted treatments.

Abbreviations

AML: acute myeloid leukemia; BAM: binary alignment map; BER: base excision repair; EBV: Epstein Barr virus; FBS: fetal bovine serum; FISH: fluorescence in situ hybridization; HDACi: histone deacetylase inhibitor; HMCLs: human myeloma cell lines; HR: homologous recombination; IL6: interleukin 6; INDELS: insertions/deletions; MAF: mutation annotation file format; MCA: multiple correspondence analysis; MM: multiple myeloma; MMR: mismatch repair; MR: mutation rate; MUT: mutated; NER: nucleotide excision repair; NHEJ: non-homologous end joining; SAHA: suberoyl anilide hydroxamic acid; SAM: sequence alignment map; TSA: trichostatin a; VCF: variant call format; WES: whole exome sequencing; WT: wild type; T-ALL: t-cell acute lymphoblastic leukemia.

Supplementary Material

Supplementary figures and tables.
<http://www.thno.org/v09p0540s1.pdf>

Acknowledgments

This work was supported by grants from French INCA (Institut National du Cancer) Institute (PLBIO15-256), ITMO Cancer (MM&TT), AF3M and SIRIC Montpellier (INCa-DGOS-Inserm 6045). VV is supported by a grant from Guillaume Espoir association (France).

Contributions

VV performed the research and participated in the writing of the paper. MJ, NR, GR, SB and AB participated in the research. GC, and LV participated in clinical data analysis and participated in the writing of the paper. BK, and OE participated in the research and in the writing of the paper. AK and JM supervised the research and the writing of the paper.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet Lond Engl*. 2015;385:2197-208.
- Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116:e56-65.
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:2020-8.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23:6333-8.
- Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Hulkki S, Potter NE, Johnson DC, et al. Intracлонаl heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood*. 2012;120:1077-86.
- Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:91-101.
- Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120:1067-76.
- Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011;96:574-82.
- Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357-9.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25:2078-9.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43:491-8.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164.
- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68-74.
- Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D777-83.
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017.
- Anand Mayakonda, Phillip Koeffler. Maftools: Efficient analysis, visualization and summarization of MAF files from large-scale cohort based cancer studies. *bioRxiv*. 2016;
- Xie C, Tammi MT. CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:80.
- Popp S, Jauch A, Schindler D, Speicher MR, Lengauer C, Donis-Keller H, et al. A strategy for the characterization of minute chromosome rearrangements using multiple color fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA libraries and YAC clones. *Hum Genet*. 1993;92:527-32.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481:506-10.
- Miller CA, White BS, Dees ND, Griffith M, Welch JS, Griffith OL, et al. SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput Biol*. 2014;10:e1003665.
- Fraley C, Raftery AE. Model-Based Clustering, Discriminant Analysis, and Density Estimation. *J Am Stat Assoc*. 2002;97:611-31.
- Jara A, Hanson TE, Quintana FA, Müller P, Rosner GL. DPpackage: Bayesian Non- and Semi-parametric Modelling in R. *J Stat Softw*. 2011;40:1-30.
- Yu G, He Q-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst*. 2016;12:477-9.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:29-34.
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D457-462.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D353-61.
- Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer*. 2013;109:676-85.
- Viziteu E, Grandmougin C, Goldschmidt H, Seckinger A, Hose D, Klein B, et al. Chetomin, targeting HIF-1 α /p300 complex, exhibits antitumour activity in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2016;114:519-23.
- Herviou L, Kassambara A, Boireau S, Robert N, Requirand G, Müller-Tidow C, et al. PRC2 targeting is a therapeutic strategy for EZ score defined high-risk multiple myeloma patients and overcome resistance to IMiDs. *Clin Epigenetics*. 2018;10:121.
- Jourdan M, Moreaux J, Vos JD, Hose D, Mahtouk K, Abouladze M, et al. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol*. 2007;138:160-8.
- Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:2685-92.
- Moreaux J, Bruyer A, Veyrune J-L, Goldschmidt H, Hose D, Klein B. DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br J Haematol*. 2014;164:613-6.
- Viziteu E, Klein B, Basbous J, Lin Y-L, Hirtz C, Gourzones C, et al. RECQ1 helicase is involved in replication stress survival and drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31:2104-13.
- Lé S, Josse J, Husson F. FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw*. 2008;
- Kassambara A, Mundt F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analysis. 2017.
- Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*. 2011;118:675-8.
- Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33:3911-20.
- Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132:587-97.
- Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016;128:1735-44.
- [Internet] Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*. 2015 [cited 2018 Feb 2]; 6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00157/abstract>
- Kassambara A, Gourzones-Dmitriev C, Sahota S, Rème T, Moreaux J, Goldschmidt H, et al. A DNA repair pathway score predicts survival in human multiple myeloma: the potential for therapeutic strategy. *Oncotarget*. 2014;5:2487-98.
- Gourzones-Dmitriev C, Kassambara A, Sahota S, Rème T, Moreaux J, Bourquard P, et al. DNA repair pathways in human multiple myeloma: role in oncogenesis and potential targets for treatment. *Cell Cycle Georget Tex*. 2013;12:2760-73.
- Sievers QL, Gasser JA, Cowley GS, Fischer ES, Ebert BL. Genome-wide screen identifies cullin-RING ligase machinery required for lenalidomide-dependent CRL4CRBN activity. *Blood*. 2018;132:1293-303.
- Inoue T, Morita M, Hijikata A, Fukuda-Yuzawa Y, Adachi S, Isono K, et al. CNO13 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. *J Exp Med*. 2015;212:1465-79.

46. De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T, et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45:186–90.
47. Guo C, Chen LH, Huang Y, Chang C-C, Wang P, Pirozzi CJ, et al. KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation. *Oncotarget.* 2013;4:2144–53.
48. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee J-E, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med.* 2015;21:1190–8.
49. Wang D, Wang L, Zhou J, Pan J, Qian W, Fu J, et al. Reduced expression of PTPRD correlates with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *PLoS One.* 2014;9:e113754.
50. Prazeres H, Torres J, Rodrigues F, Pinto M, Pastoriza MC, Gomes D, et al. Chromosomal, epigenetic and microRNA-mediated inactivation of LRP1B, a modulator of the extracellular environment of thyroid cancer cells. *Oncogene.* 2011;30:1302–17.
51. Ni S, Hu J, Duan Y, Shi S, Li R, Wu H, et al. Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Sci.* 2013;104:817–25.
52. Licht JD. SETD2: a complex role in blood malignancy. *Blood.* 2017;130:2576–8.
53. Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . *Cell.* 2013;153:590–600.
54. Carvalho S, Vitor AC, Sridhara SC, Martins FB, Raposo AC, Desterro JMP, et al. SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *eLife.* 2014;3:e02482.
55. Mar BG, Chu SH, Kahn JD, Krivtsov AV, Koche R, Castellano CA, et al. SETD2 alterations impair DNA damage recognition and lead to resistance to chemotherapy in leukemia. *Blood.* 2017;130:2631–41.
56. Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, Stein CK, Walters Z, Aronson LL, et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J.* 2017;7:e549.
57. Zeng D, Liu M, Pan J. Blocking EZH2 methyltransferase activity by GSK126 decreases stem cell-like myeloma cells. *Oncotarget.* 2017;8:3396–411.
58. 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.* 2017.
59. Xie Y, de Winter JP, Waisfisz Q, Nieuwint AW, Scheper RJ, Arwert F, et al. Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2000;111:1057–64.
60. Bret C, Klein B, Cartron G, Schved J-F, Constantinou A, Pasero P, et al. DNA repair in diffuse large B-cell lymphoma: a molecular portrait. *Br J Haematol.* 2015;169:296–9.
61. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia.* 2014;28:1705–15.
62. Szczurek E, Beerenwinkel N. Modeling mutual exclusivity of cancer mutations. *PLoS Comput Biol.* 2014;10:e1003503.
63. Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, Gewartowska O, Gruchota J, Cysewski D, et al. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2017;8:619.
64. Chen L-F, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF- κ B transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med Berl Ger.* 2003;81:549–57.
65. Harrison SJ, Quach H, Yuen K, Strayer A, Copeman MC, Peinert S, et al. High Response Rates with the Combination of Bortezomib, Dexamethasone and the Pan-Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma in a Phase I/II Clinical Trial. *Blood.* 2008;112:3698.

RNA-sequencing based transcriptomic score with prognostic and theranostic values in multiple myeloma

Veronika Vikova, Alboukadel Kassambara, Angélique Bruyer, Nicolas Robert, Guilhem Requirand, Laure Vincent, Guillaume Cartron, Olivier Elemento, Jérôme Moreaux

Submission to Theranostics

L'analyse des données d'expression ont permis des avancées considérables dans la compréhension et la prise en charge du myélome multiple. En effet, comme vu précédemment, l'analyse des données transcriptomiques des patients au diagnostic ont mis en évidence une hétérogénéité moléculaire avec la définition de plusieurs sous-groupes de patients caractérisés par des signatures spécifiques. De nombreuses signatures ont été construites (UAMS, HOVON-65/GMMG-HD4, IFM) permettant de différencier les patients à haut risque, d'autres ont été reliées à des mécanismes biologiques importants pour la progression du MM et enfin certaines décrivant la résistance permettent de prédire la réponse aux traitements. Cependant la plupart de ces études ont été réalisées avec les données issues des technologies de puces à ARN. Une analyse des données issues du NGS (RNAseq) permettra de découvrir de nouveaux marqueurs, des associations avec la réponse aux traitements et des mécanismes sous-jacents à la physiopathologie du MM. Dans cette étude nous avons construit un score de 267 gènes basé sur les données ARNseq de 674 patients au diagnostic (étude CoMMpass). Nous avons validé ce score dans une cohorte indépendante de 68 patients au diagnostic issue de notre centre. Notre score présente une valeur pronostique dans ces deux cohortes indépendantes. Les patients de hauts risque sont caractérisés par des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la voie MYC et des modifications épigénétiques. De façon intéressante notre score a été associé avec le profil mutationnel et la réponse à des traitements ciblés des cellules de MM ce qui montre un intérêt pour l'implémentation de stratégies de médecine de précision dans le MM.

RNA-sequencing based transcriptomic score with prognostic and theranostic values in Multiple Myeloma

Veronika Vikova¹, Alboukadel Kassambara¹, Angélique Bruyer¹, Nicolas Robert³, Guilhem Requirand³, Laure Vincent⁴, Guillaume Cartron^{4,7,8}, Olivier Elemento, Jérôme Moreaux^{1,3,8}

¹ IGH, CNRS, Univ Montpellier, France

² Department of Hematology and Immunology, Myeloma Center Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium,

³ CHU Montpellier, Laboratory for Monitoring Innovative Therapies, Department of Biological Hematology, Montpellier, France,

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

⁷ Université de Montpellier, UMR CNRS 5235, Montpellier, France

⁸ Univ Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

Corresponding author:

Jerome MOREAUX,

Laboratory for Monitoring Innovative Therapies

Department of Biological Hematology

Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier

80, av. Augustin Fliche

34295 Montpellier Cedex 5

IGH - Institute of Human Genetics

UMR 9002, CNRS and University of Montpellier

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

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

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

mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

Introduction

Multiple Myeloma (MM) is an incurable malignant plasma cell disorder characterized by a strong molecular heterogeneity associated with a high impact on clinical outcome [1–3]. Given this heterogeneity, one of the current challenges is to precisely predict survival and treatment response according to patients' molecular characteristics in order to develop personalized medicine.

Gene expression profiling (GEP) have bring major insights in both comprehension and clinical management of the disease. Indeed, analysis of patients' transcriptomic data at diagnosis highlighted a significant molecular heterogeneity characterized by specific gene signatures and associated with clinical outcomes [4]. Several GEP-based signatures predicting prognosis have been reported, including UAMS (70 genes) [5], HOVON-65/GMMG-HD4 (92 genes) [6] and IFM (15 genes) [7] studies, which identifies high risk patients at diagnosis and relapse. Moreover, we have previously built a three-group risk prediction model for OS (RS score) [8]. Other signatures with prognostic values have been related to biological mechanisms important for MM progression [9–12]. GEP-based related signatures describing drug resistance have also been reported including prediction of reponse to PIs [13–16], Melphalan [17], IMiDs [18], HDACi [19], DNMTi [19,20], EZH2 inhibitors [21] or kinase inhibitors [22].

Thus, clinical translation of GEP in MM are useful for predicting prognosis and screening of resistance markers with benefit for clinical management. However most of the studies have been done using microarray techniques which entail the analysis of a limited number of gene sets. Analyzing transcriptomic landscape through next generation sequencing technologies will enable to discover new prognostic markers, associations with drug response and mechanisms underlying MM pathophysiology.

In that aim, we used RNA sequencing data of 674 newly diagnosed patients from Multiple Myeloma Research Foundation CoMMpass study to build a 267 genes risk score. Validation

was performed using a cohort of 68 newly diagnosed MM patients from our center. The RNA-seq based risk score demonstrated a prognostic value in the two independent cohorts of newly diagnosed MM patients. High-risk patients were characterized by genes involved in several major pathways implicated in MM pathophysiology including cell proliferation, MYC pathways and epigenetic regulation. Additionally, RNA-seq based risk score was associated with MM cells mutations profiles and response to targeted treatment underlining a potential interest for implementation of precision medicine strategies in MM.

Methods

Gene expression profiling and statistical analyses

We used the publicly available gene expression profiling RNAseq data of newly diagnosed MM patients from the Multiple Myeloma Research Foundation's (MMRF) CoMMpass study (<https://research.themmr.org/>, release IA12). Concerning the validation cohort, bone marrow samples were collected after patients' written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and institutional research board approval from Montpellier University Hospital. Bone marrows were collected from 68 patients treated with high-dose Melphalan (HDM) and autologous stem cell transplantation (ASCT), and this cohort is termed Montpellier cohort. Bone marrow of patients presenting with previously untreated MM ($N=5$) at the university hospital of Montpellier was obtained after patients' written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and agreement of IRB and the Montpellier University Hospital Centre for Biological Resources (DC-2008-417). Patients' MMCs were purified using anti-CD138 MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and their gene expression profile (GEP) obtained using RNA-sequencing. The RNA sequencing (RNA-seq) library preparation was done with 150 ng of input RNA using the Illumina TrueSeq Stranded mRNA Library Prep Kit. Paired-end RNA-seq was performed with an Illumina

NextSeq sequencing instrument (Helixio, Clermont-Ferrand, France). RNA-seq read pairs were mapped to the reference human GRCh37 genome using the STAR aligner [23]. All statistical analyses were performed with the statistics software R (version 3.2.3; available from <https://www.r-project.org>) and R packages developed by BioConductor project (available from <https://www.bioconductor.org/>) [24]. The expression level of each gene was summarized and normalized using DESeq2 R/Bioconductor package [25]. Differential expression analysis was performed using DESeq2 pipeline[25]. P values were adjusted to control the global FDR across all comparisons with the default option of the DESeq2 package. Genes were considered differentially expressed if they had an adjusted P value of 0.05 and a fold change of 1.5.

Multiple myeloma cell lines.

XGs human myeloma cell lines (HMCLs) were obtained as previously described[26,27]. AMO-1, LP1, L363, OPM2, MOLP2, MOLP8, Lopra and SKMM2 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and RPMI8226 from ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA). JIN3 was kindly provided by Dr. Van Riet (Bruxelles, Belgium) and MM1S by Dr. S. Rosen (Chicago, USA). HMCLs were authenticated according to their short tandem repeat profiling and their gene expression profiling using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays deposited in the ArrayExpress public database under accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088. WES was performed on 30 HMCLs. The WES library preparation was done with 1000 ng of input DNA. Sequences of exome were enriched using SureSelect^{xt} kit and SureSelect^{xt} All Exons v5 library (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Paired-end exome sequencing was performed on the enriched exome sequences using the illumina NextSeq500 sequencing instrument (Helixio, Clermont-Ferrand, France), generating 75 bp paired-end reads with 100X average coverage per sample.

HMCLs response to drug treatment

HMCLs were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with fetal bovine serum (FBS, Eurobio, Les Ulis, France) (10%) and Interleukin 6 (IL6, Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA) for XG cell lines. We evaluated the sensitivity of the cell lines to thirty drugs, including BET inhibitor (RVX-208), ATR inhibitor (AZD-6738), G9a inhibitor (BIX-01294) and DNAPK inhibitor (NU7441). For a given drug, HMCLs were treated with different concentrations. The IC₅₀ was determined at day 4 using the CellTiter-Glo assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA), as previously described [27].

Results

RNA-seq based gene risk score in multiple myeloma.

We performed RNA sequencing of purified MMC from 68 newly diagnosed MM patients. We also used the gene expression profiling (GEP) data of 674 newly diagnosed MM patients from the Multiple Myeloma Research Foundation's (MMRF) CoMMpass study. Using Maxstat R function and Benjamini-Hochberg multiple testing correction, 267 genes were found to have a prognostic value for overall survival (OS) (adjusted p value < 0.05) in the two independent cohorts of patients with previously-untreated MM. These 267 prognostic genes comprise 142 genes associated with a poor outcome in MM and 97 genes associate with high expression related to a good prognostic value. These 267 genes were used to build a RNA-seq-based risk score. The RNA-seq based risk score is defined by the sum of the beta coefficient derived from the Cox model for each prognostic gene weighted by -1 or +1 according to the MMC gene expression above or below the Maxstat defined cutpoint. Patients of the CoMMpass cohort were ranked according to increased RNA-seq based risk score and Maxstat algorithm was used the cutoff associated with the maximum difference in OS. The RNA-seq based risk score split

patients into a high-risk group (22.8%) and a low-risk group (77.2%) in the CoMMpass and Montpellier cohorts ($p = 1.7E-46$ and $p = 2.8E-11$ respectively) (**Figure 1**). The prognostic value of the RNA-seq based risk score was validated in the Montpellier cohort (**Figure 1A**).

Significant higher score values were identified in patients at relapse compared to newly diagnosed patients ($p\text{-value} < 1.10^{-4}$) (**Figure 1B**).

Altogether, these data highlight that the RNA-seq based risk score allows to identify newly diagnosed MM patients associated with high-risk.

High-risk MM patients identified with the RNA-seq based risk score are characterized by enrichment of genes related to cell proliferation, growth factor signaling, MYC pathway and epigenetic deregulation.

GSEA analyses revealed that the genes associated with a poor prognostic value were significantly enriched in genes related to interferon response, cell proliferation, hypoxia, IL-6 signaling pathway, stem cell genes, MYC and epigenetic deregulation (**Figure 2A**). Among the epigenetic related genes enriched in high risk MM patients, EZH2 targets, HDAC targets and DNA methylation target genes were identified. We next investigated the RNA-seq based risk score value distribution according to Affymetrix GEP-based risk scores described in MM. The RNA-seq based risk score values were significantly higher in high-risk patients defined by RS score [8], UAMS HRS score [5] and IFM score [7]. Furthermore, high-risk RNA-seq based score patients demonstrated a significant increase in the percentage of proliferating MM cells (median = 0.7%; range: 0 – 7.3%) compared to the low group (median = 1.55%, range: 0 – 17.3%) (**Figure 2B**).

Association between RNA-seq based risk score and mutations in MM

We analyzed the relationship between the RNA-seq based risk score distribution, cytogenetic abnormalities and the mutational status using a large cohort of 30 human myeloma cell lines

[27]. No significant association were found between the RNA-seq based risk score and cytogenetic abnormalities including del1p, gain 1q, t(16;22), t(20;22), t(12;14), t(11;14), t(14;16), t(4;14), del17p, del13q[27]. Interestingly RNA-seq based risk score values were significantly higher in MM cell lines characterized by *CIC*, *LRP1B*, *PMS1*, *USP6* mutations compare to unmutated MM cell lines (**Figure 3**). *LRP1B* is a tumor suppressor gene described to be silenced in solid cancers [28,29]. *PMS1* is involved in mismatch repair [30]. *USP6* is a ubiquitin-specific protease reported to play oncogenic activities [31,32].

Association between RNA-seq based risk score and response to targeted inhibitors

We analyzed the relationship between RNA-seq based risk score and HMCL response to targeted inhibitors. Spearman correlation was done between RNA-seq based risk score and IC50 for 30 different drugs. Among them, the MM cell response to 4 drugs were found to be significantly associated with RNA-seq based risk-score (**Figure 4**). IC50 of ATR, BET and DNAPK inhibitors were positively correlated with the risk-score underlining a significant resistance of MMCs with high-risk score to these drugs. Interestingly, a negative correlation with the response to G9a histone methyltransferase inhibitor was identified highlighting that high-risk MM patients defined by the RNA-risk score may benefit from G9a inhibitor (**Figure 4**). ATR and DNAPK are respectively involved in double strand breaks (DSB) repair by homologous recombination and non-homologous end joining. Inhibition of these genes are of interest as recent studies have shown that MM cells are characterized by high replication stress which result in DSB [33,34]. BET inhibitors target BET bromodomain proteins, identified as key regulators of oncogenic transcription factors. They are effector domains of transcriptional regulators, chromatin modulators and chromatin-modifying enzymes [35]. BETi have exhibited significant antitumor activity in MM linked with *MYC* modulation [36]. HMTi BIX-01294 have

been reported to inhibit NSD family proteins [37] which include MMSET frequently overexpressed in MM and associated with poor prognosis [38].

Discussion

Here we defined a RNA-sequencing based transcriptomic signature with prognostic value in two independent cohorts of patients with MM. Despite a significant accumulation of knowledge related to MM drug resistance, there is a need to routinely integrate these data into clinical decision making. However, several profiling methods have been developed to provide information related to molecular classification and risk prediction. Different groups have combined GEP analysis with cytogenetics to delineate 10 different molecular subgroups with distinct prognostic value and clinical features [4,39,40]. These prognostic classifications have been associated with clinical data and incorporated into a consensus statement by the International Myeloma Working Group (IMWG) [41]. Several groups including IFM [7], UAMS [5], our group [8] and HOVON [6] developed microarray-based GEP prognostic signatures. Nowadays, large scale clinical studies have pioneered the use of NGS including WES and targeted NGS panels in MM [42–48]. However, there is a need currently to integrate drug-specific resistance biomarkers in association to the growing palette of anti-MM treatments available.

Here, we build a 267 genes risk score using RNA-seq data. The RNA-seq based risk score demonstrated a prognostic value in the two independent cohorts of newly diagnosed MM patients. MM patients with high-risk UAMS or RS-microarray defined GEP signatures demonstrated significant higher value of RNA-seq based risk score (**Figure 2B**). High-risk patients were characterized by genes involved in several major pathways implicated in MM pathophysiology including interferon response, cell proliferation, hypoxia, IL-6 signaling pathway, stem cell genes, MYC and epigenetic deregulation (**Figure 2A**). c-MYC is a key

regulator in MM with deregulations related to translocations, gains and amplification, mutations in RAS genes and MYC transcription or translation activation [49]. Hypoxia is a specific feature of MM with a significant increased hypoxia marker hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the bone marrow of MM tumour-bearing mice [50]. This suggests that inhibition of HIF-1-mediated transcription represents an interesting target in MM. Recently, we reported that chetomin, an inhibitor of HIF-1/p300 interaction, exhibits antitumor activity in human myeloma cell lines and primary MM cells from patients. This approach could represent therapeutic interest for high risk patients identified with the RNA-seq risk score. IL-6 is one of the major MM growth factor [51]. Blocking IL-6 signaling was thus developed into a therapeutic approach for MM. Even if the first clinical trials did not demonstrated a clear benefit, new hopes on IL-6 antagonism are still high and trials ongoing [52]. Interestingly, high-risk RNA-seq score defined MM patients are characterized by a significant enrichment in genes related to stem cell genes. Genes unrelated to cell cycle and overexpressed in pluripotent, hematopoietic and mesenchymal stem cells have been reported to be significantly overexpressed in MM in association with a poor outcome [53]. Furthermore, RNA-seq defined high-risk patients presented a significant enrichment in Polycomb repressive complexes PRC1 and PRC2 target genes, DNMT target genes and HDAC target genes (**Figure 2A**). Interestingly, a significant overlap between PRC2 and DNA methylation target genes has been reported in MM suggesting an overlap between these repressive chromatin marks to inactivate tumor suppressor genes [21]. Transcriptional program mediated by DNA methylation and HDAC are also associated with a poor outcome and key biological deregulations [19,20].

Furthermore combination of epidrugs have demonstrated anti-MM cell cytotoxicity in preclinical studies [21,54]. These data suggest that high-risk RNA-seq score MM patients could benefit from epidrugs in combination with conventional treatment.

Additionally, RNA-seq based risk score was associated with MM cells mutations profiles and response to targeted treatment underlining a potential interest for implementation of precision medicine strategies in MM (**Figure 3 and 4**). Interestingly RNA-seq based risk score values were significantly higher in MM cell lines characterized by *CIC*, *LRP1B*, *PMS1*, *USP6* mutations compare to unmutated MM cell lines. *CIC* acts as a transcriptional repressor of genes regulated by the MAPK signaling pathways. In oligodendroglioma loss of *CIC* is involved in tumorigenesis [55]. In this cancer, ablation of *CIC* function leads to increased histone acetylation levels and transcription at these genes, ultimately fueling mitogen-independent tumor growth [55]. *LRP1B* is a tumor suppressor gene silenced in solid cancers [28,29]. *LRP1B* is also frequently mutated in transformed follicular lymphoma [56]. The inactivation of *LRP1B* affects the microenvironment in association with a significant increase of cancer cell proliferation and invasive capacities [28]. *PMS1* is involved in mismatch repair[30]. DNA repair deficiency was reported to promote genomic instability in cancer [57]. *USP6* is a ubiquitin-specific protease reported to play oncogenic activities [31,32]. Of particular interest, using our large cohort of MM cell lines, we identified that HMCLs with high RNA-seq score values present resistance to ATR, BET and DNAPK inhibitors. BET inhibitors are currently used in clinical trial in MM [36] and the RNA-seq score may be of interest for patients stratification in clinical trials.

Moreover, we identified that high-risk MM patients defined by the RNA-risk score may benefit from G9a inhibitor. G9a, also known as EHMT2, mediates mono-, di- and trimethylation of histone 3 lysine 9 (H3K9) via its SET domain. Moreover, G9a also acts as a scaffolding protein for other chromatin-associated molecules like the repressive heterochromatin protein 1, which in turn recruits DNA methyltransferase 1 (DNMT1) to the DNA, thus enforcing transcriptional silencing [58]. In addition, G9a was recently shown to facilitate MYC-mediated transcriptional repression through direct interaction [59]. G9a targeting was shown to hamper MYC binding

to the chromatin, leading to a derepression of otherwise MYC-silenced genes and to a decrease in MYC dependent tumor growth *in vivo*. According to the pathways significantly enriched in MM patients with high-risk RNA-seq score value, the different roles of G9a in epigenetic transcriptional repression and MYC regulation may explain the efficacy of G9a inhibitor to target MM cells in this subgroup of patients. Validation of these results using primary MM cells of patients will be of interest. The RNA-seq based risk score underlines a potential interest for implementation of precision medicine strategies in high-risk MM patients.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from INCa (Institut National du Cancer, PLBIO15-256), ITMO Cancer (MM&TT), ANR (TIE-Skip; 2017-CE15-0024-01), SIRIC Montpellier Cancer (INCa_Inserm_DGOS_12553) and Institut Universitaire de France.

Authorship

Contribution: VV designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the paper; AB and AK performed the research and analyzed the data; NR LV GC analyzed the data; OE analyzed the data and wrote the paper; JM designed and supervised the research and wrote the paper.

Correspondence: Dr J Moreaux, Laboratory for Monitoring Innovative Therapies, Department of Biological Hematology, Hôpital Saint-Eloi – CHRU de Montpellier, IGH – Institute of Human Genetics, UMR 9002, CNRS and University of Montpellier, 80, av. Augustin Fliche, Montpellier 34295, France. E-mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

Conflict-of-interest disclosure:

The authors have no conflict of interest to declare.

Figures legends

Figure 1. Prognostic value of the RNA-seq based risk score. (A) Maxstat defined cut-point and prognostic value of RNA-seq based risk score in CoMMpass and Montpellier cohorts (OS, Kaplan-Meier curves). (B) RNA-seq based risk score value at diagnosis (diag) and relapse in Montpellier cohort. Diag and relapse groups were compared using t-test: ****: p-value < 1.10⁻⁴.

Figure 2. Characterization of RNA-seq based risk score. (A) Gene set enrichment analysis of RNA-seq based risk score genes associated with poor prognosis. (B) Comparison of RNA-seq based risk score with Affymetrix GEP-based risk scores (RS, HRS, IFM) and proliferation.

Figure 3. Association between RNA-seq based risk score and mutations in MM. Comparison of RNA-seq based risk score between mutated and non mutated HMCLs for *CIC*, *LRP1B*, *PMS1* and *USP6* genes. Comparisons were done using t-test. * : p-value < 0.05, ** : p-value < 0,01.

Figure 4. Association between RNA-seq based risk score and response to targeted inhibitors. Heatmaps of RNA-seq based risk score values and IC50 of four inhibitors (BETi, G9ai, ATRi and DNAPKi). Spearman correlation was done between RNA-seq based risk score and IC50.

References

1. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116:e56-65.
2. de Mel S, Lim SH, Tung ML, Chng W-J. Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *BioMed Res Int*. 2014;2014:232546.
3. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23:6333–8.
4. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:2020–8.
5. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109:2276–84.
6. Kuiper R, Broyl A, de Knecht Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, et al. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia*. 2012;26:2406–13.
7. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jézéquel P, 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 Myélome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26:4798–805.
8. Rème T, Hose D, Theillet C, Klein B. Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29:1149–57.
9. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, Johnson DC, Brito JL, Zeisig A, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010;16:1856–64.
10. Hose D, Rème T, Hielscher T, Moreaux J, Messner T, Seckinger A, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica*. 2011;96:87–95.
11. Chng WJ, Braggio E, Mulligan G, Bryant B, Remstein E, Valdez R, et al. The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood*. 2008;111:1603–9.
12. Jourdan M, Rème T, Goldschmidt H, Fiol G, Pantesco V, De Vos J, et al. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *Br J Haematol*. 2009;145:45–58.
13. Shaughnessy JD, Qu P, Usmani S, Heuck CJ, Zhang Q, Zhou Y, et al. Pharmacogenomics

of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood*. 2011;118:3512–24.

14. Stessman HAF, Baughn LB, Sarver A, Xia T, Deshpande R, Mansoor A, et al. Profiling bortezomib resistance identifies secondary therapies in a mouse myeloma model. *Mol Cancer Ther*. 2013;12:1140–50.

15. Mitra AK, Mukherjee UK, Harding T, Jang JS, Stessman H, Li Y, et al. Single-cell analysis of targeted transcriptome predicts drug sensitivity of single cells within human myeloma tumors. *Leukemia*. 2016;30:1094–102.

16. Mitra AK, Harding T, Mukherjee UK, Jang JS, Li Y, HongZheng R, et al. A gene expression signature distinguishes innate response and resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7:e581.

17. Gourzones C, Bellanger C, Lamure S, Gadacha OK, De Paco EG, Vincent L, et al. Antioxidant Defenses Confer Resistance to High Dose Melphalan in Multiple Myeloma Cells. *Cancers*. 2019;11.

18. Bhutani M, Zhang Q, Friend R, Voorhees PM, Druhan LJ, Barlogie B, 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:e443–51.

19. Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer*. 2013;109:676–85.

20. Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:2685–92.

21. Herviou L, Kassambara A, Boireau S, Robert N, Requirand G, Müller-Tidow C, et al. PRC2 targeting is a therapeutic strategy for EZ score defined high-risk multiple myeloma patients and overcome resistance to IMiDs. *Clin Epigenetics*. 2018;10:121.

22. de Boussac H, Bruyer A, Jourdan M, Maes A, Robert N, Gourzones C, et al. Kinome expression profiling to target new therapeutic avenues in multiple myeloma. *Haematologica*. 2019;

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

24. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5:R80.

25. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550.

26. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, et al. A high-risk

signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011;96:574–82.

27. Vikova V, Jourdan M, Robert N, Requirand G, Boireau S, Bruyer A, et al. Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance. *Theranostics*. 2019;9:540–53.

28. Prazeres H, Torres J, Rodrigues F, Pinto M, Pastoriza MC, Gomes D, et al. Chromosomal, epigenetic and microRNA-mediated inactivation of LRP1B, a modulator of the extracellular environment of thyroid cancer cells. *Oncogene*. 2011;30:1302–17.

29. Ni S, Hu J, Duan Y, Shi S, Li R, Wu H, et al. Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Sci*. 2013;104:817–25.

30. Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2014;23:246–57.

31. Madan B, Walker MP, Young R, Quick L, Orgel KA, Ryan M, et al. USP6 oncogene promotes Wnt signaling by deubiquitylating Frizzleds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E2945-2954.

32. Ye Y, Pringle LM, Lau AW, Riquelme DN, Wang H, Jiang T, et al. TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB. *Oncogene*. 2010;29:3619–29.

33. Cottini F, Hideshima T, Suzuki R, Tai Y-T, Bianchini G, Richardson PG, et al. Synthetic Lethal Approaches Exploiting DNA Damage in Aggressive Myeloma. *Cancer Discov*. 2015;5:972–87.

34. Herrero AB, Gutiérrez NC. Targeting Ongoing DNA Damage in Multiple Myeloma: Effects of DNA Damage Response Inhibitors on Plasma Cell Survival. *Front Oncol*. 2017;7:98.

35. Picaud S, Wells C, Felletar I, Brotherton D, Martin S, Savitsky P, et al. RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:19754–9.

36. Alqahtani A, Choucair K, Ashraf M, Hammouda DM, Alloghbi A, Khan T, et al. Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: a review of preclinical and clinical advances in cancer therapy. *Future Sci OA*. 2019;5:FSO372.

37. Morrison MJ, Boriack-Sjodin PA, Swinger KK, Wigle TJ, Sadalge D, Kuntz KW, et al. Identification of a peptide inhibitor for the histone methyltransferase WHSC1. *PloS One*. 2018;13:e0197082.

38. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia*. 2009;23:1941–56.

39. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D

- dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:296–303.
40. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knecht Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*. 2010;116:2543–53.
41. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28:269–77.
42. Kortüm KM, Langer C, Monge J, Bruins L, Egan JB, Zhu YX, et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M(3) P) in -17p high risk disease. *Br J Haematol*. 2015;168:507–10.
43. Jiménez C, Jara-Acevedo M, Corchete LA, Castillo D, Ordóñez GR, Sarasquete ME, et al. A Next-Generation Sequencing Strategy for Evaluating the Most Common Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *J Mol Diagn JMD*. 2017;19:99–106.
44. Ryland GL, Jones K, Chin M, Markham J, Aydogan E, Kankanige Y, et al. Novel genomic findings in multiple myeloma identified through routine diagnostic sequencing. *J Clin Pathol*. 2018;71:895–9.
45. Kortüm KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C-X, Zhu Y-X, Bruins L, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood*. 2016;128:1226–33.
46. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:100–13.
47. Corre J, Cleynen A, Robiou du Pont S, Buisson L, Bolli N, Attal M, et al. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia*. 2018;32:2636–47.
48. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:268.
49. Jovanović KK, Roche-Lestienne C, Ghobrial IM, Facon T, Quesnel B, Manier S. Targeting MYC in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32:1295–306.
50. Hu J, Van Valckenborgh E, Menu E, De Bruyne E, Vanderkerken K. Understanding the hypoxic niche of multiple myeloma: therapeutic implications and contributions of mouse models. *Dis Model Mech*. 2012;5:763–71.
51. Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Réme T, Shaughnessy JD, Barlogie B, et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood*. 2009;113:4614–26.
52. Matthes T, Manfroi B, Huard B. Revisiting IL-6 antagonism in multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;105:1–4.
53. Kassambara A, Hose D, Moreaux J, Réme T, Torrent J, Rossi JF, et al. Identification of pluripotent and adult stem cell genes unrelated to cell cycle and associated with poor

prognosis in multiple myeloma. *PloS One*. 2012;7:e42161.

54. Bruyer A, Maes K, Herviou L, Kassambara A, Seckinger A, Cartron G, et al. DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment induces reprogramming of myeloma cells in the direction of normal plasma cells. *Br J Cancer*. 2018;118:1062–73.

55. Weissmann S, Cloos PA, Sidoli S, Jensen ON, Pollard S, Helin K. The Tumor Suppressor CIC Directly Regulates MAPK Pathway Genes via Histone Deacetylation. *Cancer Res*. 2018;78:4114–25.

56. González-Rincón J, Méndez M, Gómez S, García JF, Martín P, Bellas C, et al. Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PloS One*. 2019;14:e0212813.

57. Javid M, Sasanakietkul T, Nicolson NG, Gibson CE, Callender GG, Korah R, et al. DNA Mismatch Repair Deficiency Promotes Genomic Instability in a Subset of Papillary Thyroid Cancers. *World J Surg*. 2018;42:358–66.

58. Casciello F, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Front Immunol*. 2015;6:487.

59. Tu WB, Shiah Y-J, Lourenco C, Mullen PJ, Dingar D, Redel C, et al. MYC Interacts with the G9a Histone Methyltransferase to Drive Transcriptional Repression and Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2018;34:579-595.e8.

Figure 1

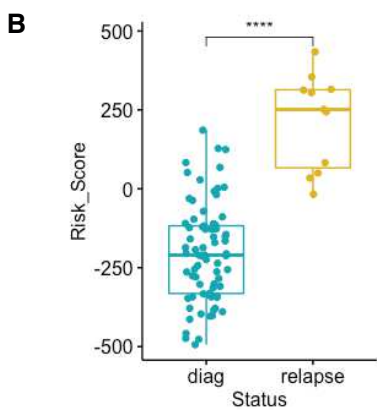
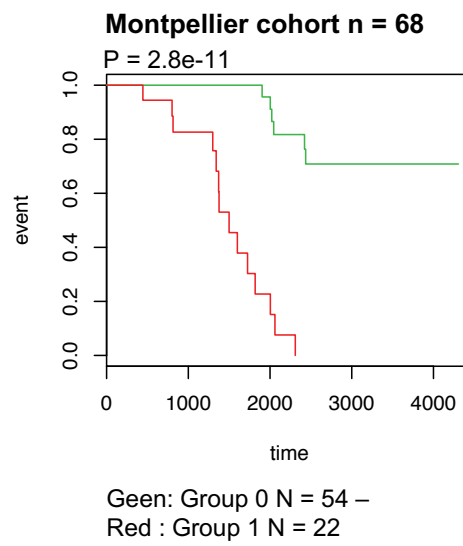
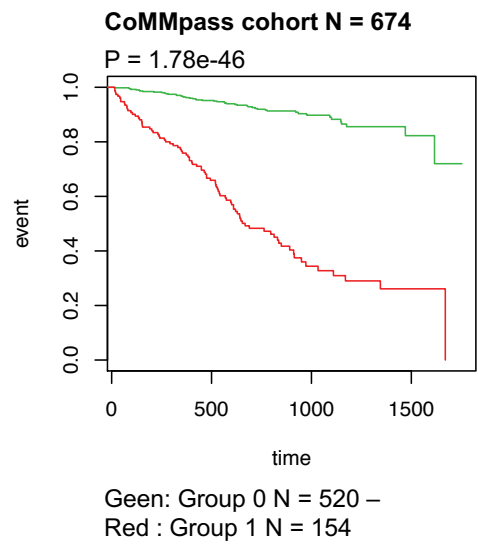
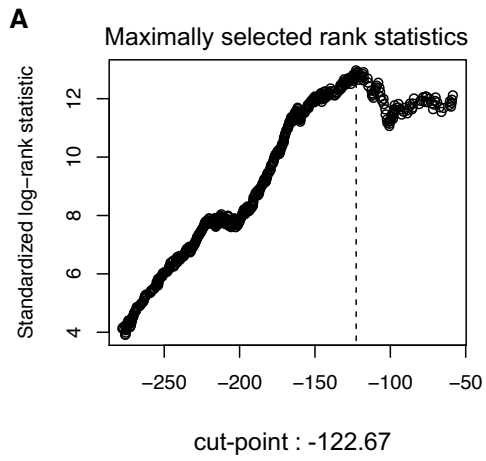
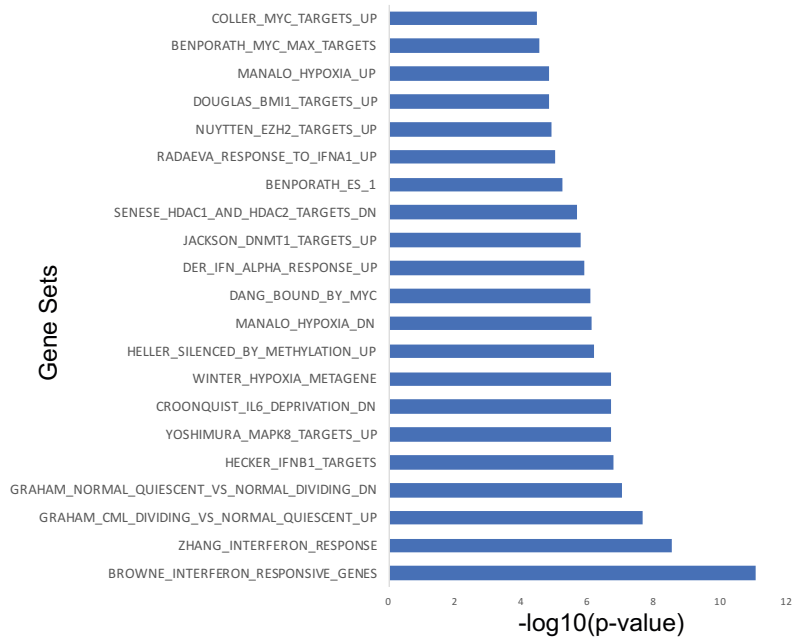


Figure 2

A

Genes associated with poor prognosis value



B

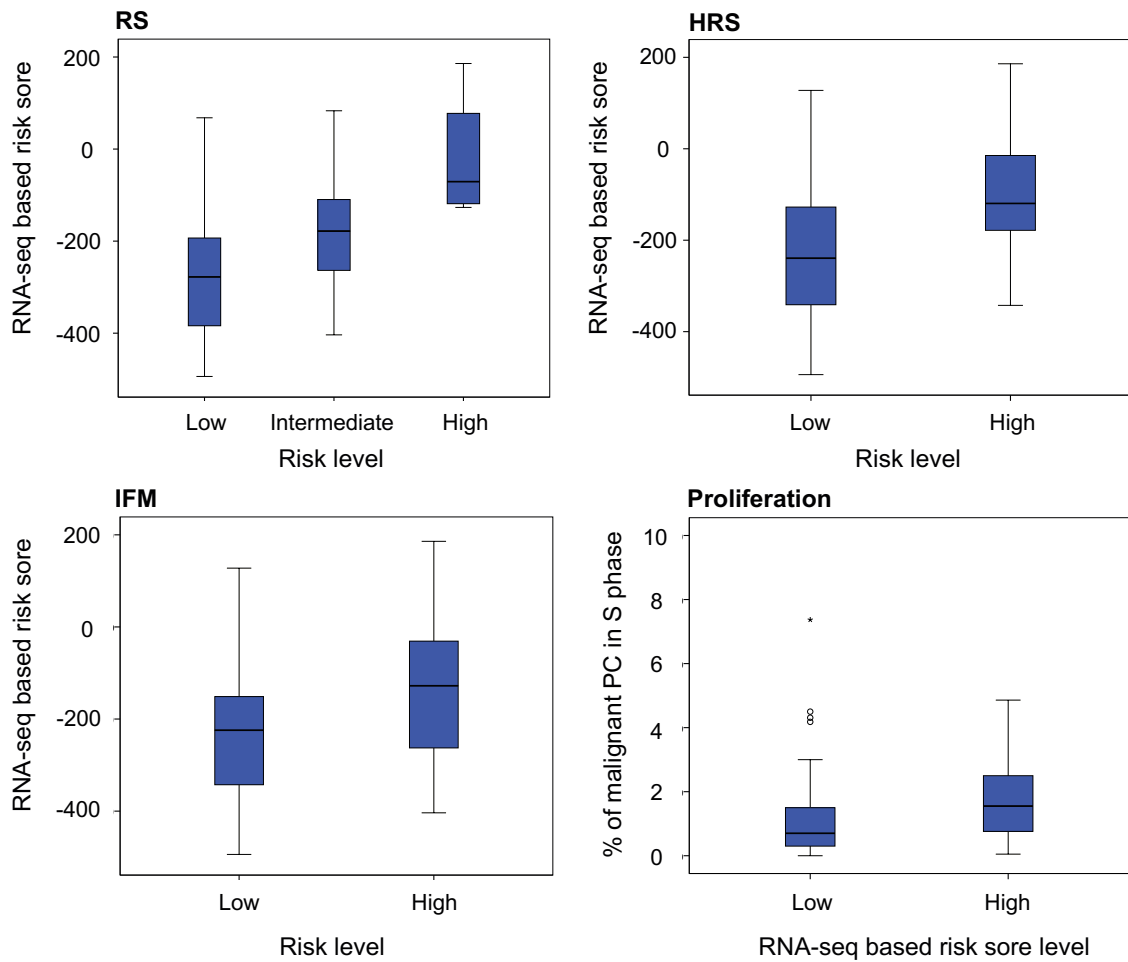


Figure 3

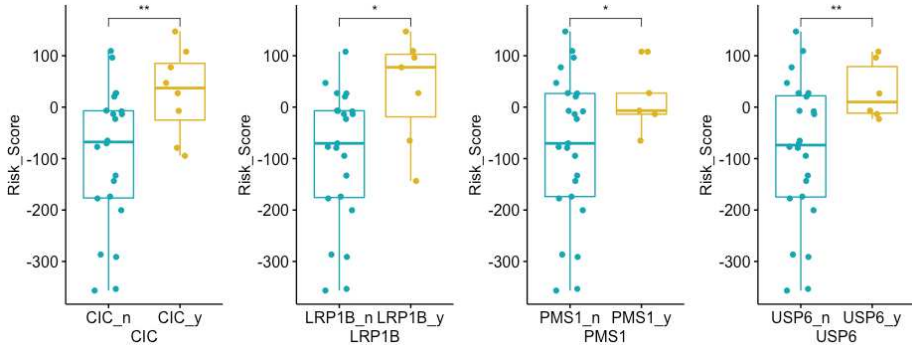
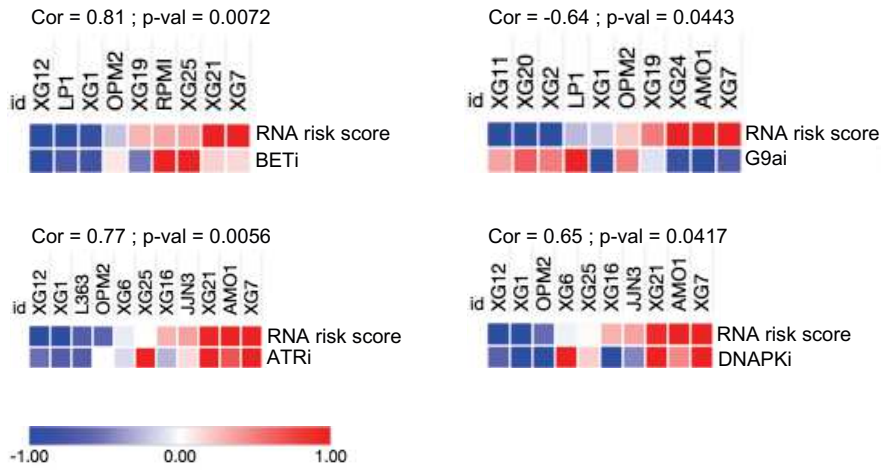


Figure 4



L'étude de l'hétérogénéité épigénétique du myélome multiple révèle l'impact de la méthylation de l'ADN sur la survie de patients, la réponse aux traitements et la physiopathologie du MM

Projet en collaboration avec le Dr Olivier Elemento – Englander Institute for Precision Medicine (NY)

Afin de caractériser le paysage épigénétique du myélome multiple, nous avons réalisé des analyses ERRBS (Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing) sur les cellules tumorales purifiées de 24 échantillons de patients au diagnostic, 20 patients à la rechute et des plasmocytes normaux issus de trois donneurs. L'analyse en composante principale de la méthylation des promoteurs a clairement identifié une différence de méthylation entre les patients t(4 ;14), caractérisés par une surexpression de *MMSET* (MS), et les autres (no_MS). Entre ces deux groupes de patients, 5282 gènes sont différentiellement méthylés dont 82% sont hyperméthylés. Ces résultats sont confirmés par une analyse de la méthylation globale qui révèle une méthylation différentielle significative entre MS et no_MS au niveau des promoteurs, des îlots CpGs (CGIs), des régions flanquantes des CGIs (CGIshores) et autres régions (**Figure 1A**). En considérant uniquement la méthylation au niveau des promoteurs, l'analyse GSEA a montré que les gènes différentiellement méthylés entre ces deux groupes sont enrichis significativement en cibles du complexe Polycomb PRC2 (SUZ12, EED, PRC2) et sont associés à la marque H3K27me3 (**Figure 1B**) suggérant une interaction entre deux marques répressives pour éteindre un programme transcriptionnel au sein des cellules tumorales de MM.

La comparaison des patients au diagnostic et à la rechute montre un niveau de méthylation significativement plus élevé chez les patients à la rechute au niveau des promoteurs et des CGIs (**Figure 1C**). Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui décrit qu'une hypométhylation globale de l'ADN a lieu entre les stades MGUS et MM avec une hyperméthylation au cours de la progression de la maladie [133,134].

Afin d'évaluer la valeur pronostique de la méthylation, nous avons étudié l'association entre la méthylation des promoteurs et l'EFS (**Figure 2**). Nous avons trouvé 2270 CpG, distribués sur 1393 gènes ayant une valeur pronostique après correction Benjamini-Hochberg (BH). Ils comprennent 1813 CpG (1052 gènes) présentant une forte méthylation et associés à un mauvais pronostic. 390 de ces gènes sont retrouvés comme sur-exprimés dans la lignée cellulaire de MM XG7 après traitement à la Décatibine (DNMTi), qui a pour effet la déméthylation de l'ADN (**Figure 2A**). Par ailleurs, l'expression de 365 gènes est modulée suite à l'inhibition d'EZH2 dans les lignées XG7 et XG25 faisant le lien entre la voie Polycomb et la méthylation de l'ADN

(**Figure 2A**). Cette voie est en effet retrouvée comme enrichie dans l'analyse GSEA des gènes présentant une valeur pronostique (**Figure 2A**).

Afin de valider la valeur pronostique de ces signatures dans de plus larges cohortes de patients, nous avons utilisé des données transcriptomiques de RNA-seq de la cohorte CoMMpass (n = 674) et de notre centre (n = 68). Pour cela, nous avons recherché parmi les gènes dont une forte méthylation des promoteurs est associée à un mauvais pronostic, les gènes correspondant dont une faible expression est reliée au pronostic péjoratif dans la cohorte CoMMpass. Pour les gènes dont une faible méthylation des promoteurs est associée à un mauvais pronostic, nous avons recherché les gènes correspondant dont une forte expression est reliée au pronostic péjoratif dans la cohorte CoMMpass (**Figure 2B**). Cette méthode nous a permis de construire une signature de 210 gènes présentant une valeur pronostique dans deux cohortes indépendantes de patients. Elle permet d'identifier des dérégulations transcriptomiques liées à la méthylation de l'ADN qui joueraient un rôle important dans la physiopathologie de la maladie (**Figure 2C**).

L'hétérogénéité intraclonale basée sur l'analyse de la méthylation de l'ADN (HM) est décrite par le concept d'épipolymorphisme qui correspond à l'analyse des CpG à un locus donné contenant au moins 4 CpG (épiallèle). L'épipolymorphisme est défini comme la probabilité que deux épiallèles à un locus donné et tirés au hasard d'une population différent l'un de l'autre. Une population cellulaire est définie par un mélange de motifs. Plus les motifs sont complexes, plus l'épipolymorphisme est élevé (**Figure 3 sup**) [182,183]. Cette hétérogénéité épigénétique est associée à un risque de rechute plus élevé dans le DLBCL. Notre hypothèse est que l'hétérogénéité épigénétique intra-tumorale présentant une large variété d'épiallèles (HM élevé) pourrait être associée à un risque de progression plus élevé dans le MM. Pour tester cette hypothèse nous avons analysé la HM des cellules tumorales de 24 patients au diagnostic dont 14 ont rechutés. Nos résultats démontrent que la HM est significativement plus élevée chez les patients ayant rechutés (**Figure 3A**). Ces résultats suggèrent que l'hétérogénéité épigénétique peut être prédictive de la rechute des patients. (**Figure 3B**). Dans l'ensemble ces résultats montrent que le MM présente une hétérogénéité épigénétique intra-tumorale prédictive de la rechute des patients et associée à l'agressivité de la maladie. Ils suggèrent également une composition sous-clonale avec une évolution en branchement (**Figure 3C**).

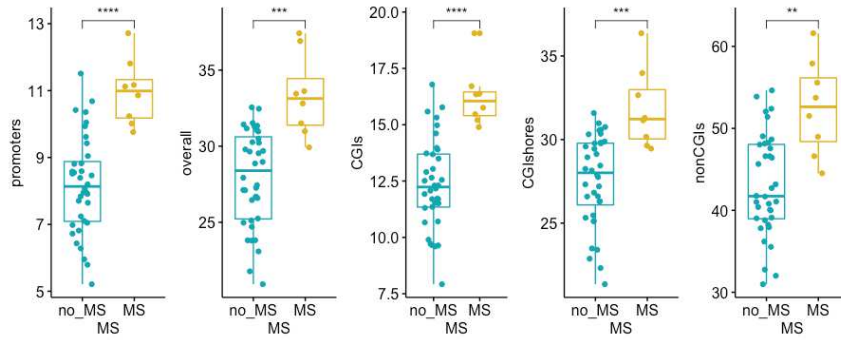
Enfin nous avons cherché à savoir si la méthylation de l'ADN pouvait avoir un effet sur la réponse des cellules de MM aux traitements. Pour cela nous disposons des données de puces 450k de 22 lignées de myélome multiple ainsi que de leur réponse à plusieurs molécules. Nous avons identifié une corrélation significative entre les signatures de méthylation de l'ADN et les IC50 de 6 molécules. Un plus haut niveau de méthylation est associé avec la résistance à la

Périmosine (1395 gènes), la Décitabine (648 gènes), la Dexaméthasone (258 gènes), le Panobinostat (1632 gènes) et l'inhibiteur d'IKK2 (3574 gènes). En revanche, un niveau élevé de méthylation de 784 gènes est associé à la sensibilité au Pomalidomide (**Figure 4A**). Nous avons recherché expérimentalement si un traitement par inhibiteur de la méthylation pouvait réverser la résistance à la Périmosine. Pour cela nous avons prétraité avec 0,1 μ M de Décitabine deux lignées, XG25 et XG6, respectivement caractérisées comme résistante et sensible à la Périmosine en lien avec une signature de méthylation différente (**Figure 4A**). Nous avons observé que la décitabine sensibilise significativement la lignée XG25 qui est résistante à la Périmosine alors que le prétraitement n'a pas d'effet sur la réponse d'XG6 (**Figure 4B**). Ce résultat est corrélé à la signature de méthylation identifiée. Ainsi ces résultats confirment expérimentalement le lien entre la résistance à la Périmosine et la méthylation de l'ADN mais devront être validés sur plusieurs lignées.

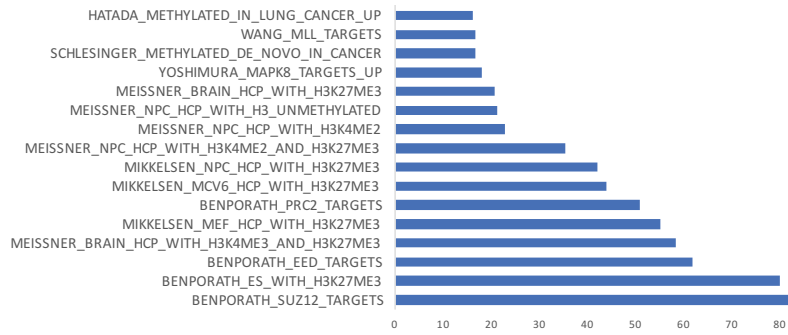
Les gènes des signatures précédemment décrites sont impliqués dans différentes voies de signalisations. En particulier, certaines voies sont en lien avec la matrice extracellulaire (ECM regulators, GPCR) ce qui peut suggérer une association entre ces résistances, la méthylation et le microenvironnement (**Figure 5**). D'autres voies identifiées sont enrichies en gènes du complexe Polycomb et ciblent les marques histones H3K4me3 et H3K27me3, suggérant un recoupement de plusieurs marques épigénétiques inhibitrices pour réprimer des programmes transcriptionnels impliqués dans la physiopathologie de la maladie. Des études supplémentaires devront être réalisées afin de mieux comprendre leur implications dans la physiopathologie de la maladie et les mécanismes de résistance aux traitements afin de définir des approches pour les réverser.

Figure 1

A



B



C

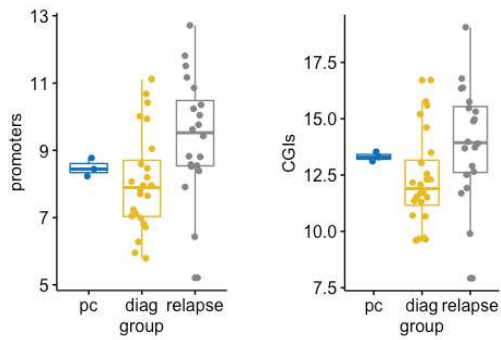
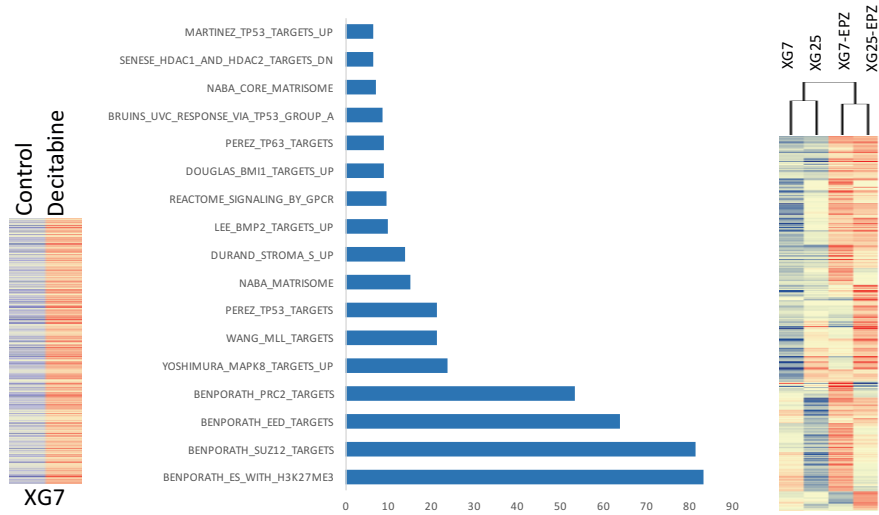


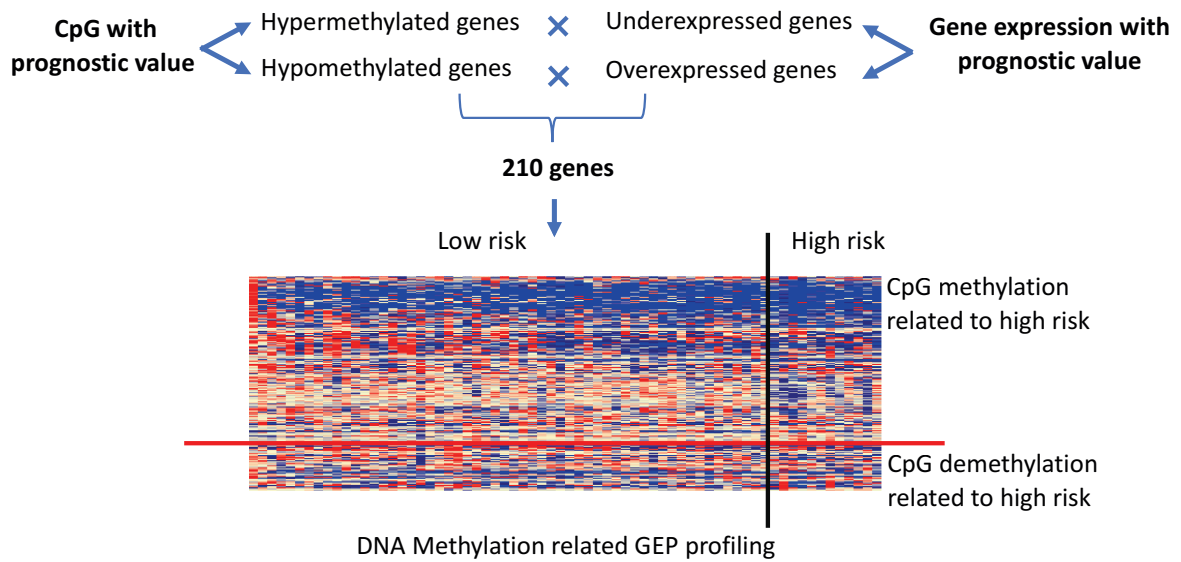
Figure 2

A

1813 CpG with high methylation associated with poor outcome (1052 genes)



B



C

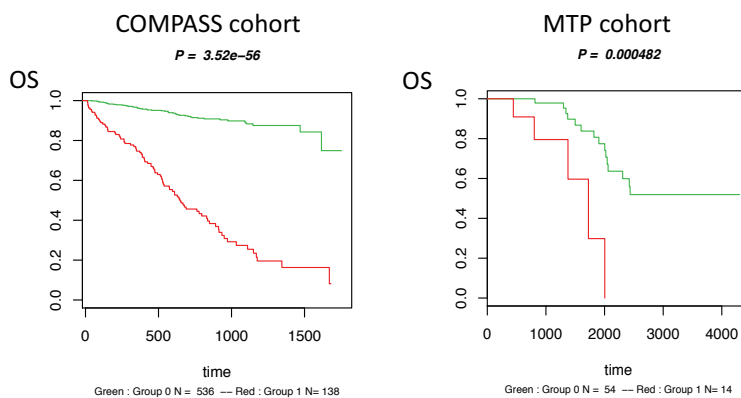
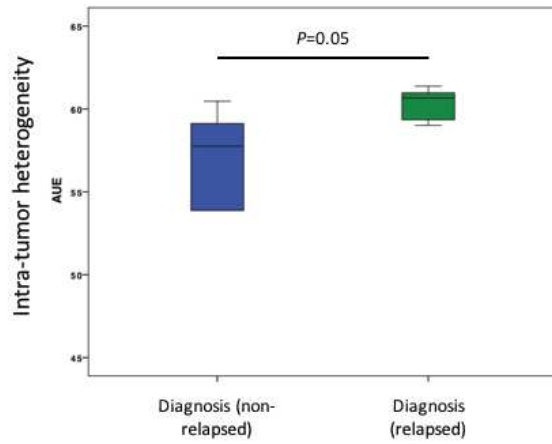
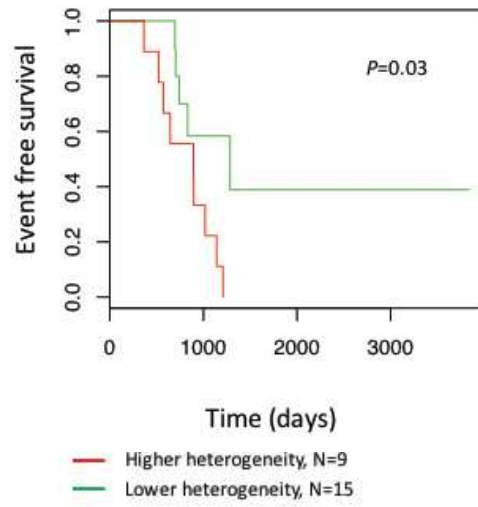


Figure 3

A



B



C

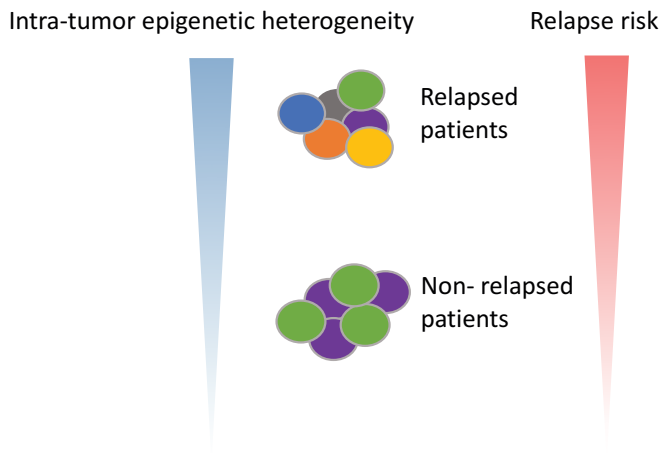
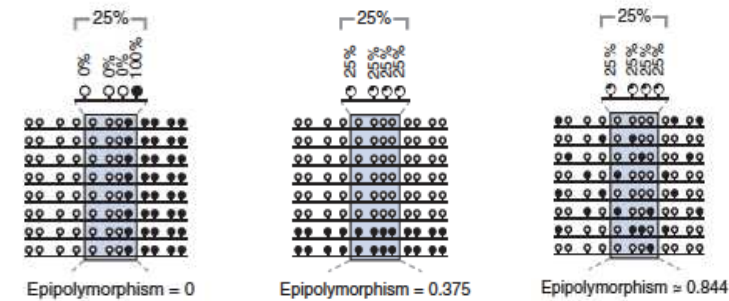


Figure 3 sup : Epipolymorphisme

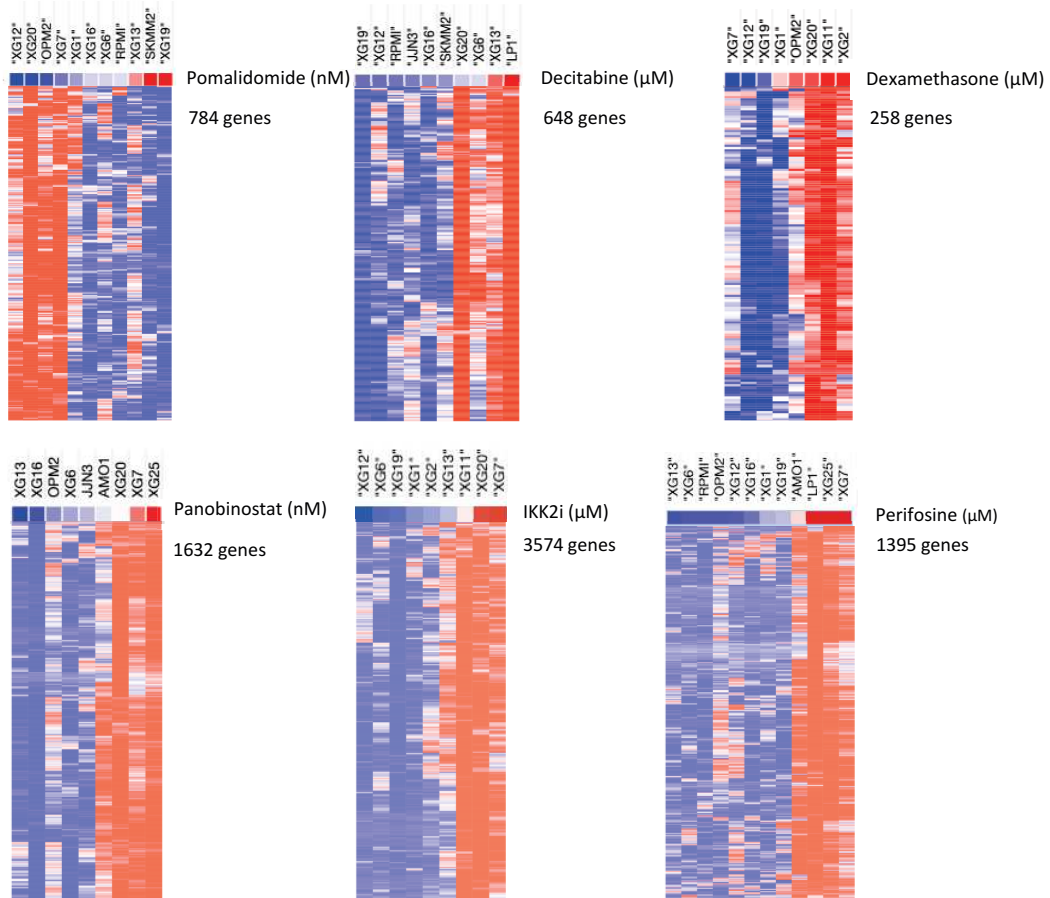


Même niveau de
méthylation mais
profils différents

Landan et al. Nature Genetics, 2012

Figure 4

A



B

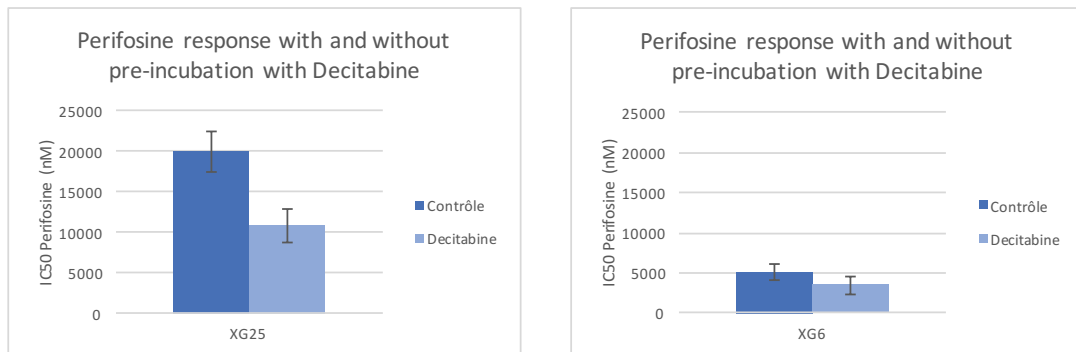
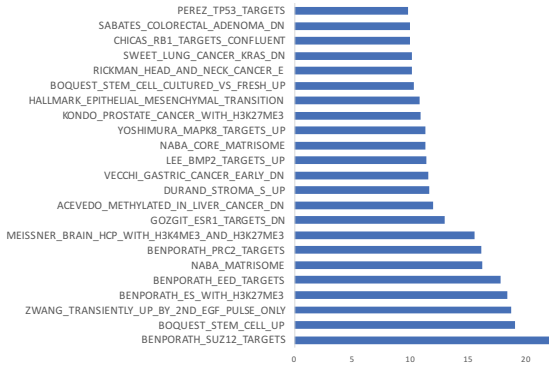
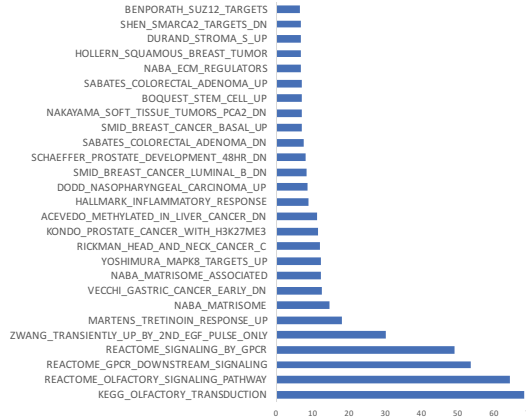


Figure 5

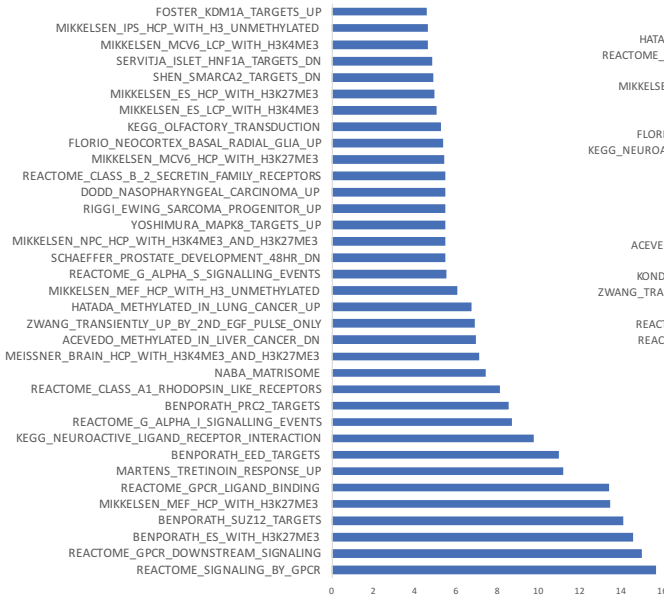
Pomalidomide



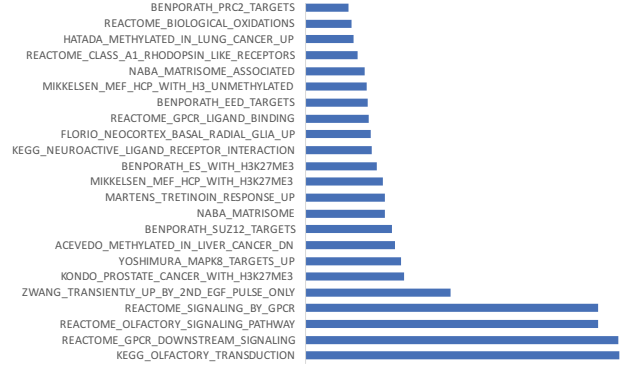
Panobinostat



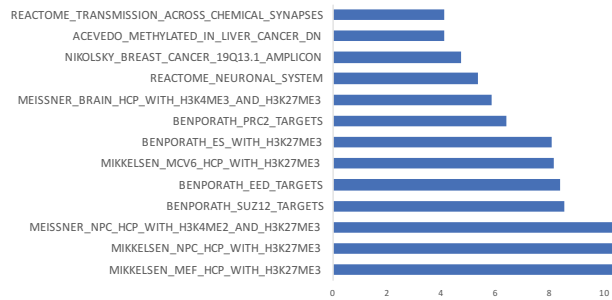
Decabine



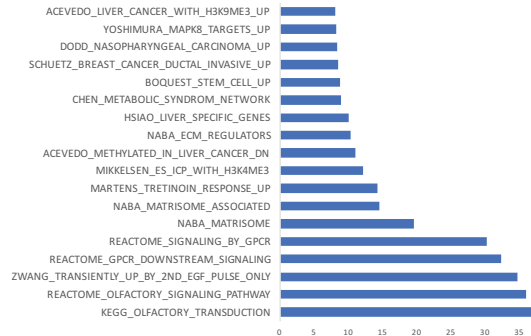
IKK2i



Dexamethasone



Perifosine



Discussion et perspectives

L'analyse des données omiques indépendamment les unes des autres a permis des avancées majeures sur la connaissance de la physiopathologie du MM, l'identification d'aberrations génomiques, transcriptionnelles, épigénomiques et l'étude des dérégulations des voies de signalisations. Les travaux que nous avons réalisés au cours de mon projet de thèse reflètent les possibilités qu'offrent les analyses de données haut débit non seulement pour une meilleure compréhension de la maladie et des mécanismes de résistance mais également pour la découverte de nouvelles approches thérapeutiques.

I. Analyses génomiques

L'étude des données exome de notre cohorte unique de lignées de MM nous a permis de dresser le premier paysage mutationnel des lignées de myélome multiple. En remettant les gènes mutés dans le contexte de leurs voies de signalisation, nous avons identifié une dérégulation de voies majeures impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de MM (JAK-STAT, PI(3)K-AKT, MAPK), les mécanismes de réparation de l'ADN et la régulation épigénétique (méthylation de l'ADN, modifications postraductionnelles des histones). Nous avons retrouvé des mutations de gènes connus comme étant impliqués dans la progression de la maladie comme *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *ATM* et *FAM46C*. Cette caractérisation de notre collection de lignées offre la possibilité d'utiliser certaines lignées spécifiquement pour l'étude de ces anomalies génétiques. Par exemple un groupe de 10 et 5 lignées ont respectivement une délétion bi-allélique de *TP53* et *FAM46C*. Elles représentent donc un modèle pour tester et identifier de nouvelles molécules efficaces sur ces sous-groupes de haut risque afin d'améliorer la survie des patients présentant ces caractéristiques péjoratives. De plus, les mutations de *KRAS* et *NRAS* ressortent comme mutuellement exclusives ce qui implique qu'une inactivation simultanée de ces deux gènes est létale pour la cellule. De ce fait, les lignées présentant ces mutations sont intéressantes pour étudier des traitements ciblés basés sur la létalité synthétique. La fonction biologique d'autres gènes fréquemment mutés comme *CNOT3*, *KMT2D*, *PTPRD*, *LRPIB*, *SETD2* et *FANCG* ne sont pas connus dans le MM et sont potentiellement importants pour la progression du MM. De façon générale ces gènes ont déjà été décrits comme impliqués dans des mécanismes tumoraux et certains sont de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques mais des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie du MM. Par exemple *CNOT3* fait partie du complexe CCR4-NOT qui est

une des déadénylases majeures chez les eucaryotes. Il joue un rôle important dans la régulation de la stabilité des ARNm [184]. Il a été montré que ce gène contribue au développement des cellules B par la régulation de la stabilité de l'ARNm de *TP53* et le réarrangement des *Igh* [185]. Il a également été identifié comme suppresseur de tumeur dans les T-ALL [185]. *KMT2D* est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans de nombreux cancers [186] et a été identifié comme suppresseur de tumeur [186]. Il est impliqué dans la différenciation B normale et sa dérégulation favorise la lymphomagenèse [187]. Il aurait un rôle différent dans les cellules normales et tumorales ce qui le rend intéressant en tant que cible thérapeutique [186,187]. Ainsi, les HMCLs seront un outil de choix pour les étudier et mettre en évidence de nouvelles mutations actionnables intéressantes pour de futures thérapies. Étant donné que nous disposons des données de RNA-sequencing de la cohorte de lignées, il sera notamment intéressant de comparer les profils d'expression génique entre les lignées mutées et non mutées pour ces gènes dont la fonction biologique reste à déterminer dans le MM.

Dans cette étude nous avons trouvé une association significative entre certains gènes mutés (*FAM46C*, *KMT2D*, *KRAS*, *PMS1*, *USP6* et *TP53*) et la réponse à plusieurs molécules thérapeutiques (Panobinostat, Dexaméthasone, TSA, SAHA, Lenalidomide). En particulier la mutation de *TP53* a été associée avec la sensibilité au Panobinostat et au Lenalidomide. Ces associations pourraient avoir un intérêt clinique chez les patients présentant des inactivations bi-alléliques de *TP53*. Par ailleurs nous avons trouvé que la mutation de différents membres de la voie de signalisation Cereblon est associée à une résistance significative au Pomalidomide. Il sera intéressant de revenir vers les cohortes de patients afin de comparer les profils de patients à la rechute appariés au diagnostic pour vérifier si la fréquence de ces mutations augmente en lien avec le développement des résistances. Ces profils mutationnels pourraient être utilisés en routine pour donner une information aux cliniciens relative à la résistance aux IMiDs.

Enfin notre étude a révélé la présence de 1 à 4 sous-clones dans les HMCLs, des valeurs qui sont similaires à celles retrouvées chez les patients. Ce point est important pour l'étude du rôle des différents traitements dans la sélection sous-clonale en lien avec la résistance. Ainsi les lignées offrent la possibilité de modéliser la composition clonale du MM et son évolution en réponse aux traitements. Dans cette perspective nous disposons au laboratoire de données WGS issues de lignées rendues résistantes à la dexaméthasone, à des inhibiteurs du protéasome, au Melphalan et aux HDACi ainsi que les lignées parentales. Afin de modéliser précisément l'effet des traitements ces données pourront être couplées avec une analyse RNAseq sur une approche cellule unique.

L'analyse des données de transcriptome chez des patients atteints de MM, nous a permis de construire un nouveau score basé sur le RNAseq qui présente une valeur pronostique dans deux cohortes indépendantes sur l'OS. Avec l'étude des gènes de bon et mauvais pronostic qui le composent il permet de progresser dans la caractérisation des patients à faible et haut risque en lien avec des signatures transcriptomiques marquantes de la physiopathologie du MM. Par ailleurs la majorité des scores sont actuellement basés sur des données issues des technologies de puces à ARN. Ces technologies étant vieillissantes, elles tendent à se faire remplacer par le RNAseq. Il est donc important que de nouveaux scores basés sur le NGS soient construits. A l'heure actuelle il n'y a pas encore de score pronostic de ce type publié.

L'association de notre score avec la résistance à certains inhibiteurs pourra permettre d'orienter les patients de mauvais pronostic vers des prises en charges plus efficaces notamment lors de la mise en place d'essais cliniques. Par exemple nous avons identifié que les patients définis comme de haut risque par le score pourraient bénéficier de l'inhibiteur de G9a. Cette protéine est impliquée dans la méthylation des marques H3K9 (mono-, di- et tri-méthylation) par l'intermédiaire de son domaine SET [188]. Recemment il a été montré qu'elle facilitait la répression transcriptionnelle médiée par MYC [189]. Elle aurait pour effet de retenir MYC au niveau de la chromatine ce qui aurait pour conséquence la dérégulation d'autres gènes régulés par MYC et une diminution de la croissance tumorale dépendante de cette même voie. Cette mécanistique pourrait expliquer l'efficacité de l'inhibiteur de G9a sur les cellules de MM et son intérêt pour ce sous-groupe de patients. Ces résultats devront être validés dans les cellules primaires de patients.

II. Analyses épigénomiques

Il est aujourd'hui incontestable que les défauts génomiques participent à l'initiation et à la progression tumorale. De plus en plus d'études montrent que les aberrations épigénétiques jouent également un rôle important dans ces processus.

L'étude des données de méthylation de l'ADN (ERRBS) montre une hétérogénéité épigénétique spécifique à certains sous-groupes moléculaires de patients. On retrouve une hyperméthylation globale des patients présentant une t(4 ;14) caractérisés par une sur-expression de *MMSET*, une histone methyltransférase qui catalyse les marques H3K36me2. Les gènes différentiellement méthylés entre les deux groupes sont enrichis en gènes cible du complexe Polycomb et la marque H3K27me3. De récentes études montrent que la surexpression de *MMSET* est associée à une augmentation des marques H3K36me2 et une perte

des marques H3K27me3 [152]. De plus, l'augmentation des marques H3K36 pourrait altérer la fixation de EZH2 et induire de façon localisée une augmentation de la méthylation des H3K27 [152]. Par ailleurs une autre étude a récemment démontré que les cellules de MM t(4 ;14) requièrent *SETD2* pour leur survie [190]. Ce gène catalyse la triméthylation de H3K36me2 vers me3 pour lesquelles il a été montré un lien avec la méthylation de l'ADN *de novo* [160]. En effet l'inhibition de *SETD2* dans les cellules tumorales rénales génère une hyperméthylation de l'ADN au niveau des marques ectopiques H3K36me3 ainsi que dans les régions intergéniques et les enhancers [160,163]. Ces modifications apparaissent comme étant impliquées dans le retour des cellules vers un état moins différencié [163]. Dans les cellules de MM, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une interaction entre SETD2 et MMSET qui conduirait à une dérégulation localisée des marques H3K36me2 et H3K36me3. Cela pourrait engendrer une dérégulation associée de H3K27me3 et la méthylation de l'ADN au niveau de certaines régions spécifiques du génome. Encore peu de choses sont connues sur l'interaction entre méthylation de l'ADN et modification des histones. L'intégration des données de méthylation de l'ADN et des données de CHIP pourrait considérablement faire avancer les connaissances dans le domaine. Ainsi, l'équipe, en collaboration avec le groupe de Giacomo Cavalli, a réalisé des CHIP sequencing pour six marques histones sur 17 lignées de MM ce qui permettra de poser ces questions.

Par ailleurs, nos résultats démontrent pour la toute première fois que la méthylation de l'ADN a une valeur pronostique dans le MM. En effet, nous avons construit un score basé sur la méthylation des CpG qui a une valeur pronostique dans deux cohortes indépendantes. L'inclusion de ce niveau de régulation permet de définir un programme épigénétique lié à l'agressivité de la maladie. En particulier ces résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs de la régulation épigénétique dans le traitement du MM.

L'ERRBS nous permet d'apprécier la méthylation de l'ADN à l'échelle de la base nucléique sur un grand nombre de CpG avec le calcul de l'épipolymorphisme. Nos analyses montrent que plus le niveau de complexité des motifs épigénétiques présents dans la population tumorale est élevé, suggérant la présence de plus de sous-clones tumoraux au diagnostic, plus les patients ont un risque de rechute élevé. Il sera pertinent d'analyser si la diversité épigénétique liée à méthylation de l'ADN est indépendante ou non de l'hétéroclonalité monitorée sur le profil mutationnel. Cela ouvre également la question de comparer des échantillons appariés de patients au diagnostic et à la rechute pour étudier l'effet des traitements sur l'évolution de cette hétérogénéité épigénétique. De plus, une analyse plus précoce comparant de façon longitudinale des patients atteints de MGUS et lors de la progression en MM permettrait de comprendre si la

pression de sélection liée à l'accès à la niche durant cette phase est associée à une modification/sélection de l'hétérogénéité épigénétique. Nos données pourront être combinées aux données d'exome/whole genome/transcriptome en association avec une approche séquençage sur cellule unique pour des études détaillées de l'évolution clonale.

Enfin nous montrons de nombreuses associations entre les données de méthylation et la réponse aux traitements dans nos lignées de myélome multiple. Les HMCLs apparaissent donc comme des outils intéressants pour les études de combinaison de molécules épigénétiques avec les thérapies traditionnelles afin de découvrir de nouvelles synergies et étudier les mécanismes d'actions.

III. Analyses multi-omiques

Les analyses précédemment évoquées ont pour défaut principal de ne pas être reliées les unes aux autres et ne représentent donc pas la complexité de la cellule tumorale et des interactions entre les différents mécanismes biologiques. L'analyse combinée des données omiques (multi-omique) nous permettrait de comprendre les mécanismes biologiques dans leur ensemble, de façon globale et interconnectée (biologie systémique). Ce type d'analyse est la prochaine étape qui permettra de dresser un portrait encore plus détaillé des cellules tumorales afin de mieux comprendre la pathologie et trouver de nouvelles thérapies et biomarqueurs.

L'une des limites des analyses multi-omiques est la nécessité de disposer de larges jeux de données entièrement caractérisés. Des projets de grande ampleur qui ont pour but de générer une grande quantité de ces données de façon normalisée sont initiés afin pallier à cette problématique. Par exemple un projet à grande échelle nommé « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) associe NGS et bio-informatique pour générer et traiter les données de milliers d'échantillons tumoraux représentant les cancers majeurs (11 000 échantillons représentant 33 des cancers les plus fréquents).

Différentes méthodologies d'analyses peuvent être utilisées. Les données peuvent être intégrées par corrélation, et mettre en évidence deux éléments omiques agissant ensemble dans un mécanisme ou se perturbant l'un l'autre. D'autres méthodes statistiques plus élaborées utilisent des modèles qui permettent de comparer si chacun des éléments contribue à la maladie de façon indépendante ou en relation les uns avec les autres (régression, réseaux, inférence...).

Dans la littérature, l'analyse multi-omique pour étudier le MM n'en est qu'à ses débuts et peu de travaux ont été réalisés dans cet objectif jusqu'à présent. *Krzeminski et al.* ont intégré les aberrations cytogénétiques, la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes d'échantillons

de patients atteints de MM au diagnostic et à la rechute. Cette étude intégrative a révélé que l'hétérogénéité du MM décrite au diagnostic est maintenue à la rechute avec des déséquilibres cytogénétiques supplémentaires. Ces gains et pertes d'ADN n'engendrent pas de modification dans l'expression des gènes exception faite des variations génétiques > 100 Mb. L'étude montre également peu d'effet des changements de méthylation sur la transcription à la rechute [191]. Une autre équipe a réalisé une analyse intégrative avec une approche « réseau » des données RNAseq, whole-exome, whole genome et données cliniques de 400 patients. Cette étude a mis en évidence des groupes de gènes co-exprimés significativement corrélés à des traits cliniques et des altérations génomiques, représentés sous formes de modules. Par exemple l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et des dommages à l'ADN a été corrélée avec une rechute précoce, la charge mutationnelle et des altérations génomiques spécifiques tels que des mutations dans *TP53* et *MAX*, l'amplification de 1q et la délétion de 13q. Une signature de 4 gènes ayant une valeur pronostique a été trouvée à partir de ce module [192]. Enfin dans un contexte plus appliqué, une équipe a récemment développé une plateforme pour intégrer les données de séquençage de l'ADN (mutations somatiques, CNV) et de l'ARN dans un objectif de médecine de précision. La méthode consiste à identifier des mutations associées à une sensibilité à un traitement et des gènes différentiellement exprimés prédictifs à la sensibilité d'un traitement. Ces données sont ensuite utilisées pour orienter la prise en charge des patients. Par exemple un patient présentant la mutation de *KRAS* et une forte expression de *BCL2* a été pris en charge par une combinaison Venetoclax (inhibiteur de BCL2) associé au tramétinib (MEKi). Le patient a effectivement bien répondu au traitement qui néanmoins présentait de forts effets secondaires nécessitant son arrêt [193].

Avec un large jeu de données de plusieurs types, notre laboratoire dispose des ressources nécessaires pour réaliser des analyses multi-omiques. Nous avons déjà initié un premier projet en ce sens sur les lignées de MM. Celui-ci comprend l'intégration des données de méthylation, profils mutationnels, anomalies cytogénétiques, données transcriptomiques et de réponses aux traitements (IC50). Ces analyses sont réalisées avec le package R MOFA (Multi-Omics Factor Analysis) [194], une méthode de type factorielle non supervisée qui vise à réduire les dimensions de larges jeux de données en construisant des variables partagées facilement interprétables. Les premiers résultats de cette étude ont révélé des axes de variations partagés entre plusieurs types de données. Certains sont déjà décrits dans la littérature et sont rassurants sur la cohérence biologique du modèle. On peut par exemple citer un facteur mettant en évidence l'association entre la méthylation et la t(4;14). Certaines des voies associées à la variabilité décrite par ce facteur sont parlantes dans le contexte du myélome (apoptose, TP53, résorption osseuse

(BMP2)). Ces caractéristiques sont également associées à des défauts cytogénétique et à des résistances à certaines molécules qui n'ont pas encore été décrites. Par exemple l'association avec la résistance à l'inhibiteur d'ATR ou aux DNMTi. D'autres interactions ont été mises en exergues, notamment des associations entre mutations et défauts cytogénétiques dans le groupe de lignées de type MAF avec une mise en évidence d'un intérêt thérapeutique des agents ciblant les modification épigénétiques pour améliorer la prise en charge des patients. Les associations découvertes et les hypothèses formulées suite à cette étude pourront être confirmées par des analyses biologiques effectuées sur nos modèles de lignées cellulaires.

Cette étude sera complétée par l'ajout des données de marques histones pour 17 HMCLs (H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3) qui sont en cours d'analyse au laboratoire.

Le développement d'analyses multi-omiques représente une étape clé pour intégrer la complexité des différents processus biologiques qui participent de façon concomitante à la physiopathologie de la cellules tumorale. Cela ouvre également une voie vers une appréhension plus fines de l'hétérogénéité du MM au travers de leur capacité à prendre en compte les interactions entre les différents jeux de données. Par une amélioration des algorithmes d'analyses et l'inclusion de plus en plus de données normalisées et bien caractérisées, elles permettront de faire un pas considérable dans la compréhension de la biologie de la maladie et le développement d'approches de médecine personnalisée.

Références bibliographiques

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
2. Lu M, Zhan X. The crucial role of multiomic approach in cancer research and clinically relevant outcomes. *EPMA J*. 2018;9:77–102.
3. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017;18:83.
4. Yoo BC, Kim K-H, Woo SM, Myung JK. Clinical multi-omics strategies for the effective cancer management. *J Proteomics*. 2018;188:97–106.
5. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046.
6. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet*. 2015;385:2197–208.
7. Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:422–44.
8. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*. 2016;43:676–81.
9. Kräutler NJ, Suan D, Butt D, Bourne K, Hermes JR, Chan TD, et al. Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *J Exp Med*. 2017;214:1259–67.
10. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, et al. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity*. 2018;48:702–715.e4.
11. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000;13:199–212.
12. Alinikula J, Lassila O. Gene interaction network regulates plasma cell differentiation. *Scand J Immunol*. 2011;73:512–9.
13. Ranuncolo SM, Polo JM, Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;41:95–9.
14. Dege C, Hagman J. Activation of Aicda gene transcription by Pax5 in plasmacytoma cells. *Immunol Res*. 2013;55:155–61.
15. Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, et al. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*. 2004;429:566–71.
16. Muto A, Ochiai K, Kimura Y, Itoh-Nakadai A, Calame KL, Ikebe D, et al. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J*. 2010;29:4048–61.
17. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol*. 2016;17:331–43.
18. Shaffer AL, Lin KI, 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;17:51–62.
19. Shapiro-Shelef M, Lin K-I, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 2003;19:607–20.
20. Ochiai K, Muto A, Tanaka H, Takahashi S, Igarashi K. Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *Int Immunol*. 2008;20:453–60.
21. Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, Calame KL. Direct

- repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol.* 2004;173:1158–65.
22. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity.* 2006;25:225–36.
23. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity.* 2013;38:918–29.
24. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107:881–91.
25. Jourdan M, Caraux A, Caron G, Robert N, Fiol G, Rème T, et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J Immunol.* 2011;187:3931–41.
26. Jourdan M, Cren M, Schafer P, Robert N, Duperray C, Vincent L, et al. Differential effects of lenalidomide during plasma cell differentiation. *Oncotarget.* 2016;7:28096–111.
27. Jourdan M, Cren M, Robert N, Bolloré K, Fest T, Duperray C, 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;28:1647–56.
28. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:160–71.
29. Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med.* 2004;200:967–77.
30. Lin KI, Lin Y, Calame K. Repression of *c-myc* is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8684–95.
31. Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of *c-myc* transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science.* 1997;276:596–9.
32. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, González-García I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood.* 2002;99:2154–61.
33. Shi W, Liao Y, Willis SN, Taubenheim N, Inouye M, Tarlinton DM, et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat Immunol.* 2015;16:663–73.
34. Tarte K, Zhan F, De Vos J, Klein B, Shaughnessy J. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood.* 2003;102:592–600.
35. Barwick BG, Scharer CD, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. *Nat Immunol.* 2016;17:1216–25.
36. Kassambara A, Jourdan M, Bruyer A, Robert N, Pantesco V, Elemento O, et al. Global miRNA expression analysis identifies novel key regulators of plasma cell differentiation and malignant plasma cell. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:5639–52.
37. Herviou L, Jourdan M, Martinez A-M, Cavalli G, Moreaux J. EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in human plasma cell differentiation. *Leukemia.* 2019;
38. Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol.* 1995;69:1895–902.
39. Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.*

2011;32:595–602.

40. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KGC, Dörner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:741–50.
41. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev.* 2013;251:177–88.
42. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003;112:286–97.
43. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat A-F, Bossen C, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood.* 2008;111:2755–64.
44. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009;113:5412–7.
45. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28:iv52–61.
46. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015;33:2863–9.
47. Mai EK, Bertsch U, Dürig J, Kunz C, Haenel M, Blau IW, et al. Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) in newly diagnosed myeloma. *Leukemia.* 2015;29:1721–9.
48. Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chaletteix C, Roussel M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood.* 2016;127:2569–74.
49. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, Richardson PG, Hulin C, Tosi P, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2017;35:3279–89.
50. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med.* 2014;371:906–17.
51. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;389:519–27.
52. Rajkumar SV, Harousseau J-L, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood.* 2011;117:4691–5.
53. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17:e328–46.
54. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20:1467–73.
55. Laubach J, Garderet L, Mahindra A, Gahrton G, Caers J, Sezer O, et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia.* 2016;30:1005–17.
56. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab

- Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373:621–31.
57. Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, Bahlis NJ, Belch A, Lonial S, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;128:37–44.
58. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375:754–66.
59. Giralt S, Garderet L, Durie B, Cook G, Gahrton G, Bruno B, et al. American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2039–51.
60. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, Ahmann G, Price-Troska T, Henderson K, et al. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res*. 2007;67:2982–9.
61. Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood*. 2004;104:1120–6.
62. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998;92:3025–34.
63. Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schröck E, Ried T, Kuehl WM, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1997;16:260–4.
64. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood*. 1998;91:4457–63.
65. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*. 2004;5:191–9.
66. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:296–303.
67. Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016;128:1735–44.
68. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng W-J, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12:131–44.
69. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12:115–30.
70. Roy P, Sarkar UA, Basak S. The NF-κB Activating Pathways in Multiple Myeloma. *Biomedicines*. 2018;6.
71. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*. 2007;11:349–60.
72. Shaffer AL, Emre NCT, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, et al. IRF4 addiction in

- multiple myeloma. *Nature*. 2008;454:226–31.
73. Agnelli L, Biccato S, Fabris S, Baldini L, Morabito F, Intini D, et al. Integrative genomic analysis reveals distinct transcriptional and genetic features associated with chromosome 13 deletion in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92:56–65.
74. Shah GL, Landau H, Londono D, Devlin SM, Kosuri S, Lesokhin AM, et al. Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2017;58:1823–31.
75. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:335–48.
76. Mikulasova A, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Jackson GH, Smetana J, et al. The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica*. 2017;102:1617–25.
77. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia*. 2009;23:1941–56.
78. Szalat R, Avet-Loiseau H, Munshi NC. Gene Expression Profiles in Myeloma: Ready for the Real World? *Clin Cancer Res*. 2016;22:5434–42.
79. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471:467–72.
80. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:91–101.
81. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
82. Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, Gewartowska O, Gruchota J, Cysewski D, et al. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2017;8:619.
83. Hoang PH, Dobbins SE, Cornish AJ, Chubb D, Law PJ, Kaiser M, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms. *Leukemia*. 2018;32:2459–70.
84. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:100–13.
85. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:268.
86. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23–8.
87. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120:1067–76.
88. Egan JB, Shi C-X, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012;120:1060–6.
89. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33:3911–20.
90. Andrusis M, Lehnert N, Capper D, Penzel R, Heining C, Huellein J, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov*. 2013;3:862–9.
91. Fakhri B, Vij R. Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16 Suppl:S130-134.
92. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular

- classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:2020–8.
93. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knecht Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*. 2010;116:2543–53.
94. López-Corral L, Corchete LA, Sarasquete ME, Mateos MV, García-Sanz R, Fermiñán E, et al. Transcriptome analysis reveals molecular profiles associated with evolving steps of monoclonal gammopathies. *Haematologica*. 2014;99:1365–72.
95. Anguiano A, Tuchman SA, Acharya C, Salter K, Gasparetto C, Zhan F, et al. Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009;27:4197–203.
96. Moreaux J, Hose D, Kassambara A, Reme T, Moine P, Requirand G, et al. Osteoclast-gene expression profiling reveals osteoclast-derived CCR2 chemokines promoting myeloma cell migration. *Blood*. 2011;117:1280–90.
97. Zhu B, Ju S, Chu H, Shen X, Zhang Y, Luo X, et al. The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma. *Oncol Lett*. 2018;15:6094–106.
98. Wu P, Agnelli L, Walker BA, Todoerti K, Lionetti M, Johnson DC, et al. Improved risk stratification in myeloma using a microRNA-based classifier. *Br J Haematol*. 2013;162:348–59.
99. Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010;18:367–81.
100. Xue M, Zhuo Y, Shan B. MicroRNAs, Long Noncoding RNAs, and Their Functions in Human Disease. *Methods Mol Biol*. 2017;1617:1–25.
101. Butova R, Vychytilova-Faltejskova P, Souckova A, Sevcikova S, Hajek R. Long Non-Coding RNAs in Multiple Myeloma. *Noncoding RNA*. 2019;5.
102. Nobili L, Ronchetti D, Agnelli L, Taiana E, Vinci C, Neri A. Long Non-Coding RNAs in Multiple Myeloma. *Genes (Basel)*. 2018;9.
103. Nagoshi H, Taki T, Chinen Y, Tatekawa S, Tsukamoto T, Maegawa S, et al. Transcriptional dysregulation of the deleted in colorectal carcinoma gene in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54:788–95.
104. Aktas Samur A, Samur MK, Minvielle S, Magrangeas F, Fulciniti M, Szalat R, et al. A Detailed Alternate Splicing Landscape in Multiple Myeloma with Significant Potential Biological and Clinical Implications. *Blood*. 2016;128:356.
105. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109:2276–84.
106. Kuiper R, Broyl A, de Knecht Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, et al. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia*. 2012;26:2406–13.
107. Khan R, Dhodapkar M, Rosenthal A, Heuck C, Papanikolaou X, Qu P, et al. Four genes predict high risk of progression from smoldering to symptomatic multiple myeloma (SWOG S0120). *Haematologica*. 2015;100:1214–21.
108. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369:438–47.
109. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jézéquel P, 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 Myélome. *J Clin Oncol*. 2008;26:4798–805.

110. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, Johnson DC, Brito JL, Zeisig A, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1856–64.
111. Hose D, Rème T, Hielscher T, Moreaux J, Messner T, Seckinger A, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica.* 2011;96:87–95.
112. Chng WJ, Braggio E, Mulligan G, Bryant B, Remstein E, Valdez R, et al. The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood.* 2008;111:1603–9.
113. Chng WJ, Chung T-H, Kumar S, Usmani S, Munshi N, Avet-Loiseau H, et al. Gene signature combinations improve prognostic stratification of multiple myeloma patients. *Leukemia.* 2016;30:1071–8.
114. Meissner T, Seckinger A, Rème T, Hielscher T, Möhler T, Neben K, et al. Gene expression profiling in multiple myeloma--reporting of entities, risk, and targets in clinical routine. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7240–7.
115. Terragna C, Remondini D, Martello M, Zamagni E, Pantani L, Patriarca F, et al. The genetic and genomic background of multiple myeloma patients achieving complete response after induction therapy with bortezomib, thalidomide and dexamethasone (VTD). *Oncotarget.* 2016;7:9666–79.
116. Wu P, Walker BA, Broyl A, Kaiser M, Johnson DC, Kuiper R, et al. A gene expression based predictor for high risk myeloma treated with intensive therapy and autologous stem cell rescue. *Leuk Lymphoma.* 2015;56:594–601.
117. Terragna C, Renzulli M, Remondini D, Tagliafico E, Di Raimondo F, Patriarca F, et al. Correlation between eight-gene expression profiling and response to therapy of newly diagnosed multiple myeloma patients treated with thalidomide-dexamethasone incorporated into double autologous transplantation. *Ann Hematol.* 2013;92:1271–80.
118. Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrone J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:2685–92.
119. Moreaux J, Reme T, Leonard W, Veyrone J-L, Requirand G, Goldschmidt H, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *British Journal of Cancer.* 2013;109:676–85.
120. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;349:2483–94.
121. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood.* 2009;114:371–9.
122. Di Martino MT, Leone E, Amodio N, Foresta U, Lionetti M, Pitari MR, et al. Synthetic miR-34a mimics as a novel therapeutic agent for multiple myeloma: in vitro and in vivo evidence. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6260–70.
123. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai Y-T, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood.* 2012;119:5772–81.
124. Orłowski RZ, Lonial S. Integration of Novel Agents into the Care of Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016;22:5443–52.
125. Kumar SK, Anderson KC. Immune Therapies in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016;22:5453–60.
126. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:3–25.

127. Kelly AD, Issa J-PJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. *Curr Opin Genet Dev.* 2017;42:68–77.
128. Costa-Pinheiro P, Montezuma D, Henrique R, Jerónimo C. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. *Epigenomics.* 2015;7:1003–15.
129. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:101–15.
130. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbæk K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2014;4:e207.
131. 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;21:91–101.
132. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J.* 2009;50:455–63.
133. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood.* 2011;117:553–62.
134. Sahlia B, Baker A, Ahmann G, Auclair D, Fonseca R, Carpten J. DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. *Cancer Res.* 2010;70:6934–44.
135. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, Gundabolu K, Yu Y, Khan S, et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J Immunol.* 2013;190:2966–75.
136. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, Ronchetti D, Mosca L, Delilieri GL, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis.* 2009;30:1330–5.
137. Sive JI, Feber A, Smith D, Quinn J, Beck S, Yong K. Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis. *Br J Haematol.* 2016;172:473–5.
138. Agirre X, Castellano G, Pascual M, Heath S, Kulis M, Segura V, et al. Whole-genome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res.* 2015;25:478–87.
139. Yuregir OO, Yurtcu E, Kizilkilic E, Kocer NE, Ozdogu H, Sahin FI. Detecting methylation patterns of p16, MGMT, DAPK and E-cadherin genes in multiple myeloma patients. *Int J Lab Hematol.* 2010;32:142–9.
140. Chim CS, Pang R, Fung TK, Choi CL, Liang R. Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007;21:2527–36.
141. Jost E, Gezer D, Wilop S, Suzuki H, Herman JG, Osieka R, et al. Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma. *Cancer Lett.* 2009;281:24–31.
142. Chim C-S, Fung T-K, Cheung W-C, Liang R, Kwong Y-L. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood.* 2004;103:4630–5.
143. Sharma A, Heuck CJ, Fazzari MJ, Mehta J, Singhal S, Grealley JM, et al. DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2:654–69.
144. Amodio N, Leotta M, Bellizzi D, Di Martino MT, D'Aquila P, Lionetti M, et al. DNA-demethylating and anti-tumor activity of synthetic miR-29b mimics in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2012;3:1246–58.
145. Song SJ, Ito K, Ala U, Kats L, Webster K, Sun SM, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. *Cell Stem Cell.* 2013;13:87–101.

146. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, Stephens O, Wu X, Williams DR, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7904–9.
147. Martinez-Garcia E, Popovic R, Min D-J, Sweet SMM, Thomas PM, Zamdborg L, et al. The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*. 2011;117:211–20.
148. Brito JLR, Walker B, Jenner M, Dickens NJ, Brown NJM, Ross FM, et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2009;94:78–86.
149. Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B, Moreaux J. EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget*. 2016;7:2284–96.
150. 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:e549.
151. Sander S, Bullinger L, Klapproth K, Fiedler K, Kestler HA, Barth TFE, et al. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood*. 2008;112:4202–12.
152. 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:e1004566.
153. 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;7:6809–23.
154. 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;49:80–93.
155. Pawlyn C, Kaiser MF, Heuck C, Melchor L, Wardell CP, Murison A, et al. The Spectrum and Clinical Impact of Epigenetic Modifier Mutations in Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016;22:5783–94.
156. Vikova V, Jourdan M, Robert N, Requirand G, Boireau S, Bruyer A, et al. Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance. *Theranostics*. 2019;9:540–53.
157. 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;9:1511–20.
158. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393:386–9.
159. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6538–47.
160. Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J*. 2008;27:406–20.
161. Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, Han H, et al. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol*. 2009;29:5366–76.
162. Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, Tamas R, Jurkowska RZ, Ragozin S, et al. The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA

- methylation. *J Biol Chem*. 2010;285:26114–20.
163. Tiedemann RL, Hlady RA, Hanavan PD, Lake DF, Tibes R, Lee J-H, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in SETD2-deregulated renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:1927–46.
164. Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007;448:714–7.
165. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*. 2012;22:1128–38.
166. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 2007;39:232–6.
167. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*. 2007;39:237–42.
168. Neri F, Incarnato D, Krepelova A, Rapelli S, Pagnani A, Zecchina R, et al. Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2013;14:R91.
169. He J, Shen L, Wan M, Taranova O, Wu H, Zhang Y. Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol*. 2013;15:373–84.
170. Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, Rose NR, et al. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife*. 2012;1:e00205.
171. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1718–27.
172. Maes K, De Smedt E, Lemaire M, De Raeve H, Menu E, Van Valckenborgh E, et al. The role of DNA damage and repair in decitabine-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2014;5:3115–29.
173. Moreaux J, Bruyer A, Veyrune J-L, Goldschmidt H, Hose D, Klein B. DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br J Haematol*. 2014;164:613–6.
174. 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 (Basel)*. 2013;5:430–61.
175. Hideshima T, Qi J, Paranal RM, Tang W, Greenberg E, West N, et al. Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:13162–7.
176. Mishima Y, Santo L, Eda H, Cirstea D, Nemani N, Yee AJ, et al. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol*. 2015;169:423–34.
177. Yee AJ, Bensinger WI, Supko JG, Voorhees PM, Berdeja JG, Richardson PG, et al. Ricolinostat plus lenalidomide, and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: a multicentre phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:1569–78.
178. Shah MY, Martinez-Garcia E, Phillip JM, Chambliss AB, Popovic R, Ezponda T, et al. MMSET/WHSC1 enhances DNA damage repair leading to an increase in resistance to chemotherapeutic agents. *Oncogene*. 2016;35:5905–15.

179. di Luccio E. Inhibition of Nuclear Receptor Binding SET Domain 2/Multiple Myeloma SET Domain by LEM-06 Implication for Epigenetic Cancer Therapies. *J Cancer Prev.* 2015;20:113–20.
180. Herviou L, Kassambara A, Boireau S, Robert N, Requirand G, Müller-Tidow C, et al. PRC2 targeting is a therapeutic strategy for EZ score defined high-risk multiple myeloma patients and overcome resistance to IMiDs. *Clin Epigenetics.* 2018;10:121.
181. Endo S, Amano M, Nishimura N, Ueno N, Ueno S, Yuki H, et al. Immunomodulatory drugs act as inhibitors of DNA methyltransferases and induce PU.1 up-regulation in myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469:236–42.
182. Pan H, Jiang Y, Boi M, Tabbò F, Redmond D, Nie K, et al. Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. *Nat Commun.* 2015;6:6921.
183. Landan G, Cohen NM, Mukamel Z, Bar A, Molchadsky A, Brosh R, et al. Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues. *Nat Genet.* 2012;44:1207–14.
184. Inoue T, Morita M, Hijikata A, Fukuda-Yuzawa Y, Adachi S, Isono K, et al. CNOT3 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. *J Exp Med.* 2015;212:1465–79.
185. De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T, et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45:186–90.
186. Guo C, Chen LH, Huang Y, Chang C-C, Wang P, Pirozzi CJ, et al. KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation. *Oncotarget.* 2013;4:2144–53.
187. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee J-E, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med.* 2015;21:1190–8.
188. Casciello F, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Front Immunol.* 2015;6:487.
189. Tu WB, Shiah Y-J, Lourenco C, Mullen PJ, Dingar D, Redel C, et al. MYC Interacts with the G9a Histone Methyltransferase to Drive Transcriptional Repression and Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2018;34:579-595.e8.
190. Thomenius MJ, Totman J, Cosmopoulos K, Brach D, Ci L, Farrow N, et al. Identification of a First-in-Class SETD2 Inhibitor That Shows Potent and Selective Anti-Proliferative Activity in t(4;14) Multiple Myeloma: T(4;14) Multiple Myeloma Cells Are Dependent on Both H3K36 Di and Tri-Methylation. *Blood.* 2018;132:3207.
191. Krzeminski P, Corchete LA, García JL, López-Corral L, Ferriñán E, García EM, et al. Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse. *Oncotarget.* 2016;7:80664–79.
192. Laganà A, Perumal D, Melnekoff D, Readhead B, Kidd BA, Leshchenko V, et al. Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia.* 2018;32:120–30.
193. Laganà A, Beno I, Melnekoff D, Leshchenko V, Madduri D, Ramdas D, et al. Precision Medicine for Relapsed Multiple Myeloma on the Basis of an Integrative Multiomics Approach. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018.
194. Argelaguet R, Velten B, Arnol D, Dietrich S, Zenz T, Marioni JC, et al. Multi-Omics Factor Analysis—a framework for unsupervised integration of multi-omics data sets. *Mol Syst Biol.* 2018;14:e8124.