Université Sorbonne Paris Cité

Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale : Hématologie, Oncogenèses et Biothérapies – HOB

ED numéro 561

Inserm UMR_S_1126 – Différenciation des lymphocytes et hémopathies lymphoïdes

Étude des événements génétiques associés à l'évolution du myélome multiple avec t(4;14).

Par Xiu Yi SONG

Thèse de doctorat de Biologie et Biotechnologie (B2T)

Dirigée par le Dr Jean-Christophe BORIES

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 4 Janvier 2017

Président du jury : HERMINE Olivier	Professeur à l'Université Paris Descartes
Rapporteurs : DAVI Frédéric	Professeur à l'Université Pierre et Marie CURIE
DECAUX Olivier	Professeur à l'Université de Renne
Examinateur : VARIN-BLANK Nadine	Professeur à l'Université Paris 13
Directeur de thèse : BORIES Jean-Christophe	Professeur à l'Université Paris Diderot

Titre : Étude des événements génétiques associés à l'évolution du myélome multiple avec t(4;14).

Résumé : Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne, caractérisée par la prolifération au niveau de la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux sécrétant le plus souvent une immunoglobuline monoclonale. Malgré de récents progrès thérapeutiques, cette maladie reste aujourd'hui incurable avec une survie médiane d'environ 6 ans. Cependant, il existe une grande hétérogénéité pronostique parmi les patients qui est associée à différentes anomalies génétiques. Parmi celles-ci, la translocation t(4;14) (p16;q32), retrouvée dans 15% des MM, définit l'une des formes de MM actuellement la plus grave. Malgré le rôle potentiel des deux oncogènes FGFR3 et MMSET qu'elle dérégule, les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer la gravité des MM avec t(4;14) ne sont pas clairement élucidés. En mettant en œuvre des approches de biologie moléculaire, de séquençage à haut débit et de tests fonctionnels sur une très large série de MM t(4;14), mes travaux ont cherché à identifier les événements génétiques associés au mauvais pronostic de ce sous-groupe de malades. Les résultats montrent l'implication du point de cassure au sein du gène MMSET dans le pronostic des patients. Ils ont également permis de définir le paysage particulier des mutations génétiques affectant les MM t(4;14) en mettent en évidence les fréquences relativement élevées des altérations dans les gènes ATM/ATR et PRKD2. Enfin, ils ont identifiés PKD2 comme une cible thérapeutique et démontré qu'un inhibiteur des PKDs, kb NB 142-70, bloquait la prolifération des cellules de MM in vitro. L'ensemble de ces résultats jette un éclairage nouveau sur la physiopathologie des MM t(4;14) et ouvre la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots clefs : Myélome multiple, la translocation t(4 ;14), PKD2

Title : A study of the genetic events associated with the evolution of the t(4 ;14) multiple myeloma.

Abstract : Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by the proliferation of plasma cells in the bone marrow usually secreting a monoclonal immunoglobulin. Despite recent therapeutic advances, the disease remains incurable, with a median survival of approximately 6 years. However, there is considerable clinical heterogeneity between patients, with different outcome primarily associated with discrete genetic abnormalities. Among these, the t (4;14) (p16; q32), which is found in 15% of MM, defines one of the most serious subgroups of MM. Despite the potential role of two deregulated oncogenes (FGFR3 and MMSET), the molecular mechanisms that explain the severity of MM with t (4;14) have not been clearly elucidated. By implementing the approaches of molecular biology, high throughput sequencing and functional tests on a wide range of MM t (4;14), my project sought to identify genetic events associated with the poor prognosis of this subgroup of patients. The results showed that the site of the translocation breakpoints within the MMSET gene affect patient outcome. They also profiled the landscape of specific genetic mutations affecting t (4;14) MM, and revealed a relatively high frequency of alterations in the ATM / ATR genes and PRKD2. Finally, this project has identified PKD2 as a therapeutic target and demonstrated that an inhibitor of PKDs (kb NB 142-70) blocks the proliferation of MM cells in vitro. All these results throw new light on the pathophysiology of MM t (4;14) and opens the way to new therapeutic approaches.

Keywords : Multiple Myeloma, t(4;14) translocation, PKD2

Remerciements

Je remercie le Pr Olivier Hermine d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier le Pr Frédéric DAVI ainsi que le Pr Olivier DECAUX d'avoir accepté et pris le temps de relire et examiner ce travail.

Je remercie le Pr Nadine VARIN-BLANK d'avoir accepté d'être membre de jury de thèse.

Je remercie respectueusement le Dr Jean-Christophe Bories de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de réaliser cette thèse.

Merci David GARRICK pour ta précieuse aide au Galaxy, et des informations partagées en LncRNA.

Merci Élisabeth pour nos discussions et ton soutien.

Je remercie mes collègues et anciens collègues de laboratoire pour leur convivialité.

Je remercie Camille, Romain et Enguerran pour m'introduire des protocoles de laboratoire.

Je remercie Caroline et Carolinas pour vos amitiés, pour le partage des idées de la vie scientifique et quotidienne.

Je remercie Sophia secrétaire-gestionnaire du laboratoire.

Je remercie Mumu et Katy pour nos discussions de cultures et histoires de laboratoire.

Je remercie les cliniciens du laboratoire: Dr Bertrand ARNULF, Pr Claire Fieschi, Pr Jean-Paul Fermand et le Pr Jean-Claude Brouet pour leurs participations et conseils lors des réunions.

Je remercie Michèle pour tes conseils scientifiques lors des réunions.

Merci David Boutboul « le superman », Remy, Aurélie, Alban, Anne et Alexie pour nos discussions clinico-scientifique, le partage de votre expérience et vos bonnes humeurs.

Merci Salomé pour m'avoir sauvé dans la rue de Lisbonne.
Merci Isabelle pour ton aide et tes chocolats quand je suis stressée.

Je remercie Georges et Raymonde.

Je tiens à remercier Véronique et Martine de l'animalerie, ainsi que l'équipe de plateau technique Niclas, Christelle, Sophie, Julien, Monique et Antonie pour votre précieuse aide.

Merci Daniel pour ton aide à m'apprendre FISH.
Merci Lulu, Aurélie, Wendy pour l'information de patients.
Merci Émile et Jean-Michel pour me partager la machine de séquençage.

Merci Raphaël pour la communication et ton travail. Tu travailles quand je suis en repose.
Merci Marina pour ton aide en thymidine.

Merci Jayendra Shinde et Éric Letouzé pour votre aide bio-informatique. « Thank you, Jayendra. Your work is important, although it takes a little longer to finish than we thought. »
Merci l'équipe de l'Institut Curie pour votre service du serveur Galaxy et Windy pour m'introduire tous outils de CNV.

Je tiens à remercier les « Souliers » : Delphine, Tiama, Nadia, Magalie, Alix et Dominique. Merci pour votre aide aussi bien scientifique que matérielle.

J'adresse mes remerciements à l'université Paris VII pour avoir financé mes trois premières années de thèse ainsi qu'à FFRMG et l'Association Robert Debré pour m'avoir accordé une quatrième année afin de pouvoir mener à bien mes recherches.

Je remercie mes amis qui, parfois sans le savoir, m'ont soutenu pendant ces quatre années.

Je remercie tout particulièrement ma famille pour son soutien sans faille depuis le début.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ/SUMMARY……..…….2

REMERCIEMENTS ……4

SOMMAIRE…….…..……6

TABLE DES FIGURES…….…..…….....9

GLOSSAIRE……..…...11

INTRODUCTION……..14

1. DIFFÉRENTIATION DES LYMPHOCYTES B TERMINALE ET MYÉLOME MULTIPLE…….……..……...15

1.1 La différenciation des cellules B…….……15

1.1.1 La différenciation précoce des cellules B 15

1.1.2 L'activation des lymphocytes B et l'engagement de leur différenciation terminale 16

1.1.3 Le développement terminal des cellules B et la transition lymphoplasmocytaire 17

1.2 Les réarrangements des gènes des Ig et la commutation de classe…19

1.2.1 Structure d'une Immunoglobuline 19

1.2.2 Réarrangement des gènes de Ig 20

1.2.3 Diversité des Ig 21

1.2.4 La commutation de classe des gènes des chaines lourdes des Ig 22

i. Hypermutations somatiques 23

ii. La commutation de classe des gènes IgH 23

1.3 Le myélome multiple……..26

1.3.1 Epidémiologie 26

1.3.2 Les signes cliniques du MM 27
1.3.3 Le diagnostic du MM 27
1.3.4 Les traitements du MM 28
1.4 La biologie du MM……..……30
1.4.1 Origine de la cellule myélomateuse 30
1.4.2 Oncogenèse du MM 31
i. MGUS et SMM 31
ii. De MGUS/SMM à MM 31
1.4.3 Classification selon les anomalies génétiques 33
i. L'hyper-diploïdie 34
ii. Les principales délétions chromosomiques 34
iii. Les activations de MYC 35
iv. Les translocations impliquant le locus des chaines lourdes des Ig(14q13) 35
- La translocation t(11;14) 36
- Les translocations t(14;16) et t(14;20) 36
- La translocation t(4;14) 36
Le FGFR3 38
La protéine MMSET/NSD2 39
1.4.4 Rôle du micro-environnement 41
i. Les principales voies d'interactions entre les cellules stromales et la matrice extracellulaire 43
ii. L'interleukine-6 (IL-6) 43
iii. L'insuline-growth factor (IGF-1) 44
iv. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) / VEGFR 45
v. Le fibroblast growth factor (FGF) / FGFR3 45
1.4.5 Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du MM 47
i. JAK/STAT 48
ii. NFκB 50
iii. Ras/Raf/MAPK 52
iv. PI3K/Akt 54
v. PLC/PKC/PKD2 58
2. LE PAYSAGE MUTATIONNEL GLOBAL DANS LE MYÉLOME MULTIPLE……..63

2.1 Mutations affectant les principales voies métaboliques et fonctions cellulaires des plasmocytes tumoraux. ……..64
2.2 Impact sur l'évolution clonale…….64

OBJECTIFS DE LA THÈSE……66

RÉSULTAT……67
1. Étude du pronostic des points de cassure de la translocation t(4;14)……67
2. Étude des mutations caractérisant les Myélomes avec t(4 ;14)…… ……..72

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES……..….106

RÉFÉRENCES……...113

TABLE DES FIGURES

Figure1 : Le développent des lymphocytes B aux plasmocytes (Adapté de *Nutt et al., Nat. Rev. Immunol.* 2015)……18

Figure2 : Schéma de l'interaction de facteurs pendant la différentiation terminale en plasmocytes (Adapté de *Lin et al., Immunol Rev*, 2003)……19

Figure3 : Structure simplifiée d'une Immunoglobuline (Adapté de *Schroeder & Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol.* 2010)……...20

Figure4 : Schéma simplifié des réarrangement des gènes des Immunoglobulines (Adapté de *Chaudhuri & Alt, Nat. Rev. Immunol.* 2004)……21

Figure5 : Schéma simplifié de la recombinaison des gènes des Immunoglobulines (Adapté de *Chaudhuri & Alt, Nat. Rev. Immunol.* 2004)……22

Figure6 : Schéma de dommages connus dans le myélome multiple, y compris des mutations, des altérations de nombre de chromosome et les translocations (*Morgan et al., Nat. Rev. Cancer*, 2012)……30

Figure7 : Schéma des stades de l'évolution du myélome multiple avec des événements et la classification de MM par le pronostic (Adapté de *Korde et al., Blood*, 2011 & *Bergsagel et al., Blood*, 2013) ……33

Figure8 : Représentation de la translocation t(4;14) et le gène hybride IgH/MMSET avec les 3 principaux points de cassures et des différents isoformes de MMSET sauvages et tronqués (Adapté de *Keats et al., Blood*, 2003 et *Brito et al., Haematoligica*, 2009)……37

Figure9 : Représentation des nombreuses voies de signalization activées par la liaison du FGFR3 avec son ligand FGF (*Wu XR, Nat Rev Cancer*, 2005)……....38

Figure10 : Schéma de l'interaction et des targets de MMSET (Adapté de *Xie ZG et Chng WJ, BioMed Res Int.* 2014)……..40

Figure11 : Représentation des interactions entre le plasmocyte tumoral et son microenvironnment (*Hideshima et al., Nature Reviews Cancer*, 2007)……...42

Figure12 : Schéma simplifié de la voie de signalisation par IL-6 et son récepteur (*Heinrichet al., Biochem*, 2003)…………………………………..…..…..…..…..…..….44
Figure13 : Schéma des voies de signalisation activées dans le MM (Adapté de *Bruno et al., Leukemia*, 2005)……………………………………………………47
Figure14 : Représentation de la structure des membres de la famille des JAK/STAT (Adapté de *O'Shea et al., Nat Rev Drug Discov.*, 2004)…………………………48
Figure15 : Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille NFκB (Adapté de *Ghosh et al., Annu Rev Immunol*, 1998)……………………..…50
Figure16 : Représentation de la voie de signalisation NFκB (Adapté de *Oeckinghaus et al., Nat Immunol,* 2011)…………………………………………………………51
Figure17 : Schéma de la voie de signalisation de MAPK kinases (Adapté de *Reuter et al., Blood,* 2000)…………………………………………………………………53
Figure18 : Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille PI3K (Adapté de *Liu et al., Nat Rev Drug Discov*, 2009)………………………………54
Figure19 : Schéma simplifié de la voie de signalisation PI3K/Akt (Adapté de *Hennessy et al., Nat Rev Drug Discov*, 2005 et *Park et al., Haematologica*, 2010)..58
Figure 20: Schéma de la voie de signalisation PLC/PKC/PKD (Adapté de *Spitaler & Cantrell, Nature Immunology,* 2004)…………………………………………….59
Figure21 : Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille PKC et le modèle d'activation (Adapté de *Mellor et al., Biochem J*, 1998 et *Pearce et al., Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2010)…………………………...…………………61
Figure22 : Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille PKD (Adapté de *Durand et al., J Clin Med*, 2016)……………………………………..62
Figure23 : Schéma de le processus de l'évolution de myélome multiple (Adapté de *Morgan et al., Nat Rev Cancer*. 2012) ………………………………………….65

GLOSSAIRE

Ac anticorps
ADN acide désoxyribonucléique
A-EJ alterative end joining
Ag antigène
AID activation induced cytidine deaminase
Akt/PKB AKT serine/threonine kinase/protéine kinase B
ALP Alky-lysophospholipids
APOBEC apolipoprotein B mRNA-editing polypeptide-like cytidine deaminase
ARN acide ribonucléique
ATP adenosine triphosphate
BCR B cell receptor
Bp point de cassure
cDNAs complementary DNAs
CGH compare genomic hybride
CNV Copy Number Variation
CSH cellules souches hématopoïétiques
CSR class switch recombination
DAG diacyl-glycérol
Del délétion
Der dérivation
DEPTOR domain containing mTOR-interacting protein
DSB cassure de doubles brins
ECM matrice extracellulaire
EGFR epidermal growth factor receptor
ER réticulum endoplasmique
ERK extracellular signal regulated kinase
FAK focal adhesion kinase
FGF fibroblast growth factor receptors
FGFR3 3ème récepteur au FGF
FISH hybridation in situ fluorescente

GC centres germinaux

GTP guanosine triphosphate

HDAC histone deacétylase

ICAM-1 intercelluler adhesion molecule 1

Ig immunoglobuline

IGF1 insulin growth factor

IGF1R récepteur à l'IGF1

IL-6 interleukine 6

IMiD immunomodulatory imide drugs

IKKs I-kappa-B kinases

LFA-1 Lymphocyte function-associated antigen 1

LPA lysophosphatidic acid

JAK janus kinase

MAPK mitogen-activated protein kinase

MDM murin double minute

MGUS monoclonal gammopathy of undertermined significance

MM myélome multiple

MMSET multiple myeloma SET gene

MO moelle osseuse

MSH MutS protein homolog

miRNA microRNA

mTOR mammalian target of rapamycine

MZ zone marginale

NADPH Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NEMO NFκB essential modulator/IKKγ

NFκB nuclear-factor κB

NHEJ non-homologous end joining

NSD2 Nuclear SET Domain-Containing Protein 2

OS overall survival

PCR Réaction en chaîne par polymérase

PDGFR Platelet-derived growth factor receptors

PFS progression free survival

PI3K Phosphoinositide-3-Kinase

PIP2 phosphatidylinositol-di-phosphate

PIP3 phosphatidylinositol-tri-phosphate

PRKD2 Serine /Threonine-protein kinase D2

PKC Protein kinase C

PLC Phospholipase C

PTEN phosphatase and tension homolog (deleted on chromosome 10)

RAGs recombination-activating genes

RNA-seq séquençage de l'ARN

RTK récepteur à activité tyrosine kinase

RSS recombination signal sequences

SOCS suppressor of cytokine signaling

STAT signal transducer and activation of transcription

SHIP SH2-containing inositol (poly) phosphate 5-phosphatase

SHM hypermutation somatique

SMM myélome multiple indolent

SVF sérum de veau foetal

Tfh T follicular helper

TK tyrosine kinase

UNG uracil DNA glycosylase

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1

VEGF vascular endothelial growth factor

VLA very late antigene

WHSC1 Wolf-Hirschhorn Syndrome candidate 1

Introduction.

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération au niveau de la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux sécrétant le plus souvent une immunoglobuline monoclonale (Palumbo and Anderson, 2011). En France, cette maladie affecte environ 4000 nouveaux malades chaque année. Malgré de récents progrès thérapeutiques, elle reste incurable avec une survie médiane actuellement de l'ordre de 6 ans (Dimopoulos et al., 2015). Ce pronostic global rend compte d'une grande hétérogénéité. Diverses études génétiques ont mis en évidence deux caractéristiques moléculaires principales impliquées dans cette hétérogénéité, des translocations impliquant les régions de switch des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) d'une part, et une hyper-diploïdie, d'autre part (Avet-Loiseau et al., 2007a).

Les translocations n'activent pas un même oncogène mais ont des partenaires oncogéniques différents, codant, selon les cas, pour les cyclines D1 et D3, Fgfr3 (le Fibroblast Growth Factor Receptor-3) ou c-Maf (Bergsagel and Kuehl, 2001; Kuehl and Bergsagel, 2002). La présence d'une hyper-diploïdie est associée à un pronostic favorable alors que les translocations impliquant le locus IgH sur le chromosome 14 ont des pronostics variables. Parmi celles-ci, la translocation t(4;14) (p16;q32), retrouvée dans 15% des MM, définit l'une des formes de MM actuellement la plus grave (Avet-Loiseau et al., 2009). Malgré le rôle potentiel des oncogènes *FGFR3* et *MMSET* (multiple myeloma SET gene) qu'elle dérégule, les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer la gravité des MM avec t(4;14) ne sont pas clairement élucidés.

Dans ce contexte, j'ai cherché à caractériser les événements moléculaires associés au pronostic des différents sous-groupes de MM t(4;14) en espérant que cette démarche puisse jeter un éclairage nouveau sur la physiopathologie du MM et à terme améliorer la prise en charge des patients.

Première partie : DIFFÉRENTIATION DES LYMPHOCYTES B ET MYÉLOME MULTIPLE.

1.1 La différenciation des cellules B

Les Immunoglobulines (Ig) constituent un ensemble de protéines capables de reconnaître un éventail presque infini d'antigènes (Ag). Elles existent sous forme sécrétée ou membranaire (Pleiman et al., 1994). Les Ig non sécrétées sont exprimées au sein de récepteurs membranaires (BCR « B Cell Receptor ») à la surface des lymphocytes B. Ces derniers ont pour fonction principale d'induire la transduction de signaux d'activation intracellulaire lors de la reconnaissance de l'antigène (Janeway et al., 2005). Les Ig sécrétées (ou anticorps, Ac), comme le BCR, reconnaissent et se fixent spécifiquement sur les Ag natifs, entraînant le recrutement de cellules sanguines et des molécules impliquées dans l'élimination des agents pathogènes. Les mécanismes qui assurent la différenciation des cellules B immunocompétentes sont essentiels pour la mise en place des défenses immunitaires et la production des Ac. Cependant, l'altération de ces processus est associée à diverses hémopathies, en particulier la leucémie aiguë lymphoblastique, les lymphomes ou le myélome multiple.

1.1.1 La différenciation précoce des cellules B

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine des lymphocytes B, T et NK. Elles sont localisées dans le foie fœtal pendant le développement embryonnaire puis dans la moelle osseuse chez l'adulte. Les CSH produisent les cellules lymphoïdes B selon un processus strictement contrôlé qui peut être décomposé en 2 phases: une phase précoce indépendante de l'Ag et une phase tardive dépendante de l'Ag (Ichii et al., 2014). Le premier stade de différenciation est le stade pro-B. La cellule lymphoïde précoce interagit avec les cellules stromales de la MO ce qui permet d'intenses échanges de cytokines et de facteurs de croissance qui entraînent une première phase de prolifération cellulaire. Les cellules pro-B

expriment à leur surface les marqueurs CD10, CD19 et CD34. Le passage au stade suivant s'effectue par l'activation des enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 responsables du réarrangement des chaînes lourdes des Ig (cf infra) (Alt, 2007). Le stade pré-B commence par une phase de prolifération cellulaire et est caractérisé par l'expression membranaire du pré-BCR, constitué d'une chaîne lourde μ réarrangée et d'une chaîne légère invariante de substitution (λ5 et Vpre-B). L'expression du pré-BCR à la surface cellulaire bloque la recombinaison aux loci des chaînes lourdes (exclusion allélique) et active celui des chaînes légères. Le réarrangement fonctionnel des chaînes légères conduit à l'expression d'un BCR (IgM) complet et permet la sélection des clones B immunocompétents (notamment l'élimination des cellules auto réactives), la migration des cellules en périphérie et la poursuite de leur développement (Alt et al., 2013).

1.1.2 L'activation des lymphocytes B et l'engagement de leur différenciation terminale

Il existe trois principaux types de cellules B naïves: les cellules B1, les cellules B de la zone marginale (MZ) et les cellules B folliculaires. Les cellules B1 sont principalement localisées dans les cavités péritonéales/péritonéales et au niveau des muqueuses. Elles fournissent une réponse rapide aux antigènes T-indépendants (TI), tels que les Ag bactériens. Les cellules MZ sont situées dans le sinus marginal de la rate et, chez la souris, possèdent des fonctions similaires aux B1. Les cellules B folliculaires sont impliquées dans la réponse aux antigènes T-dépendants qui nécessite l'aide de cellules T auxiliaires CD4 (Tfh) (Breitfeld, 2000). A la suite d'une activation, une partie de ces lymphocytes B activés migrent vers des foyers extra-folliculaires et se différencient en plasmoblastes de courte durée qui sécrètent des anticorps de faible affinité. Une autre partie des cellules folliculaires B activées retournent dans le follicule B afin de proliférer et de former les centres germinaux (GC). À l'intérieur des GC, les cellules B augmentent l'affinité de leur BCR par le processus d'hyper-mutation somatique (SHM) et par sélection clonale. Enfin, ces cellules peuvent se développer soit en plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle, soit en cellules B mémoires ($CD27^{+}38^{-}44^{+}$) impliquées dans la réponse secondaire. Ces deux types cellulaires contribuent chacun à la mémoire immunologique humorale.

Dans les ganglions lymphatiques, les cellules B naïves folliculaires sont situées dans les follicules qui sont entourées par la zone T (riche en lymphocytes T). Après avoir rencontré l'antigène, les cellules B prolifèrent et migrent vers la frontière de la zone de cellules T où ils forment des interactions avec les Tfh pour devenir pleinement activées. La communication entre les cellules B et Tfh repose sur un ensemble d'interactions récepteurs/ligands, notamment PD-1/PDL1, ICOS-ICOSL ou IL-21/IL21R. Les récepteurs aux chimiokines CXCR5 et CCR7 jouent un rôle majeur dans Les processus de migration (Crotty, 2011; Cyster, 2005). Ainsi, la chimiokine CXCL13 est produite par les cellules stromales dans les follicules et par FDCs dans le GC (Allen and Cyster, 2008). Elle favorise la migration des cellules B et des Tfh, exprimant son récepteur CXCR5, au sein des follicules B et la formation des GC. De plus, l'interaction entre ICOSL exprimé sur les cellules B et son récepteur ICOS sur les Tfh favorise les interactions entre les deux types cellulaires et la formation des GC. Cette interaction stimule l'expression de CD40L sur la surface des cellules Tfh (Shulman et al., 2014). À son tour, l'interaction CD40-CD40L permet la prolifération et la survie des cellules folliculaires B, la formation de GC, et la production d'Ac.

1.1.3 Le développement terminal des cellules B et la transition lympho-plasmocytaire

La différenciation des cellules B en plasmocytes dépendent non seulement de signaux extrinsèques exprimés par l'environnement, mais également de l'engagement d'un programme génétique strictement régulé par un ensemble de facteurs de transcription (Shi et al., 2015). Une fois sélectionnées, les cellules B commencent à changer leur spectre d'expression génique (transcriptome) pour éteindre les gènes B et induire celui des plasmocytes. Ce processus nécessite l'inhibition des facteurs de transcription favorisant le programme des lymphocytes B et l'expression des facteurs de transcription permettant la différenciation des cellules plasmocytaires (Figure 1). La régulation négative du facteur Pax5, spécifique de la lignée B, semble être l'un des événements initiaux dans ce processus (Kallies et al., 2007; Nera et al., 2006). En effet, dans les lymphocytes B, Pax5 réprime l'expression de gènes d'autres lignées (notamment T) tout en favorisant l'expression des gènes codant pour des éléments de la signalisation BCR ,et des facteurs de transcription

tels que BACH2, IRF4 et IRF8 (Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007). Ces derniers, comme BACH2 et IRF8 promeuvent le programme génétique des cellules B en inhibant l'expression de Blimp1 (Ochiai et al., 2006). Le facteur IRF4 agit d'une manière dose dépendante, en favorisant le programme B GC et l'expression de BCL6 à faibles niveaux ou favorisant le développement plasmocytaire par la répression BCL6 et l'induction de Blimp1 et ZBTB20 à des niveaux élevés (Chevrier et al., 2014; Sciammas et al., 2006). BCL6 peut être considéré comme un régulateur clé de la réaction germinative, car il est indispensable à la formation à la fois des cellules B GC et des Tfh. Dans les cellules B des GC, BCL6 inhibe p53 et la réponse aux dommages de l'ADN induits par AID (Activated Induced Cytosin Deaminase) pour permettre la commutation de classe et des SHM (Phan and Dalla-Favera, 2004). Enfin, BCL6 contribue a l'inhibition du programme plasmocytaire directement en régulant négativement l'expression de Blimp1 (Tunyaplin et al., 2004), ou indirectement en induisant BACH2 (Igarashi et al., 2014). PAX5 bloque la différenciation des cellules productrices d'anticorps en inhibant l'expression de XBP-1 (Reimold et al., 1996), un gène impliqué dans la réponse cellulaire aux protéines mal-formées (UPR) et qui est essentiel pour la sécrétion des Ac. Enfin, Blimp1, exprimé dans les cellules B du GC, participe à la régulation positive de la différenciation des plasmocytes en réprimant des régulateurs majeurs des cellules B comme Pax5 et BCL6 (Figure 2).

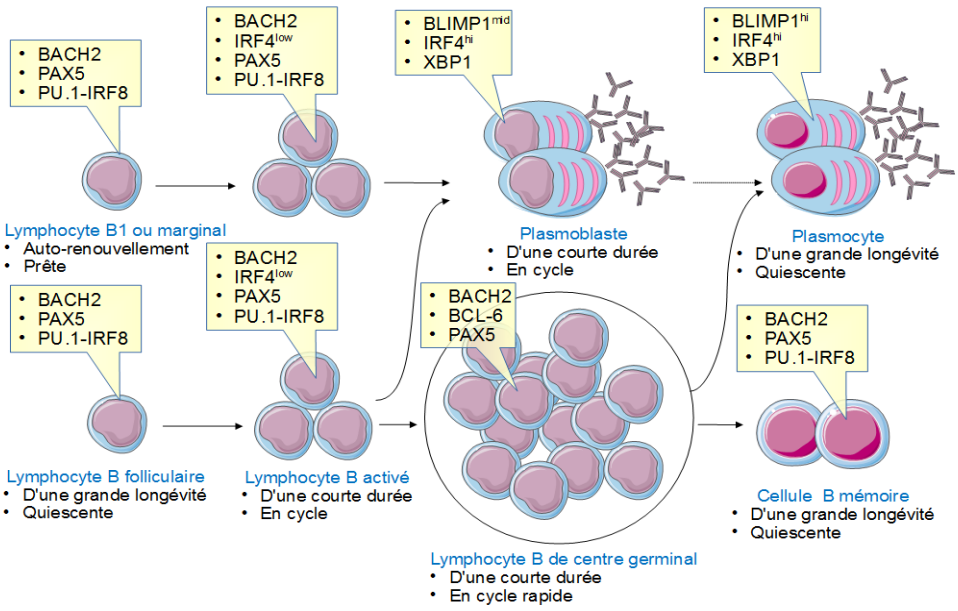


Figure 1: Le développent des lymphocytes B aux plasmocytes (Adapté de Nutt et al., *Nat. Rev. Immunol*. 2015). *BACH2 : BTB Domain And CNC Homolog 2 ; PAX5 : Paired Box 5 ; IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8 ;IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4 ; XBP1 : X-Box Binding Protein 1 ; BLIMP1 : B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 ; BCL6 : B-Cell CLL/Lymphoma 6.*

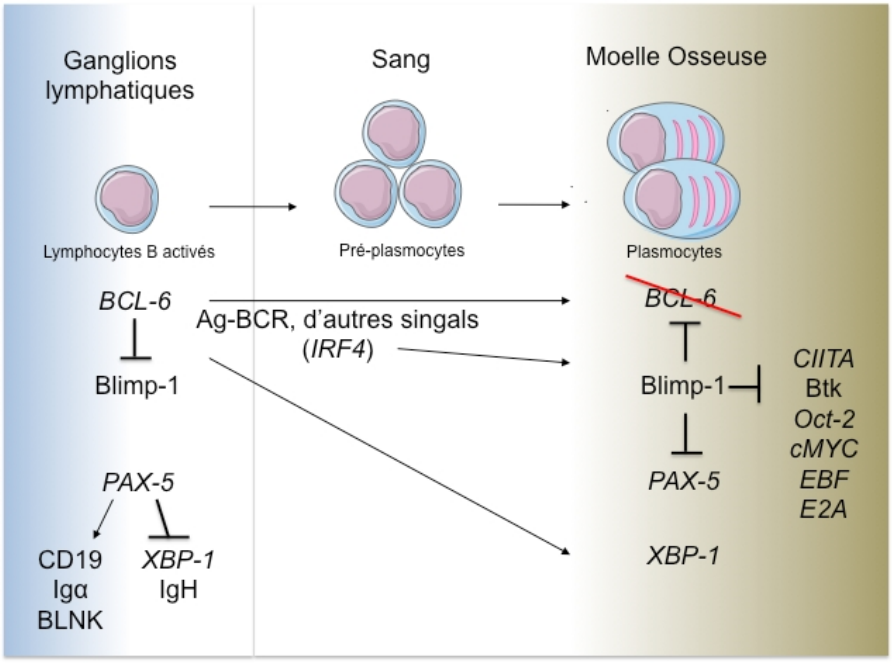


Figure 2: Schéma de l'interaction de facteurs pendant la différentiation terminale en plasmocytes (Adapté de *Lin et al., Immunological Reviews*, 2003). *PAX5 : Paired Box 5 ; IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4 ; XBP1 : X-Box Binding Protein 1 ; BLIMP1 : B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 ; BCL6 : B-Cell CLL/Lymphoma 6 ; BLNK : B-Cell Linker ; CIITA : Class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator ; Btk : Bruton Tyrosine Kinase ; Oct-2 : Octamer Transcription Factor-2 ; EBF1 Early B-Cell Factor.*

1.2 Les réarrangements des gènes des Ig et la commutation de classe

1.2.1 Structure d'une Immunoglobuline

Une Ig est composée de deux chaînes légères (L) dont il existe deux sous types (kappa et lambda) et deux chaînes lourdes (H) dont il existe 9 sous types (μ, δ, γ1,

γ2, γ3, γ4, α1, α2 et ε). Les chaînes légères et lourdes d'une Ig sont identiques deux à deux. Les chaînes L (kappa et lambda) sont formées de deux domaines: un domaine variable (V_L) (Vκ ou Vλ) et un domaine constant (C_L) (Cκ ou Cλ). La chaîne H est constituée d'un domaine N terminal variable (V_H), site de liaison à l'Ag, et de trois ou quatre domaines constants (C_H) (Figure 3). Chaque domaine V_L et V_H possède 3 zones d'hyper-variabilité dites « régions déterminant la complémentarité » (Schroeder Jr. and Cavacini, 2010).

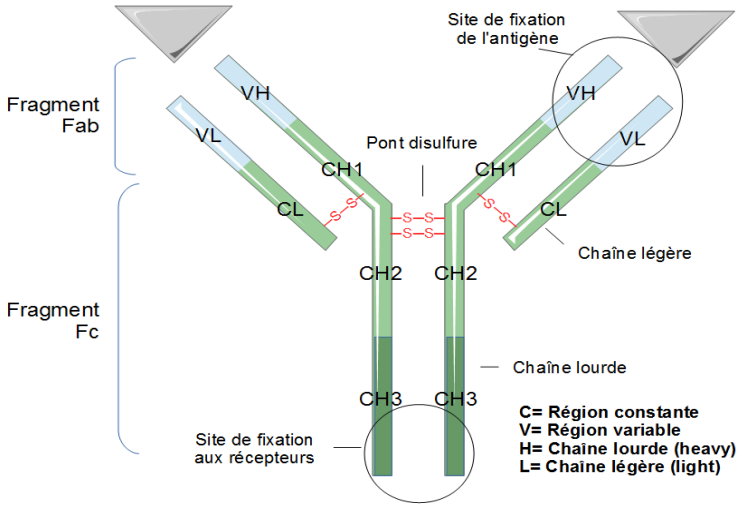


Figure 3: Structure simplifiée d'une Immunoglobuline (Adapté de *Schroeder & Cavacini*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010).

1.2.2 Réarrangement des gènes de Ig

Le développement des lymphocytes B est initié dans la moelle osseuse où sont produites les cellules immunocompétentes exprimant un BCR fonctionnel. La diversité du répertoire des lymphocytes B est issu du processus de recombinaison V(D)J des gènes des Ig et repose sur l'organisation génétique des loci IgH et IgL (Chaudhuri and Alt, 2004; Schatz and Ji, 2011). Chez l'Homme, les gènes codant pour les Ig sont répartis en 3 loci sur des chromosomes séparés. Le locus de la chaîne lourde IGH est situé en 14q32.31, celui de la chaîne légère κ (IGK) est situé en 2p11-12, tandis que celui de la chaîne légère λ (IGL) est situé en 22q11. Les gènes des Ig subissent une succession d'événements de recombinaison durant le développement et la maturation des cellules B (Figure 4).

1.2.3 Diversité des Ig

Le réarrangement des gènes est le mécanisme par lequel les différents segments de la partie variable des Ig sont associés les uns aux autres pour permettre leur expression. Lors du réarrangement des gènes des chaînes lourdes, un gène V_H (au nombre d'une quarantaine chez l'homme) est recombiné avec un gène D (n = 23) *«diversity»* et J (n = 6) *«junction»* donnant naissance à un élément VDJ (Figure 4). La recombinaison de la chaîne légère se passe de manière similaire mais sans segment D: elles subissent donc des réarrangements dits VJ. L'assemblage de ces différents segments constitue la diversité combinatoire (assemblages V et J ou VD et J) à laquelle s'ajoute la diversité jonctionnelle (insertion ou délétion de nucléotides à la jonction des gènes). Les différents assemblages possibles entre chaînes lourdes et légères contribuent aussi à la diversité du répertoire des Ig indépendants de la rencontre avec l'Ag (Janeway et al. 2005).

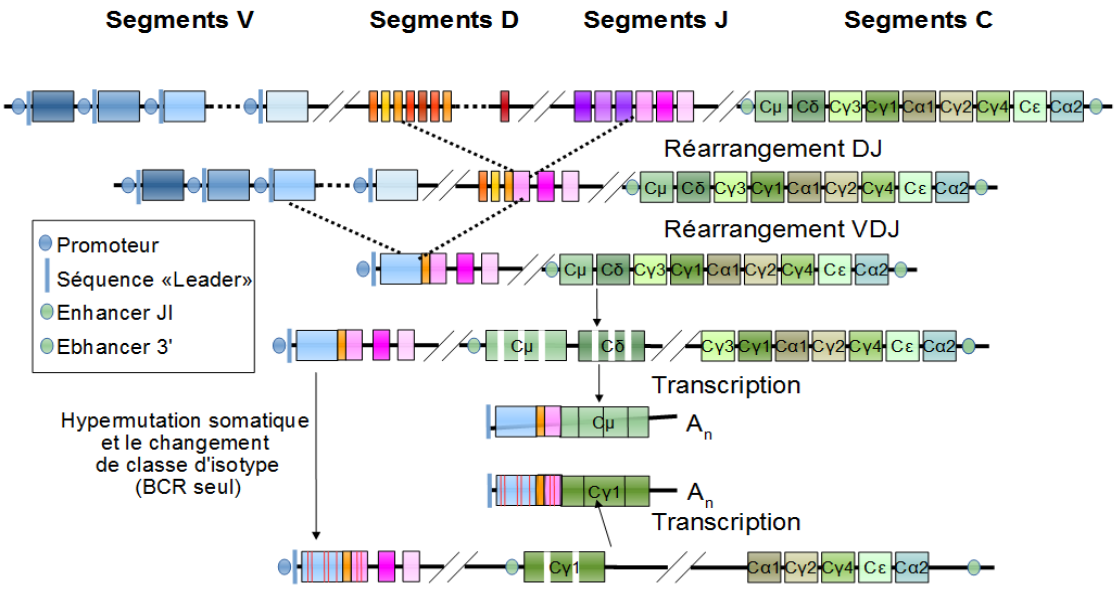


Figure 4 : Schéma simplifié des réarrangement des gènes des Immunoglobulines (Adapté de *Chaudhuri & Alt, Nat. Rev. Immunol*. 2004). *V: gène variable ; D: gènes de diversité ; J: gène de jonction ; C: gène de la partie constante. BCR B Cell Receptor ; TCR T Cell Receptor.*

1.2.4 La commutation de classe des gènes des chaînes lourdes des Ig

Dans le contexte du centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires, les cellules folliculaires B activées s'engagent dans un processus de maturation des immunoglobulines qui fait appel à deux mécanismes génétiques (Figure 5):

- l'hyper-mutation somatique (SHM) qui introduit des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les domaines variables des immunoglobulines pour améliorer leur affinité pour l'antigène.

- la commutation de classe des Ig (CSR) qui permet aux cellules B activées de remplacer la région codant pour le domaine constant Cμ de l'immunoglobuline par un des autres gènes constants Cγ, Cε ou Cα. Cette recombinaison génétique confère aux immunoglobulines des fonctions effectrices différentes tout en préservant les propriétés de reconnaissance de l'Ag.

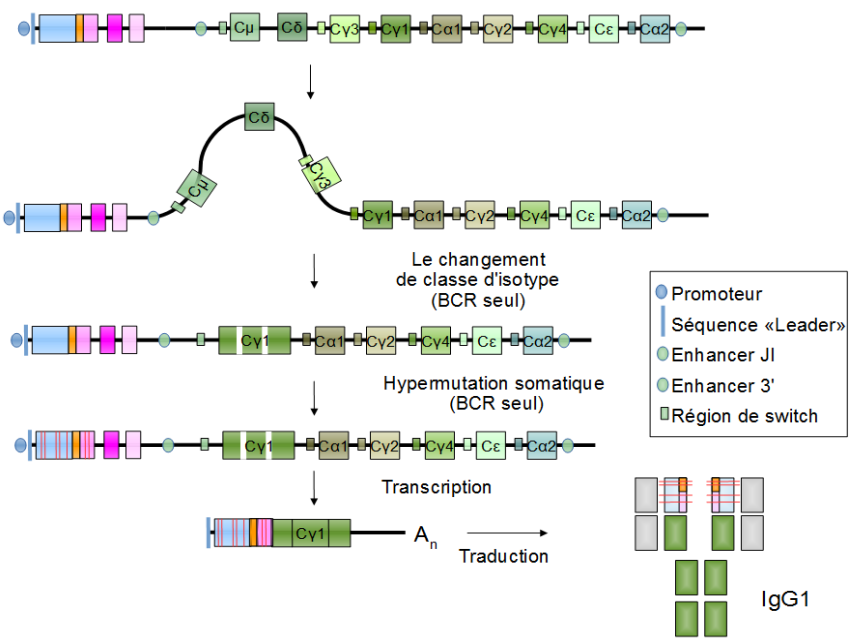


Figure 5 : *Schéma simplifié de la recombinaison des gènes des Immunoglobulines (Adapté de Chaudhuri & Alt, Nat. Rev. Immunol. 2004). gène variable (bleu) ; gènes de diversité (orange) ; gène de jonction (rose) ; C: gène de la partie constante (vert) ; A_n poly(A).*

i. Hypermutations somatiques

L'hypermutation somatique est un processus mutagène important pour l'efficacité de la réponse humorale (Ashman and Davidson, 1987). Il a lieu dans le centre germinatif et permet de diversifier le répertoire des gènes de chaînes lourdes et légères des Ig, en introduisant des mutations ponctuelles, au sein des régions variables de chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Tonegawa, 1983). Il intervient directement dans la maturation de l'affinité des récepteurs BCR lors d'une réponse aux antigènes de type T-dépendant. Le processus de SHM est également important pour la différenciation des lymphocytes B mémoires qui assure la réponse anticorps secondaire. La fréquence de mutation est de 10^{-4} à 10^{-3} par base et par génération cellulaire, ce qui est un million de fois plus fréquent que le taux de mutations spontanées observées dans le génome (Honjo et al., 2004). Les SHM se produisent sur la totalité des exons codants pour les régions variables et se concentrent sur des motifs RGYW (où R = purine, Y = pyrimidine, et W = A ou T nucléotide). L'hypermutation est induite par l'activité de l'enzyme AID, dont l'activité sera développée au chapitre suivant, et nécessite la transcription des segments V. Le processus mutagène débute environ 100-200 paires de base après le promoteur des gènes V et se poursuit sur une distance de 1,5 à 2 kb en aval. Notons ici que les SHM peuvent affecter d'autres gènes que les Ig et est un processus de mutagenèse impliqué dans la progression des hémopathies malignes chez l'Homme et la souris (Klein and Dalla-Favera, 2008).

ii. La commutation de classe des gènes IgH.

La commutation de classe procède en 4 grandes étapes successives: 1) la transcription germinale des régions associées S (switch) et C, 2) la création de sites de mésappariement au niveau des régions S grâce aux activités de la protéine AID (Activated Induced Cytosin Deaminase), 3) la génération des cassures doubles brins et 4) la réparation des cassures doubles brin par la recombinaison. Ces étapes ont été particulièrement bien disséquées chez la souris grâce à l'analyse d'animaux KO, mais les conclusions sont en grande majorité transposables chez l'homme.

1) Transcription germinale des régions S et C

La commutation de classe est précédée par l'expression des régions S et C ciblées au cours de l'activation des cellules B. Cette transcription, dite germinale, est initiée à partir d'un promoteur I qui génère un ARN contenant un premier exon non codant, lui-même est épissé sur le gène constant associé. L'importance de la génération des transcrits dans la commutation isotypique a été démontrée chez la souris par des approches de délétion des promoteurs germinaux. Ainsi, la délétion ou le remplacement du promoteur ou de l'exon I des gènes γ2b et γ1 entraîne l'abolition de la commutation de classe vers ces isotypes (Jung et al., 1993; Lorenz et al., 1995). Les transcrits germinaux interviennent dans la commutation de classe en permettant le changement de la structure de chromatine et en rendant la région S accessible à l'enzyme AID. De manière intéressante, chaque région S possède une structure et une composition nucléotidique telles que, quand une région S est transcrite *in vitro* ou *in vivo*, dans son orientation physiologique, l'ARN naissant va s'hybrider avec le brin d'ADN matrice et laisse le brin non transcrit sous forme l'ADN simple brin (Daniels and Lieber, 1995; Imai et al., 2004; Ramiro et al., 2003; Reaban and Griffin, 1990). Le brin d'ADN non transcrit se retrouve alors sous forme simple brin et peut former une structure appelée boucle R qui sert de substrat à l'activité désaminase de AID (Dickerson et al., 2003; Yu et al., 2003). L'importance d'une part de la région S et d'autre part de la formation de la boucle R pour le CSR ont été génétiquement démontrées *in vitro* (Shinkura et al., 2003).

2) Création de sites de mésappariement au niveau des régions S et activités de la protéine AID.

L'élément essentiel de la réaction de switch est la protéine AID. Cette protéine a été initialement caractérisée par criblage d'une librairie soustractive dans la lignée CH12-F3 capable de réaliser le CSR *in vitro* (Muramatsu et al., 1999). Elle a été parallèlement identifiée chez l'homme dans les patients atteints de syndrome hyper IgM (Revy et al., 2000). AID est exprimé presque exclusivement dans les cellules activées et son activité est nécessaire pour la commutation de classe chez l'homme et la souris (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Cette protéine de 24kd présente une homologie avec APOBEC-1 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme), une protéine capable d'introduire des mutations sur l'ARN. Cette similitude a suggéré que AID pouvait agir comme une « RNA editing » (Fritz et al., 2013). Bien qu'une

telle activité n'ait pas été écartée, le modèle couramment admis est que AID Lorem fonctionne comme une DNA Déaminase qui catalyse la déamination des cytosines sur des substrats d'ADN simple brin (Stavnezer et al., 2008). Ainsi, à la suite de l'activation des cellules B et de la transcription des régions S-C, AID catalyse la désamination d'un résidu dC en dU (déoxyuridine) induisant un mésappariement sur l'ADN. Ce type de lésion est corrigé par la voie de réparation par excision de base (BER) ou la voie de réparation des mésappariements (MMR - Mismatch Machinery Repair). Ces deux mécanismes vont participer à la création et à la prise en charge des lésions d'ADN qui contribuent à la recombinaison.

3) Génération des cassures doubles brins

Les cassures doubles brins initiées par AID au niveau des régions S sont majoritairement générées par le mécanisme de UNG (Uracil DNA Glycosylase) (Petersen-Mahrt et al., 2002; Rada et al., 2002). Les résidus déoxyuridines produits par AID sont reconnus par des enzymes UNG, qui génèrent un site abasique sur les deux brins d'ADN des régions S. Ces sites abasiques sont alors clivés par l'endonucléase APE1 afin de produire des cassures simples brins, puis doubles brins sur l'ADN des régions S. Ainsi, les souris invalidées pour les composés de la voir UNG présentent un défaut profond de la commutation de classe (Rada et al., 2002). Le mécanisme MMR peut également générer des cassures doubles brins à partir des résidus déoxyuridines générées par l'activité de AID. Les mésappariements dC/dU/dG sont reconnus par le complexe MutS (MSH2-MSH6) qui cible leur excision grâce aux facteurs MutL et EXO1. L'activité de ces derniers produit des cassures d'ADN sur les deux brins des régions S (Genschel et al., 2002; Genschel and Modrich, 2003; Martomo et al., 2004). Ce mécanisme a été validé *in vivo* et les souris invalidées pour MSH2, MSH6 ou EXO1 affichent des taux réduits de commutation isotypique (Martin et al., 2003; Martomo et al., 2004; Schrader et al., 1999).

4) Réparation des cassures doubles brin par la recombinaison.

Les cassures d'ADN initiées par l'action d'AID induisent l'activation de la machinerie de réparation de l'ADN qui est relayée par des phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase telles que ATM, ATR et DNA-Pk (Pan-Hammarstrom et al., 2006). Une

fois activée, ATM phosphoryle les histones H2AX sur la serine-139 (γ-H2AX) qui marquent les points de cassure et recrutent d'autres facteurs (Rogakou et al., 1998). Parmi ces derniers, MDC1 reconnaît γ-H2AX et coopère avec ATM pour propager sa phosphorylation sur des distances équivalent à plusieurs méga bases (Lou et al., 2006). De plus, l'association de MDC1 avec l'ubiquitine ligase RNF8 semble être à l'origine d'une cascade d'ubiquitinilation des γ-H2AX qui permet le recrutement de la protéine 53BP1 sur les lésions de l'ADN (Doil et al., 2009). Le recrutement de ces protéines aux sites de cassures facilite la juxtaposition des extrémités cassées de l'ADN et leur réparation par les protéines de la voie de réparation. Il est possible que certains facteurs comme 53BP1 puissent favoriser la synapse des régions distantes en modifiant la chromatine autour des cassures de l'ADN. Dans le cas de 53BP1, cela pourrait impliquer sa liaison à la H3K79me (Huyen et al., 2004) et son interaction avec γ-H2AX (Rodrigue et al., 2006). Enfin, la réparation des DSBs fait intervenir la machinerie NHEJ (Non Homologous End Joining) et en particulier les protéines DNA-PKcs, Ku70 et Ku80. Ainsi, l'invalidation de certaines protéines de la voie NHEJ, comme Ku70 et Ku80, provoque un défaut de commutation de classe (Casellas et al., 1998; Manis et al., 1998). D'autre part, l'implication d'une voie alternative de jonction des brins d'ADN (A-EJ dans la littérature) est suggérée par le fait que l'inactivation d'autres facteurs du NHEJ tels que XRCC4 ou ligase4 n'impacte pas le CSR (Boboila et al.; Soulas-Sprauel et al., 2007; Yan et al., 2007). En revanche, l'intégrité de cette voie de réparation est essentielle pour garantir la stabilité du génome et prévenir la survenue de translocations chromosomiques induites par l'activité de AID (Alt et al., 2013).

1.3 Le myélome multiple

1.3.1 Épidémiologie

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne dont l'incidence est de 4000 nouveaux cas par en France (Avet-Loiseau et al., 2007a). C'est la deuxième hémopathie en nombre après les lymphocytes non-hodgkiniens et il représente 1% des cancers et 10 % de tous les cancers hématologiques. L'âge moyen du diagnostic est de 70 ans pour les hommes et 74 pour les femmes (Rajkumar et al., 2014).

Malgré l'apparition de nouveaux traitements, le MM reste aujourd'hui une maladie incurable avec une survie moyenne de 6 ans.

1.3.2 Les signes cliniques du MM

Le MM est caractérisé par une prolifération monoclonale maligne dans la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux produisant une Ig monoclonale. Les premiers signes cliniques sont divers et leur combinaison au diagnostic varie d'un patient à l'autre (Durie and Salmon, 1975; Rajkumar et al., 2014). L'accumulation de plasmocytes tumoraux sécrétant en excès une Ig monoclonale entraîne un dysfonctionnement de la moelle osseuse aux conséquences nombreuses comprenant une cytopénie, une anémie et une thrombopénie. L'infiltration médullaire peut induire secondairement une réduction des fonctions immunitaires, caractérisées par des niveaux réduits d'immunoglobulines normales et une susceptibilité accrue aux infections. L'envahissement osseux est responsable d'une fragilisation des os due à une déminéralisation libérant le calcium (augmentation de son taux sérique) et une activation des ostéoclastes. Les douleurs osseuses sont présentes au diagnostic chez 70% des maladies et les lésions ostéolytiques sont situées au niveau du squelette axial (crâne, rachis, basin, côtes, fémur et humérus). Ainsi, les os les plus fréquemment touchés sont les os plats, lieu de l'hématopoïèse adulte. Le risque de fracture spontanée et de la compression médullaire sont des facteurs de complication ostéolytique. L'hypercalcémie est à l'origine de douleurs abdominales, nausées, vomissements, confusion et troubles cardiaques. Enfin, la sécrétion de quantités importantes d'Ig monoclonale peut induire la précipitation des chaînes légères et la formation de dépôts au niveau du rein entraînant une insuffisance rénale. Une grande fatigue accompagne les différents signes cliniques.

1.3.3 Le diagnostic du MM

Le diagnostic du MM repose sur la détection d'une Ig monoclonale dans le sérum et la mise en évidence d'une infiltration médullaire par des plasmocytes tumoraux.

L'analyse de protéines présentes dans le sang est réalisée par une électrophorèse. Un pic y est détecté (défini par l'apparition d'une bande à l'électrophorèse),

traduisant la présence de l'Ig monoclonale dont la quantité varie d'un patient à l'autre. Des analyses complémentaires (Immuno-fixation) permettent de préciser la clonalité et la nature l'Ig. Le myélogramme met en évidence l'infiltration médullaire par des plasmocytes dystrophiques et permet de rechercher des anomalies cytogénétiques ayant un retentissement sur le pronostic.

L'établissement du diagnostic du MM repose sur un ensemble de symptômes répertoriés dans plusieurs classifications: la classification de Salmon et Durie de 1975, l'ISS (Inter Study System) et le CRAB (hypercalcémie, atteintes rénales, anémie et atteints osseuses) (Durie and Salmon, 1975). Ces différentes classifications sont basées sur des facteurs biologiques, reflètent le caractère hétérogène de la maladie et des pronostics différents.

1.3.4 Les traitements du MM

Le MM est une maladie hétérogène dont le traitement dépend à la fois du stade de la maladie et du patient dans sa globalité. Une rémission complète est définie par une normalisation cytologique de la moelle ainsi que la disparition de l'immunoglobuline monoclonale circulante (Dispenzieri et al., 2001). En fonction de l'âge du patient, deux schémas de traitements ont été établis. Les patients d'âge inférieur à 65-70 ans vont être conditionnés pour recevoir une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques suivie d'un traitement de maintenance tandis que les patients de plus de 70 ans vont avoir une cure de chimiothérapie suivie d'une phase de maintenance (Kaufman and Lonial, 2004; Palumbo et al., 2014; Rajkumar et al., 2014).

1) Patients éligible à l'autogreffe (moins de 65 ans).

Le schéma du traitement des patients éligibles à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques se compose de plusieurs étapes. Il comprend une phase d'induction, associant un corticoïde, un alkylant (melphalan) et/ou du thalidomide (IMiD) et du bortezomib (Velcade). Si le traitement initial n'est pas suivi d'intensification avec autogreffe, il peut être suivi d'une thérapie de maintenance

avec le thalidomide ou d'un traitement d'entretien avec le même protocole. À la suite du traitement d'induction, les cellules souches hématopoïétiques périphériques sont recueillies. Pour cela, les patients reçoivent des cures de facteurs de croissances, les cellules souches sont recueillies lors de séances de cytaphérèses et conservées. Avant la réinjection des cellules souches, le patient reçoit une cure de chimiothérapie intensive (melphalan) de mise en aplasie. Les cellules souches hématopoïétiques sont réinjectées par voie intra-veineuse. Ce traitement entraîne une augmentation du nombre de rémissions complètes cependant il expose les patients à une phase d'aplasie médullaire, des risques infectieux élevés et une nécessité transfusionnelle. Ce protocole peut être trop lourd pour des patients fragiles. Pour augmenter le taux de réponse et tenter de prolonger la rémission, un traitement de consolidation puis d'entretien post-greffe peut être proposé (Harousseau et al., 2010; Moreau et al., 2016; San Miguel et al., 2008).

2) Patients âgés de plus de 65 ans.

La base du traitement de première ligne des patients de plus de 65 ans est une chimiothérapie comprenant du melphalan (alkeran) et des corticoïdes (prednisone) associés au IMiDs (thalidomide, levalidomide) ou au bortezomib (Rajkumar et al., 2014).

Bien que la survie des patients atteints de myélome se soit nettement améliorée, la plupart finissent par rechuter et le traitement à ce stade peut être particulièrement complexe. Beaucoup de nouvelles options sont actuellement disponibles pour leur traitement, y compris les médicaments approuvés depuis plusieurs années (tels que les inhibiteurs du protéasome de deuxième et de troisième génération, carfilzomib et ixazomib, et le pomalidomide comme l'immunomodulateur IMiDs). D'autres stratégies thérapeutiques sont actuellement testées, en particulier des anticorps monoclonaux, tels que le daratumumab (anti-CD38) qui semblent donner des résultats intéressants. Cet arsenal thérapeutique a permis des améliorations notables de la survie des malades, cependant, la réponse aux traitements reste très hétérogène et dépend largement des caractéristiques clinico-biologiques.

1.4 La Biologie du MM

1.4.1 Origine de la cellule myélomateuse

Le myélome peut se définir comme une maladie dans laquelle on retrouve de plasmocytes tumoraux sécrétant une Ig monoclonale. Les études génétiques et moléculaires ont par la suite mis en évidence la présence chez de nombreux malades d'altérations génétiques issues d'altérations du switch ou des hypermutations somatiques des gènes Ig. Ces observations indiquent que la cellule tumorale dérive d'une cellule B post-germinative. Cependant, 21% de t (11; 14) et 25% de t (14; 20) sont générés par des mécanismes de gène activés par la recombinaison DH-JH, indiquant qu'ils se produisent au niveau des cellules pro-B dans le développement des lymphocytes B (Walker et al., 2013). Les anomalies génétiques primitives (hyper-diploïdie ou translocation des régions 14q) semblent engendrer une instabilité génétique pouvant générer des anomalies secondaires associées à des chimio-résistances (Bergsagel and Kuehl, 2001; Morgan et al., 2012). Ces anomalies génétiques sont à l'origine de la grande hétérogénéité clinico-biologique du MM (Morgan et al., 2012)(Figure 6) .

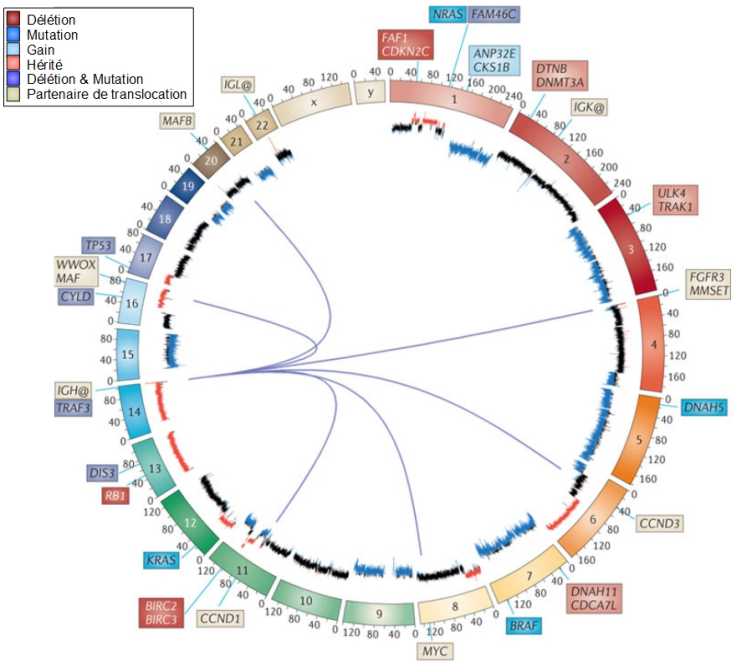


Figure 6: Schéma des principales altérations génétiques dans le myélome multiple (*Morgan et al., Nat. Rev. Cancer*, 2012). *Les translocations sont représentées par des traits bleus reliant les partenaires chromosomiques, les pertes (en rouge) et les gains (en bleu) chromosomiques sont indiqués dans le circos plot. Les gènes impliqués sont représentés.*

1.4.2 Oncogenèse du MM

Le MM est un modèle d'oncogenèse par étapes dont la progression est caractérisée par la survenue de mutations génétiques. C'est une maladie évolutive dont le premier stade est asymptomatique.

i. Gammapathie monoclonale de signification non déterminée (MGUS) et MM indolent (SMM)

Le MGUS ou «gammapathie monoclonale de signification non déterminée», est une maladie hématologique asymptomatique dont l'incidence augmente avec l'âge (Bladé, 2006). Il se définit par la présence d'un pic monoclonal ($\leq$ à 30 g/L), d'un taux d'hémoglobine $\geq$ 10g/dl, un taux de calcium $\leq$ 3 mmol/l et un excès de plasmocytes médullaires $\leq$ 10%. C'est un état stable à partir duquel 1% des malades évolue en MM chaque année (Kyle et al., 1999). En effet les mêmes anomalies cytogénétiques sont retrouvées dans les myélomes et les MGUS. 50% des patients atteints de MGUS présentent une hyper-diploïdie et les translocations dans les gènes des IgH sont fréquemment retrouvées (cf infra) (Landgren et al., 2009). Le myélome multiple indolent (SMM) se distingue du MGUS par un envahissement médullaire plus important de plasmocytes tumoraux (>10%) (Davies et al., 2003). Les études moléculaires récentes montrent que certaines anomalies génétiques sont plus fréquentes chez les patients symptomatiques (cf infra) (Davies et al., 2003; Zingone and Kuehl, 2011).

ii. De MGUS/SMM à MM

L'évolution vers le stade du myélome symptomatique est caractérisée par une augmentation du pic monoclonal et se compose de deux phases distinctes. La phase précoce (stade I de la classification de Salmon et Durie) correspond aux stades MGUS ou SMM. La phase tardive (stade II et III de la classification de Salmon et Durie) est en revanche symptomatique. (Kuehl and Bergsagel, 2002; Landgren and Kyle, 2009). L'évolution vers une maladie symptomatique est favorisée par les signaux délivrés par le micro-environnement médullaire dont le plasmocyte est dépendant pour sa survie. Au fil des accumulations des événements génétiques, les plasmocytes deviennent de moins en moins dépendants du stroma pour leur survie

et croissance, comme les mutations de la voie RAS ou la perte des suppresseurs tumoraux (Figure 7). La phase ultime de cette évolution est la leucémie à plasmocyte qui ne nécessite plus l'environnement de la moelle.

Les analyses immune-phénotypiques peuvent contribuer à distinguer les plasmocytes de MGUS, ou SMM ($CD138^{+}CD19^{low}CD45^{+}CD56^{-}$) des cellules de MM, qui sont $CD138^{+}$, mais peuvent présenter des phénotypes particuliers: $CD19^{-}$, $CD45^{-}$ et $CD56^{+}$ (Ocqueteau et al., 1998; Olteanu et al., 2008).

Avec le développement des outils d'analyse de l'expression des gènes à haut débit (transcriptome), la progression du MM a pu être caractérisée à l'échelle moléculaire. Une première étude, réalisée sur 7 lignées myélomateuses ainsi que les plasmocytes de 74 patients au diagnostic, 5 MGUS et 31 donneurs sains a permis l'identification de 4 sous-groupes par regroupement non supervisé (non supervised hierarchical clustering). Cette approche a établi la similitude transcriptionnelle entre les groupes MM1, les MGUS et les plasmocytes normaux. Inversement, le groupe MM4 présente un profil d'expression proche de celui des lignées cellulaires. D'autre part, un ensemble de 120 gènes, impliqués dans divers processus biologiques comme l'adhésion, l'apoptose ou le cycle cellulaire ont été identifiés dont l'expression semble caractériser les plasmocytes tumoraux, y compris *SDF1*, *TNFRSF7*, *S100A9*, *ITGA2B*, *CDKN1A*, *ABL1*, *USF2*, *USP4*, *MLLT3* et *MYC*. (Zhan et al., 2002).

A partir de ces données séminales, le transcriptome a été utilisé pour définir le pronostic des patients inclus dans deux protocoles thérapeutiques américains (UARK 98-026 et UARK 03-033) associant le melphalan et l'autogreffe. Cette étude a révélé l'implication de 70 gènes, dont environ 30% sont localisés sur le chromosome 1, dans la mort précoce des malades. L'analyse a également révélé qu'un sous-ensemble de 17 gènes (parmi ces 70), pouvait permettre de prédire l'évolution des patients et constitueraient un outils pronostique intéressant, comme *KIF14*, *SLC19A1*, *CKS1B*, *YWHAZ*, *MPHOSPH1*, *TMPO*, *NADK*, *LARS2*, *TBG4*, *AIM2*, *ASPM*, *AHCYL1*, *CTBS*, *MCLC* et *LTBP1* (Shaughnessy et al., 2007). En conclusion, malgré les données intéressantes générées par ces travaux, ils n'ont pas permis de définir les gènes impliqués dans la progression tumorale du plasmocyte et ces techniques ne sont pas utilisées en routine à des fins pronostiques ou diagnostiques.

1.4.3 Classification selon les anomalies génétiques

Le développement des techniques d'analyses génétique, en particulier CGH (Compare Genomic Hybride) et FISH (Hybridation fluorescente) ont permis de mettre en évidence la présence d'anomalies chromosomiques diverses dans les plasmocytes tumoraux des patients (Munshi et al., 2011). Les anomalies primitives sont présentes dès les phases précoces de la maladie et sont de nature différente comprenant: des translocations impliquant les gènes IgH sur le chromosome 14, l'hyper-diploïdie, la délétion du chromosome 13 et la translocation du chromosome 11 (Figure 7) (Bergsagel et al., 2013; Korde et al., 2011). Schématiquement, l'hyper-diploïdie est associée à un bon pronostic alors que les translocations chromosomiques affectant les IgH indiquent plutôt un pronostic péjoratif.

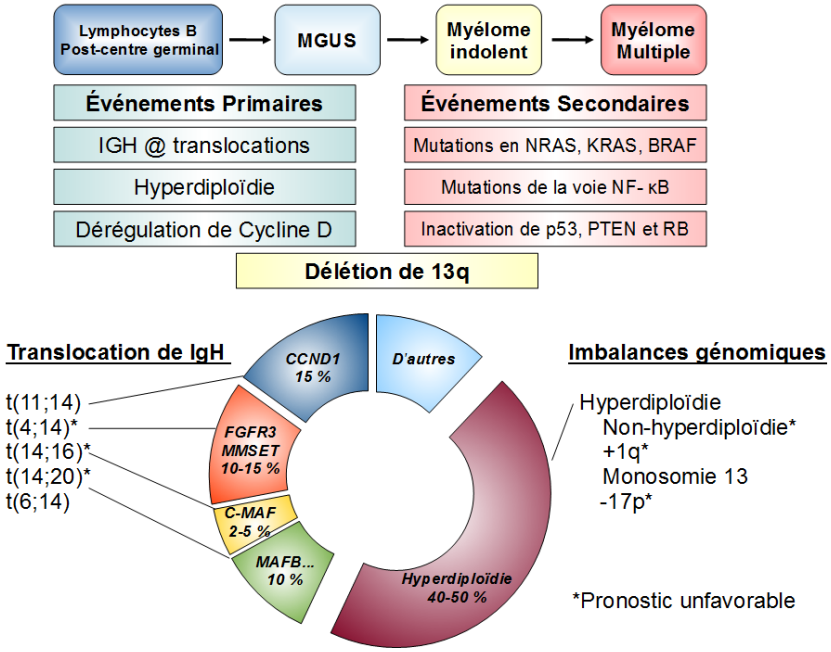


Figure 7 : Schéma des événements génétiques associés à l'évolution du myélome multiple (Adapté de *Korde et al., Blood*, 2011 & *Bergsagel et al., Blood*, 2013). *MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undertermined Signidicance ; IGH: Immunogloulin Heavy Chain ; NRAS: Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog ; KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; BRAF: B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase ; NFκB: Nuclear Factor Kappa B ; PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog ; RB: Retinoblastoma 1 ; CCND1: Cyclin D1 ; FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3 ; MMSET: Multiple Myeloma SET Domain-Containing Protein ; MAF: V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog.*

i. L'hyper-diploïdie

L'hyper-diploïdie, dont la physiopathologie est inconnue, représente la seconde anomalie en termes de fréquence (environ 50% des malades). Elle est responsable de l'amplification des chromosomes impairs et est associée à un pronostic plus favorable que la présence de réarrangements en 14q (Smadja et al., 2001; Avril et al., 2010).

ii. Les principales délétions chromosomiques

1) La délétion du bras long du chromosome 13

Les délétions (del) chromosomiques sont composées de 50% de monosomies (perte de la totalité du chromosome). La del(13) est la troisième anomalie en fréquence. Dans 71% des cas, elle est associée à une autre anomalie génétique ce qui indique un mauvais pronostic (Fonseca et al., 2001). En effet, 84% des patients ayant une translocation t(4;14) ont une délétion 13 associée tandis qu'elle est peu retrouvée en association avec l'hyper-diploïdie. Lorsque la del(13) est isolée, elle n'influence pas le pronostic. Le gène (ou les gènes) ciblé par délétion du chromosome 13 n'est pas identifié, bien qu'une perte de *RB1* ait été suggérée (Carlebach et al., 2000).

2) La délétion du bras court du chromosome 17

Cette anomalie est une des plus importantes car elle est responsable de la perte du gène *TP53* chez 5 à 10% des malades. *TP53* est un gène suppresseur de tumeur et la del(17) est associée à un mauvais pronostic avec une médiane de survie d'un an et demi (Avet-Loiseau et al., 2007b). Le gène codant pour la phosphoprotéine p53 est muté dans environ 50% des cancers humains. Sa fonction principale est de contrôler la réponse cellulaire aux dommages causée sur l'ADN. Le facteur de transcription p53 peut entraîner soit l'arrêt du cycle cellulaire, soit induire l'apoptose en réponse au stress, e.g. UV ou virus (Carlebach et al., 2000).

iii. Les activations de MYC

Dans le MM, les translocations impliquant *MYC* font partie des anomalies chromosomiques les plus courantes. Une étude récente montre que ce type d'altération affecte environ 50% des patients et est associé à un pronostic défavorable (Mitchell et al., 2016). De plus, la dérégulation de MYC peut être occasionnée par des amplifications géniques qui, lorsque elles sont prises en compte, révèlent une altération de cet oncogène dans 55% des patients. Chez certains patients, les translocations impliquant le gène *MYC* n'impliquent pas toujours un partenaire Ig et pourraient survenir par une activité anormale de protéines AID.

iv. Les translocations impliquant le locus des chaînes lourdes des Ig (14q13)

Les translocations primitives dans le locus IgH présentent généralement les caractéristiques suivantes (Gabrea et al., 2006):

- Elles sont présentes dans tous les plasmocytes tumoraux.
- Ce sont les translocations réciproques simples, bien que parfois, un chromosome dérivé soit perdu.
- Les points de cassure se produisent principalement à proximité ou à l'intérieur des régions switch des IgH (et moins souvent à proximité ou à l'intérieur des régions JH).
- Les partenaires oncogènes peuvent être dérégulés, même à de très grandes distances des enhancers IgH.

Huit oncogènes sont impliqués d'une façon récurrente dans les translocations primitives impliquant les IgH (Bergsagel and Kuehl, 2001):
Les CYCLIN D: 11q13 (***CCND1***), 15%; 12p13 (***CCND2***) <1%; 6p21 (***CCND3***) 2%.
Les gènes MAF: 16q23 (***MAF***), 5%; 21q12 (***MAFB***), 2%; 8q24.3 (***MAFA***), <1%.
Les gènes MMSET et FGFR3: 4p16 (***MMSET*** et ***FGFR3***), 15%.

Notons que, dans ce cas, le der(14) contenant FGFR3 est perdu dans 20% des patients.

-La translocation t(11;14)

La translocation t(11;14) (q13;q32), retrouvée dans 20% des MM, est caractérisée par une surexpression de la cycline D1 (due à la dérégulation du gène *CCND1*) impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (transition phase G1/S) (Chesi and Bergsagel, 1996). Elle représente un groupe homogène de patients avec un faible taux d'Ig, peu prolifératif et n'influence pas le pronostic. Cette translocation est une entité clinico-biologique associée à des pathologies particulières comme les désordres des chaînes λ et les lymphomes de manteaux.

-Les translocations t(14;16) et t(14;20)

Les translocations t(14;16)(q32;q23) et t(14;20)(q32;q11) induisent respectivement la dérégulation des protéines c-Maf et MafB (Chesi et al., 1998a). Les gènes *MAF* jouent un rôle majeur dans la différenciation plasmocytaire. Ces translocations sont associées à une signature somatique caractéristique et à la dérégulation des gènes de la famille APOBEC, dont l'un des membres (AID) joue un rôle essentiel dans la recombinaison de commutation de classe. Ces translocations sont rares, elles sont associées un mauvais pronostic (Sonneveld et al., 2016; Walker et al., 2015a).

-La translocation t(4;14)

La translocation t(4;14) (p16.3;q32.3) est présente dans environ 15 % des MM et conduit à une forme particulièrement agressive de MM, d'évolution très rapide et résistante aux chimiothérapies conventionnelles (Hebraud et al., 2015). Cela lui confère un pronostic péjoratif avec une survie médiane de 2,5 ans (Avet-Loiseau et al., 2013). Au cours de cette translocation, deux oncogènes potentiels sont dérégulés: le Multiple Myeloma Set Gene (*MMSET*) et le 3ème récepteur du Fibroblast Growth Factor (*FGFR3*) (Chesi et al., 1998b). Les points de cassures sur le chromosome 14 ont lieu dans la région switch des IgH et entraînent la dissociation de l' enhancer intronique Eμ (associé au promoteur fort Iμ) et des enhancers 3' E1 et 2. Sur le chromosome 4, les points de cassures surviennent au niveau télomérique

sur la région de 110 kb située entre le gène FGFR3 et l'exon 5 du gène *MMSET* et sont regroupés en trois régions principales MB4-1, MB4-2 et MB4-3 (Keats et al., 2005)(Figure 8). La juxtaposition de ces gènes à aux éléments de régulation (Iμ-Eμ et 3'Eα) des Ig induit leur dérégulation. Ainsi, l'expression du *FGFR3*, sur le dérivé der(14), est sous la dépendance de Eα et celle de *MMSET* sur le der(4) est contrôlée par Iμ-Eμ. La conséquence de ces remaniements est une surexpression du *FGFR3* (chez 70% des malades) et la production d'un transcrit de fusion IgH/MMSET dans les plasmocytes porteurs de la translocation t(4;14). Notons ici que les 3 points de cassures issus de la t(4 ;14) génèrent différentes protéines MMSET dont la fonction peut potentiellement varier.

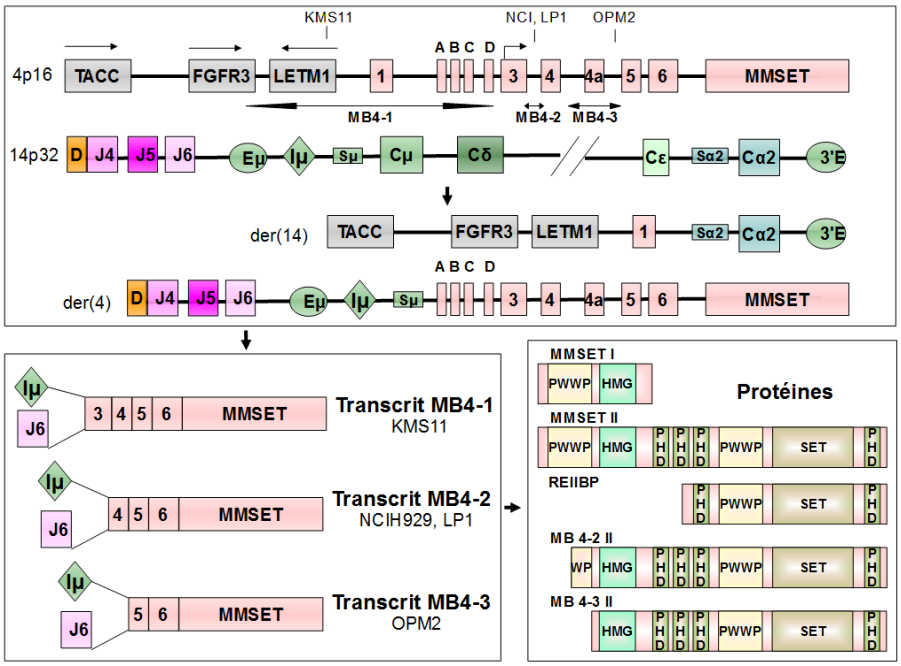


Figure 8 : Représentation de la translocation t(4;14). La figure montre le gène de fusion IgH/MMSET avec les 3 principaux points de cassures et différentes isoformes de MMSET (Adapté de *Keats et al., Blood*, 2003 et *Brito et al., Haematoligica*, 2009). *TACC: Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein ; FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3 ; LETM1: Leucine Zipper And EF-Hand Containing Transmembrane Protein 1 ; MMSET: Multiple Myeloma SET Domain-Containing Protein ; PWWP: conserved Pro-Trp-Trp-Pro motif ; HMG: High Mobility Group ; SET: SET domain ; PHD Plant Homeodomain; D: gènes de diversité ; J: gène de jonction ; Eμ: enhancers de chaine lourde ; Sμ : Region de switch de chaine lourde ; C: gène de la partie constante.*

1) Le FGFR3

FGFR3 est l'un des quatre membres de la famille des récepteurs au FGF. C'est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase (RTK) qui est impliqué dans les voies de signalisation intracellulaires. Elle est exprimée de manière constitutive dans de nombreux tissus dont les reins, les poumons et la peau chez l'adulte et très largement au cours de l'embryogenèse (Wu, 2005). Cependant, FGFR3 n'est présent ni à la surface les cellules hématopoïétique ni sur les plasmocytes normaux. Il régule de nombreux processus cellulaires essentiels tels que la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et l'arrêt de croissance (Figure 9).

Le FGFR3 est composé d'une partie extracellulaire fixant le ligand (contenant 3 domaines Ig-like), une partie transmembranaire et une partie intracellulaire (domaine à activité tyrosine-kinase). Le récepteur activé, par liaison avec le ligand FGF, se dimérise. Sous forme homodimérique le RTK se phosphoryle sur ses sous-unités (sur les résidus kinase) par modifications conformationnelles ce qui augmente l'activité enzymatique du récepteur. Les tyrosines phosphorylées entraînent le recrutement de molécules adaptatrices comme Grb-2 et SH2-B nécessaires à l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Chesi et al., 2002).

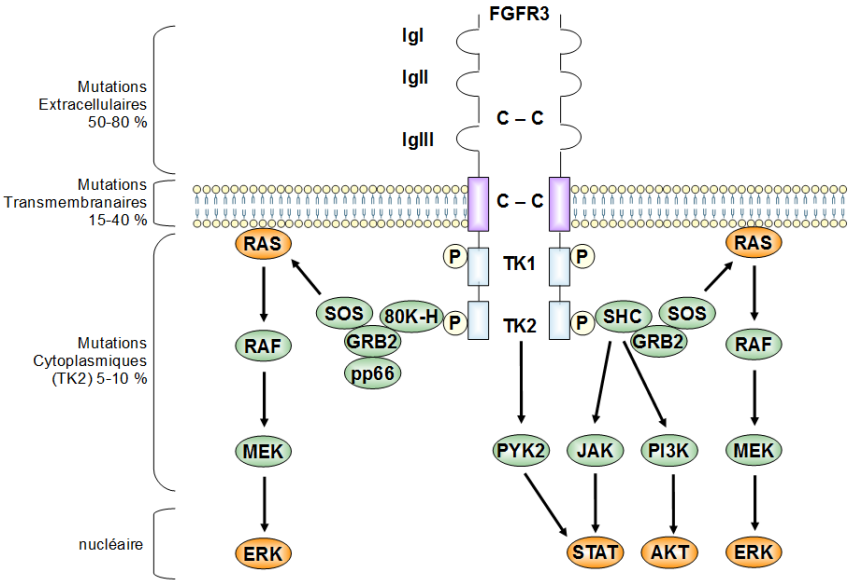


Figure 9 : Représentation des voies de signalisation activées par la liaison du FGFR3 avec son ligand FGF (Adapté de *Wu XR, Nat Rev Cancer*, 2005). *FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3 ; TK: Tyrosine Kinase ; SHC: Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein ; GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein 2 ; SOS: SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor ; RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; MEK: MAPK/ERK Kinase ; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ; JAK: Janus Kinase ; PYK2: proline tyrosine kinase 2 ; STAT: Signal Transducer And Activator of Transcription ; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase ; 80K-H: Protein Kinase C Substrate 80K-H ; AKT: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog.*

2) La protéine MMSET/NSD2

MMSET est un des trois membres de la famille des protéines nucléaires à domaine SET, ou NSD (Nuclear receptor binding SET Domain), qui tous possèdent des activités histone méthyltransférase (Marango et al., 2008). MMSET/NSD2 est codé par le gène Wolf-Hirschhorn Syndrome candidate 1 (*WHSC1*), porté sur le bras court du chromosome 4 (4p16.3), dont l'altération chez l'Homme est responsable du syndrome de Wolf-Hirschhorn, une affection génétique rare à l'origine de malformations cranio-faciales et d'un retard de croissance (Bergemann et al., 2005). *WHSC1* produit trois isoformes par épissage alternatif : une protéine de 647 acides aminés (aa) MMSET I, une grande protéine MMSET II de 1365 aa et RE-IIBP (interleukin-5 Response Element II Binding Protein) de 584 aa. Seules MMSET II et RE-IIBP possèdent le domaine SET, tandis que MMSET I et MMSET II partagent la même partie N terminale (Brito et al., 2009; Keats et al., 2003)(Figure 8). En dehors du domaine SET, MMSET II contient 2 domaines PWWP, une région HMG (high mobility group) et plusieurs domaines PH (plant homeodomain) en « doigts de zinc ». Les domaines PWWP et PH sont respectivement impliqués dans la reconnaissance des histones et les interactions protéines-protéines (Vougiouklakis et al., 2015).

MMSET est une histone méthyltransférase dont la surexpression induit une augmentation du niveau de H3K36me2 à l'échelle du génome (Marango et al., 2008). Bien que cette protéine semble être capable de catalyser la méthylation des résidus lysine 4 (K4) des histones H3 et K20 des histones H4 (Pei et al., 2011), son activité principale cible la diméthylation des histones H3 sur la lysine 36 (H3K36me2) (Kuo et al., 2011). Les discordances apparentes concernant l'activité de MMSET et de son

substrat pourraient indiquer une activité différente en fonction du type cellulaire étudié.

Physiologiquement, MMSET est exprimé dans divers tissus, notamment le thymus, ainsi que dans les tissus embryonnaires. Sa fonction semble complexe et son inactivation chez la souris (délétion du domaine SET), reproduit en partie le syndrome de Wolf-Hirschhorn, en induisant des malformations cardiaques et cranio-faciales ainsi qu'une létalité périnatale (Nimura et al., 2009). Par ailleurs, MMSET pourrait participer à la réponse cellulaire aux lésions génétiques en recrutant la protéine 53BP1 au niveau des cassures doubles brin de l'ADN et son inhibition par shRNA induit une sensibilité accrue des cellules aux irradiations gamma (Pei et al., 2013). Ces données suggèrent un rôle de MMSET dans les processus épigénétiques associés à la réparation de l'ADN.

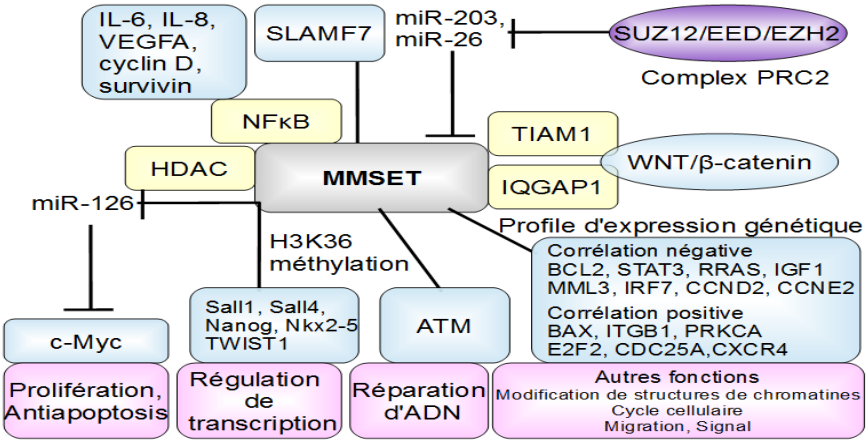


Figure 10 : Schéma représentant les partenaires de *MMSET* et les différentes fonctions associées (Adapté de *Xie ZG et Chng WJ, BioMed Res Int.* 2014). *MMSET: Multiple Myeloma SET Domain-Containing Protein ; NFκB: Nuclear Factor Kappa B ; IL-6: Interleukin 6 ; IL-8: Interleukin 8 ; VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A ; SLAMF7: SLAM Family Member 7 ; HDAC: Histone Deacetylase ; TIAM1: T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1 ; SUZ12: SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit ; EED: Embryonic Ectoderm Development ; EZH2: Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit ; PRC2: Polycomb Repressive Complex 2 ; IQGAP1: IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 ; Sall1: Spalt-Like Transcription Factor 1 ; Sall4: Spalt-Like Transcription Factor 4 ; Nkx2-5: NK2 Homeobox 5 ; TWIST1: Twist Family BHLH Transcription Factor 1 ; ATM: ATM Serine/Threonine Kinase ; BCL2: B-Cell CLL/Lymphoma 2 ; STAT3: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 ; RRAS: Related RAS Viral (R-Ras) Oncogene*

Homolog ; IGF1: Insulin Like Growth Factor 1 ; IRF7: Interferon Regulatory Factor 7 ; CCND2: Cyclin D2 ; CCNE2: Cyclin E2 ; BAX: BCL2 Associated X Protein ; ITGB1: Integrin Subunit Beta 1 ; PRKCA: Protein Kinase C Alpha ; E2F2: E2F Transcription Factor 2 ; CDC25A: Cell Division Cycle 25A ; C-X-C: Motif Chemokine Receptor 4.

D'une façon intéressante, la dérégulation de MMSET dans les hémopathies lymphoïdes n'est pas restreinte aux MM mais est retrouvée dans un sous-groupe de Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) B. Ainsi, la mutation E1099K est principalement rencontrée dans les LAL t(12;21) (produisant la protéine de fusion ETV6-RUNX1) où elle induit une activité exacerbée de MMSET, une augmentation des marques H3K36me2 et une diminution des marques H3K27me3 (Jaffe et al., 2013). Le facteur MMSET est associé à la progression tumorale par différents mécanismes comme la dérégulation de TWIST1 dans le cancer de la prostate, celle de MYC dans le MM ou la modulation des gènes cibles de NF-κB dans le cancer de la prostate (Figure 10) (Vougiouklakis et al., 2015). Ces données illustrent la complexité des fonctions de MMSET, en particulier au cours de la progression tumorale.

1.4.4 Rôle du micro-environnement

En plus de ces événements oncogéniques, les plasmocytes tumoraux sont fortement dépendants du micro-environnement de la MO. La cellule myélomateuse, comme le plasmocyte sain, a une capacité de prolifération très faible. Cela signifie que le MM est essentiellement dû à une accumulation cellulaire de plasmocytes tumoraux et non à un excès de prolifération. Les plasmocytes dépendent de facteurs de croissance et de cytokines pour leur survie, leur différenciation et leur prolifération (Podar et al., 2009; Yaccoby et al., 2004). Au sein de la MO, les plasmocytes sont localisés dans un environnement privilégié, la «niche osseuse» est définie comme étant l'ensemble des interactions créées entre les plasmocytes et les différents types cellulaires de son environnement osseux. Les interactions entre le plasmocyte et le micro-environnement sont indispensables à son développement (Figure 11) (Hideshima, 2007).

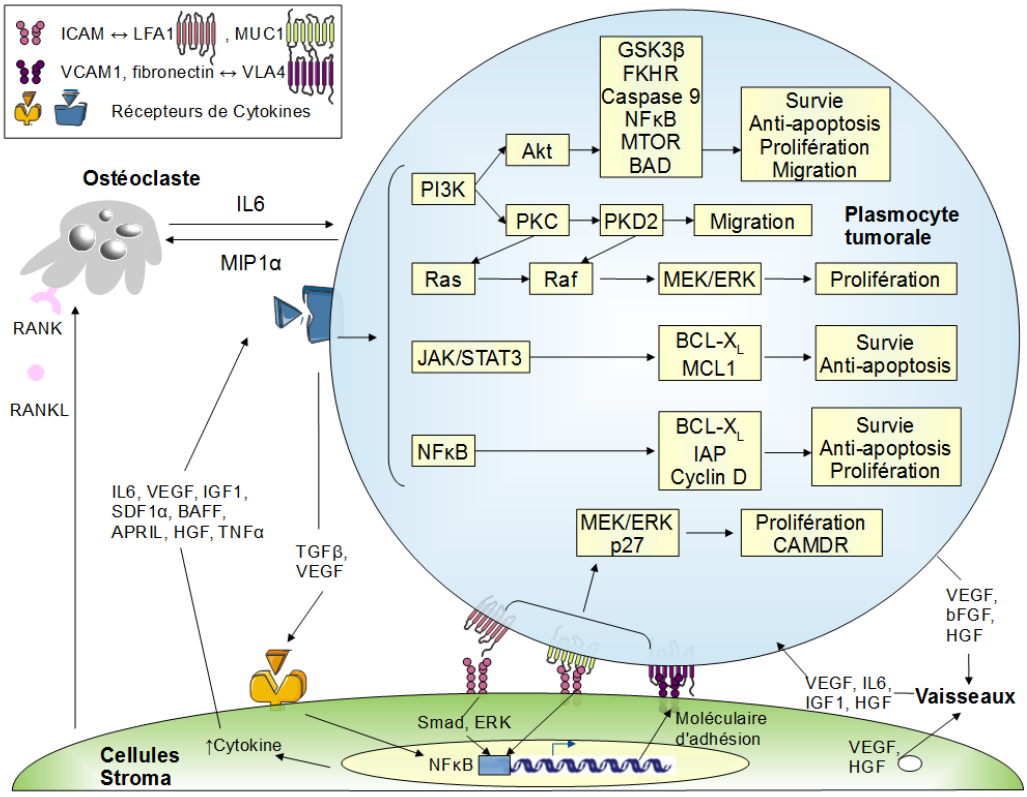


Figure 11: Représentation des interactions entre le plasmocyte tumoral et son micro-environnement *(Hideshima et al., Nature Reviews Cancer,* 2007). *ICAM: Intercellular Adhesion Molecule ; LFA1: Leukocyte Function-Associated Molecule 1 Alpha Chain ; MUC1: Mucin 1, Cell Surface Associated ; VCAM1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1 ; VLA4: Very Late Activation Protein 4 ; RANK: Receptor Activator Of NF-KB ; IL-6: Interleukin 6 ; MIP1α: Macrophage Inflammatory Proteins 1 alpha ; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase ; AKT: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog ; GSK3β: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta ; FKHR: Forkhead Box ; NFκB: Nuclear Factor Kappa B ; mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin ; BAD: BCL2 Associated Agonist Of Cell Death ; PKC: Protein Kinase C ; PKD: Protein Kinase D ; RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; MEK: MAPK/ERK Kinase ; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ; JAK: Janus Kinase ; STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription ; BCL-XL: Apoptosis Regulator Bcl-X ligand ; MCL1: Myeloid Cell Leukemia 1 ; IAP: Inhibitor Of Apoptosis Protein ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor ; IGF1: Insulin Like Growth Factor 1 ; SDF1(CXCL12): Stromal Cell-Derived Factor 1 ; BAFF: B-Cell-Activating Factor ; APRIL: A Proliferation-Inducing Ligand ; HGF: Hepatocyte Growth Factor ; TNF: Tumor Necrosis Factor ; TGFB: Transforming Growth Factor Beta ; SMAD: Mothers Against DPP Homolog; bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor.*

i. Les principales voies d'interactions entre les cellules stromas et la matrice extracellulaire

Le recrutement des plasmocytes dans la MO se fait par la liaison entre le CXCR3 (récepteur de cytokine exprimé à la surface cellulaire) avec la chimiokine SDF-1α présente dans la MO. Grâce à l'expression des molécules d'adhésion, les cellules vont adhérer aux protéines de la matrice extracellulaire (ECM) (collagène, fibronectine et laminine) et sur les cellules stromales (Barillé et al., 1995; Fairfield et al., 2016; Groen et al., 2011; Sibermann and Roodman, 2013). Trois principales molécules d'adhésion sont exprimées par les plasmocytes tumoraux:

- VLA-4 et VLA-5 (very late antigene 4 et 5), qui se lient à la fibronectine et la laminine d'ECM ou le VCAM-1 présent sur les cellules stromas.
- LFA-1, qui se lie à l'ICAM-1 présent à la surface des cellules stromales.
- Syndecan-1 ou CD138, qui se lie au collagène de type I.

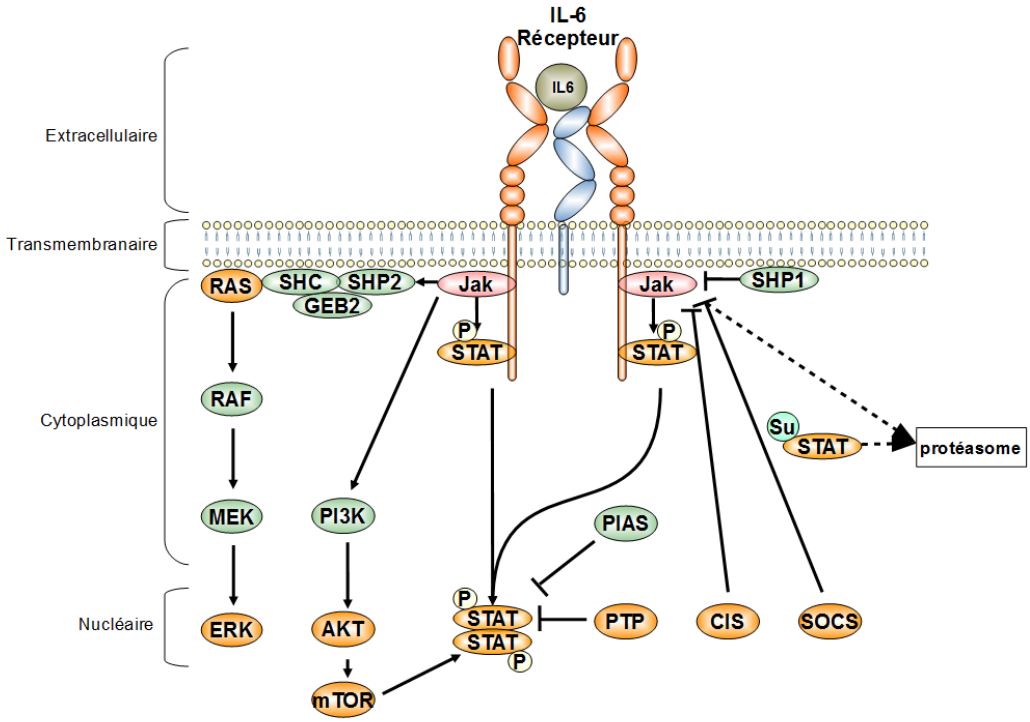
Ces adhésions entre les plasmocytes tumoraux, les cellules stromales et les protéines d'ECM ont un double rôle. Elles sont responsables dans un premier temps du recrutement des plasmocytes dans la MO. Elles permettent ensuite la sécrétion de nombreuses cytokines qui favorisent la suivie et la croissance des plasmocytes.

ii. L'interleukine 6 (IL-6)

La fixation de l'IL-6 sur son récepteur (IL6R) à la surface des plasmocytes joue un rôle majeur dans la croissance des cellules myélomateuses (Chauhan et al., 1996; Zhang et al., 1990). Le récepteur IL6R est composé de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne α spécifique qui se lie à l'IL-6 avec une faible intensité et ne traduit pas de signal et une chaîne β (gp130) qui transmet le signal. L'IL-6 est produite principalement par les cellules stromales de la moelle et les ostéoblastes, mais peut également être sécrétée par les plasmocytes tumoraux. Après la liaison avec son récepteur, l'IL-6 induit l'activation des voies de signalisation telles que MEK/MAPK, JAK/STAT3, et PI3K/Akt. L'IL-6 active la voie JAK/STAT3 qui induit la survie des cellules tumorales en permettant la surexpression/activation des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-XL et c-Myc. Enfin, NF-κB joue un rôle central dans la

surexpression de IL-6, et le blocage de NF-κB inhibe spécifiquement la sécrétion de l'IL-6 (Heinrich et al., 2003)(Figure 12).

Figure 12 : Schéma simplifié de la voie de signalisation par IL-6 et son récepteur *(Heinrichet*



al., Biochem, 2003). *IL-6: Interleukin 6 ; JAK: Janus Kinase ; STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription ; PTP/SHP: Protein-Tyrosine Phosphatase ; SHC: Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein ; GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein 2 ; RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; MEK: MAPK/ERK Kinase ; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase ; AKT: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog ; mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin ; PIAS: Protein Inhibitor Of Activated STAT ; CIS: cytokine-inducible SH2 protein ; SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling ; Su Sumo.*

iii. L'insuline growth factor 1 (IGF-1) et son récepteur.

L'IGF-1 est un facteur de survie et de prolifération cellulaire dont le taux sérique augmente avec l'évolution du MM et qui indique un mauvais pronostic. Il induit la croissance, la survie et la migration des plasmocytes.

Le récepteur à l'IGF-1 est exprimé dans 50% des cas de MM, mais est surexprimé dans les myélomes avec la translocation t(4;14) (Sprynski et al., 2009). Les voies de signalisation, agissant en aval de l'IGFR, ont été impliquées dans la résistance aux

médicaments. Ainsi, dans le myélome multiple, l'activité IGF-1/IGF-1R pourrait réduire la sensibilité des cellules aux inhibiteurs du protéasome, mais ces résultats restent controversés (Chen and Sharon, 2013; Kuhn et al., 2012). La phosphorylation du récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R), active les voies de signalisation qui induisent l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2, et l'inhibition du facteur pro-apoptotique BIM (De Bruyne et al. 2010).

iv. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) /VEGFR.

L'angiogenèse est le mécanisme de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de réseaux vasculaires préexistants. Il est indispensable à divers processus biologiques comme le développement embryonnaire mais aussi le développement des tumeurs et la croissance des métastases. Le VEGF (vascular endothélial growth factor) est le facteur de croissance qui favorise l'angiogenèse. Le taux de VEGF augmente dans la MO des patients au cours de la maladie. Ce facteur favorise l'angiogenèse qui est en soi un facteur de mauvais pronostic. L'IL-6 induit la synthèse du VEGF par les cellules tumorales mais aussi par les cellules stromales ; en retour, la stimulation par le VEGF entraîne la production d'IL-6. Le VEGF est important pour le maintien de la cellule tumorale. La liaison du VEGF à son récepteur (VEFG – R1) induit l'activation des voies PI3/Akt ou MEK/Erk et influe donc sur la migration, l'adhésion et la prolifération cellulaire. Ces activités présentent un intérêt thérapeutique et des études ont montré qu'en bloquant le VEGF (soit par anticorps anti-VEGF, soit avec des inhibiteurs du récepteur au VEGF) les cellules entrent en apoptose et une inhibition de la sécrétion de VEGF et IL-6 est observée (Kumar et al., 2003).

v. Le fibroblast growth factor (FGF) et le FGFR3.

Le fibroblast growth factor fait partie des 22 membres de la grande famille des FGF. Le FGF est important dans la régulation de la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose. Ces facteurs sont généralement sécrétés par les fibroblastes et permettent de maintenir la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Par ailleurs, le FGF permet aussi de réguler l'organisation et la différenciation des cellules environnantes. Comme nous l'avons vu précédemment, le 3^{e} récepteur au FGF, normalement absent de la surface des

plasmocytes et surexprimé dans les plasmocytes de patients porteurs de la translocation t(4;14). La liaison avec le FGF entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquée dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Krejci et al., 2006; Sato et al., 2002). En particulier, l'expression du FGFR3 entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation sous-jacentes (MAP kinases, PI3K/Akt et JAK/STAT) décrites plus loin (Agazie et al., 2003).

Dans les MM avec translocation t(4;14), l'expression constitutive du FGFR3 joue un rôle essentiel dans le processus de transformation, et les mutations activatrices du FGFR3 (essentiellement la mutation K650E) sont présentes dans 5% des cas. L'activité oncogénique du FGFR3 muté a été établit dans des modèles murins, où son expression constitutive dans la lignée B induit l'émergence de leucémies aigues lymphoblastiques au terme d'une longue période de latence (Chen et al. 2005). Dans les plasmocytes avec t(4;14), 2 catégories peuvent être individualisés selon les caractéristiques du FGFR3. Dans 80% des cas il y a une expression ectopique du FGFR3. Dans les 20% restants le FGFR3 n'est pas exprimé et cette absence d'expression est due à la perte du dérivé 14. Ainsi sa surexpression transitoire pourrait n'être nécessaire qu'à l'initiation du processus d'oncogenèse. Ces données font du FGFR3 une cible thérapeutique potentielle. Depuis 2004, des études ont testé l'efficacité anti-myélomateuse de plusieurs inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase du FGFR3 in vitro et in vivo (Krejci et al., 2010; Scheid et al., 2015; Scuto et al., 2011). Ces molécules semblent agir sur la différentiation des plasmoblastes en plasmocytes (différentiation morphologique, phénotypique et augmentation de la sécrétion des Ig) et présentent une activité pro-apoptotique (Trudel et al., 2005).

En résumé, le micro-environnement induit l'activation de nombreuses voies d'activation indispensables au maintien et à la survie des plasmocytes. L'inhibition des stimulations issues de l'environnement médullaire des plasmocytes tumoraux représente un intérêt thérapeutique majeur (Ramakrishnan and D'Souza, 2016).

1.4.5 Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du MM

La survie et la prolifération des lymphocytes tumoraux dues à l'influence du micro-environnement entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation dont: la voie JAK/STAT, la voie PI-3K/Akt, la voie des MAPK et la voie NF-κB. Chacune de ces voies est une cible thérapeutique potentielle. Les récepteurs cellulaires qui activent ces voies de signalisation sont principalement des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK) (Figure 13) (Bruno et al., 2005).

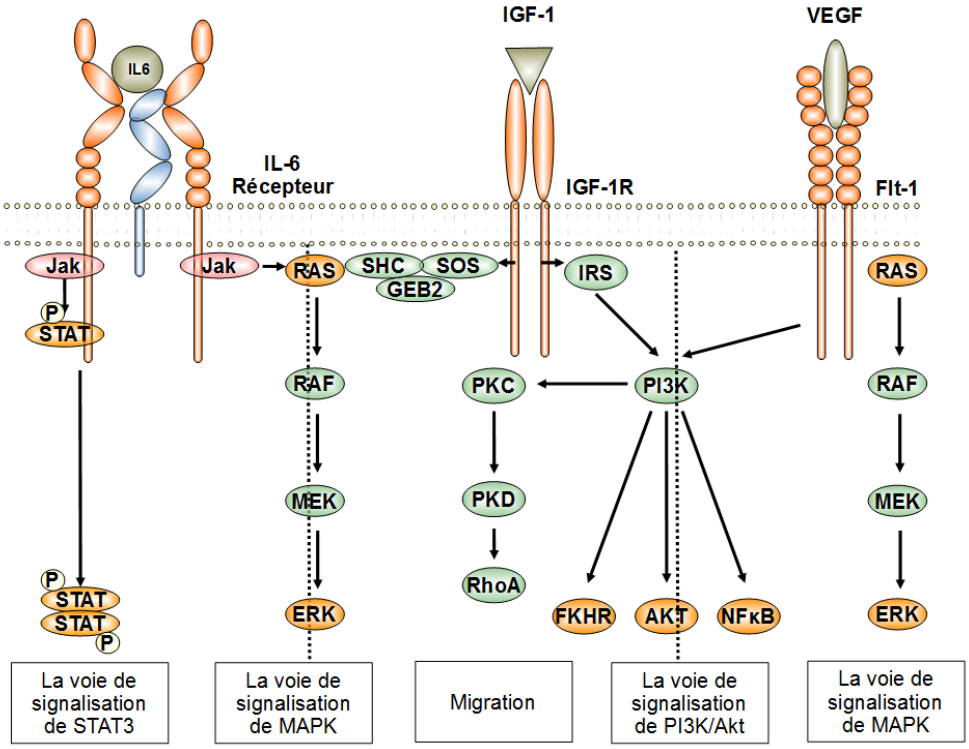


Figure 13 : *Schéma des voies de signalisation activées dans le MM (Adapté de Bruno et al., Leukemia, 2005). IL-6: Interleukin 6 ; JAK: Janus Kinase ; STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription ;PTP/SHP: Protein-Tyrosine Phosphatase ; SHC: Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein ; GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein 2 ; SOS: SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor ; RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; MEK: MAPK/ERK Kinase ; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ; IGF1R: Insulin Growth Factor 1 Receptor ; IRS: Insulin Receptor Substrate ; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase ; AKT: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog ; PKC: Protein Kinase C ; PKD: Protein Kinase D ; RhoA: Ras Homolog Family Member A ; FKHR: Forkhead Box ; NFκB: Nuclear Factor Kappa B ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor ; Flt-1: Fms Related Tyrosine Kinase 1.*

i. La voie JAK/STAT

La famille des Janus kinase est composée de quatre membres JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les protéines JAK (de 120 à 140 kDa) sont constituées de sept domaines JAK Homology (JH) (Figure 14) (O'Shea et al., 2004):

- le domaine JH1 correspond au domaine à activité kinase en C terminal;

- le domaine JH2 correspond au domaine pseudo kinase, dépourvu d'activité catalytique, qui est toutefois important dans la régulation de l'activité catalytique des JAK;

- les domaines JH3 et JH4 sont situés dans le domaine SH2;

- les domaines JH6 et JH7 sont situés dans la partie N terminale, FERM, impliquée dans les interactions protéines-protéines et dans la fixation des JAK aux récepteurs de cytokines.

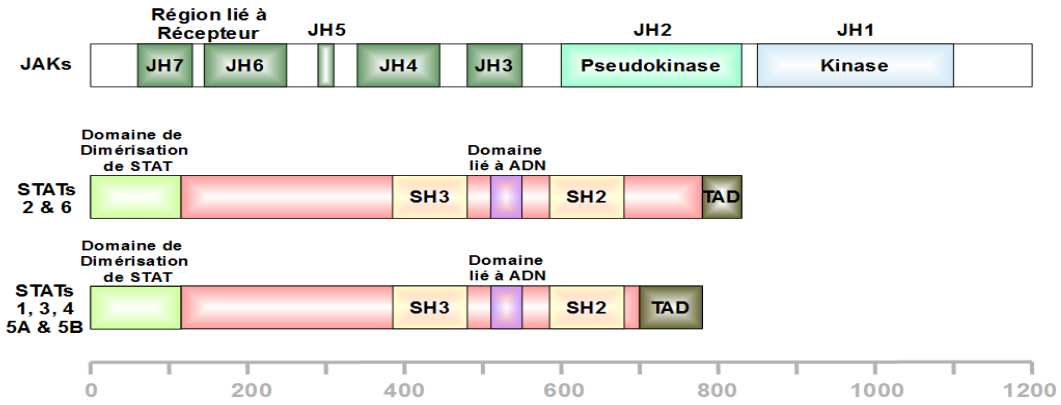


Figure 14 : *Représentation de la structure des membres de la famille des JAK/STAT (Adapté de O'Shea JJ et al., Nat Rev Drug Discov., 2004). JAK: Janus Kinase ; STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription ;JH: JAK homology domain ; SH: Src-homology domain ; TAD: transcriptional activation domains.*

La voie JAK/STAT est impliquée dans la signalisation induite par les facteurs de croissance et les cytokines (Leonard, 2001). Elle régule divers processus physiologiques tels que la différentiation, la prolifération, la migration et la survie. De plus, elle est impliquée dans de nombreux processus oncogéniques dans les cellules hématopoïétiques (Chen et al., 2012).

D’un point de vue mécanistique, la liaison d’un ligand (une cytokine) sur son récepteur entraîne l’oligomérisation de domaines intra-cytoplasmiques, rapprochant ainsi deux protéines JAKs qui peuvent alors s’autophosphoryler (Stark and Darnell, 2012). Les JAKs ainsi activées vont phosphoryler la partie intra-cytoplasmique du récepteur à laquelle ells sont associées sur son résidu tyrosine, créant ainsi des sites de recrutement des protéines à domaine SH2, parmi lequel les protéines STAT (singal transducer and activator of transcription). La famille des facteurs de transcription STAT est composée de sept membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6). La phosphorylation du résidu tyrosine des STATs par les JAKs entraîne la formation d’homo ou hétéro-dimères qui sont rapidement transloqués dans le noyau pour y réguler la transcription d’un ensemble de gènes cibles.

Dans le MM, la voie JAK/STAT peut être activée par l’IL-6, l’IGF1 et le FGF. En cas d’activation par l’IL-6, les protéines JAK-1, JAK-2 et Tyk-2, constitutivement associées à la gp130, sont phosphorylées et activées. Ces protéines phosphorylent à leur tour les domaines SH de la région intra-cytoplasmique de la gp130 qui vont recruter des protéines cytoplasmiques en particulier STAT3. Ce facteur est normalement activé rapidement et de façon transitoire, en réponse aux cytokines, et son activation constitutive dans le myélome induit une expression élevée des gènes qui sous-tendent la prolifération et la chimio-résistence résistance des plasmocytes tumoraux (Catlett-Falcone et al., 1999). Notons que l’activation constitutive de STAT3 peut être médiée par des boucles autocrines ou paracrines (en particulier impliquant l'IL-6), mais aussi par une perte des régulateurs négatifs.

Trois principales classes de régulateurs négatifs ont été décrites. Les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (SH2-domain containing phosphatase) se lient directement aux récepteurs cytokiniques activés (ou aux protéines JAKs) et catalysent leur déphosphorylation. Le domaine SH des protéines SOCS (suppressor of cytokine signaling) interagit avec les résidus phospho-tyrosine des récepteurs (ou des JAKs) et les inhibe. Enfin, les protéines PIAS (protein inhibitor of activated STAT) se lient directement aux STAT et empêchent leur fixation sur l’ADN (Chim et al., 2004; Scuto et al., 2011).

Compte tenu du rôle crucial de cette voie de signalisation dans le MM, différents inhibiteurs ont été développés et leur activité est associée à une inhibition des

signaux de survie induits par l'IL-6 sur les plasmocytes tumoraux (Golombick et al., 2016; Gomez-Bougie et al., 2015; Neri et al., 1993).

ii. La voie NFκB

La voie de signalisation NFκB (nuclear-factor kappa B) est importante dans les réponses immunitaires et inflammatoires, et joue un rôle dans les mécanismes pro-apoptotiques. Les protéines NFκB sont des facteurs de transcription présents sous forme de dimères. Cinq membres de la famille NFκB ont été décrits: NFκB1 (p50 et son précurseur p105), NFκB2 (p52 et son précurseur p100), c-Rel, p65 (RelA) et Rel B. A l'état basal, le facteur de transcription NFκB est localisé dans le cytosol et est associé à un inhibiteur de la famille IκB ce qui le rend inactif. Il y a cinq membres de la famille IκB connu: IκBα, IκBβ, IκBε, p105 et p100. Deux voies d'activation de NFκB ont été caractérisées: la voie canonique et la voie alternative (Figure 15) (Ghosh et al., 1998).

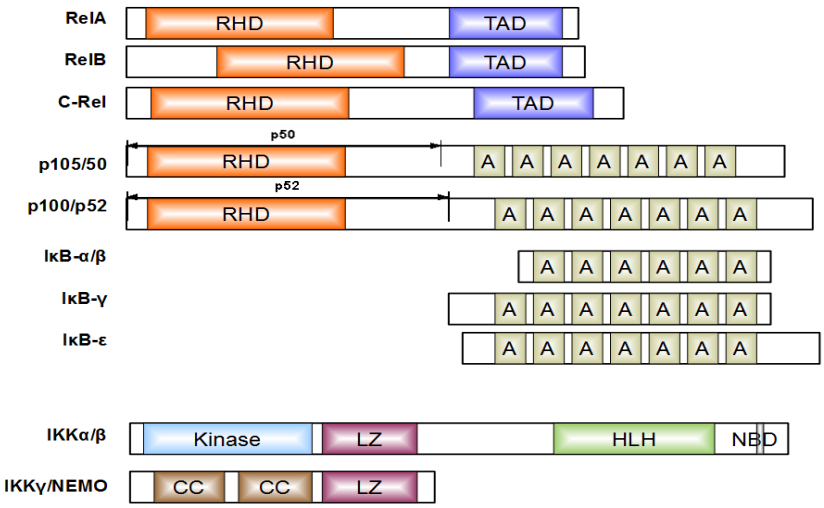


Figure 15 : Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille NFκB (Adapté *de Ghosh et al., Annu Rev Immunol,* 1998). *Rel: REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit ; TAD: Trans-activating domain ; RHD: Rel homology domain ; LZ: Leucine Zipper ; HLH: helix-loop-helix ; NBD: nucleotide-binding domain ; IκB: NFKB Inhibitor Epsilon ; Bcl-3: B-Cell CLL/Lymphoma 3 ; IKK: Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase Alpha/Beta ; NEMO: NF-Kappa-B Essential Modifier.*

La voie canonique, dite « classique », est induite par les signaux impliquant les protéines NEMO, les kinases IKKα et IKKβ, dont l'activité entraîne la dégradation

complète des inhibiteurs IκB par le protéasome et la libération de NFκB (généralement composé du dimère p50/p65). La voie alternative est activée par les ligands comme BAFF (B cell activating factor, belonging to the TNF family), la lymphotoxineβ et le ligand de CD40, qui activent les kinases IKKα et NIK (Nck interacting kinase) responsables de la dégradation partielle de p100 par le protéasome, libérant ainsi les complexes de NFκB p52/RelA. La voie alternative active préférentiellement NFκB2 et Rel-B. L'activation des deux voies repose sur l'induction de la phosphorylation des protéines inhibitrices de NFκB: les IκB (IκBα pour la voie canonique et p100 pour la voie alterne) par IKK (Figure 16) (Oeckinghaus et al., 2011). Une fois libre, ce dernier est transloqué dans le noyau où il va pouvoir réguler ses gènes cibles, comme cytokines ou molécules adhérentes.

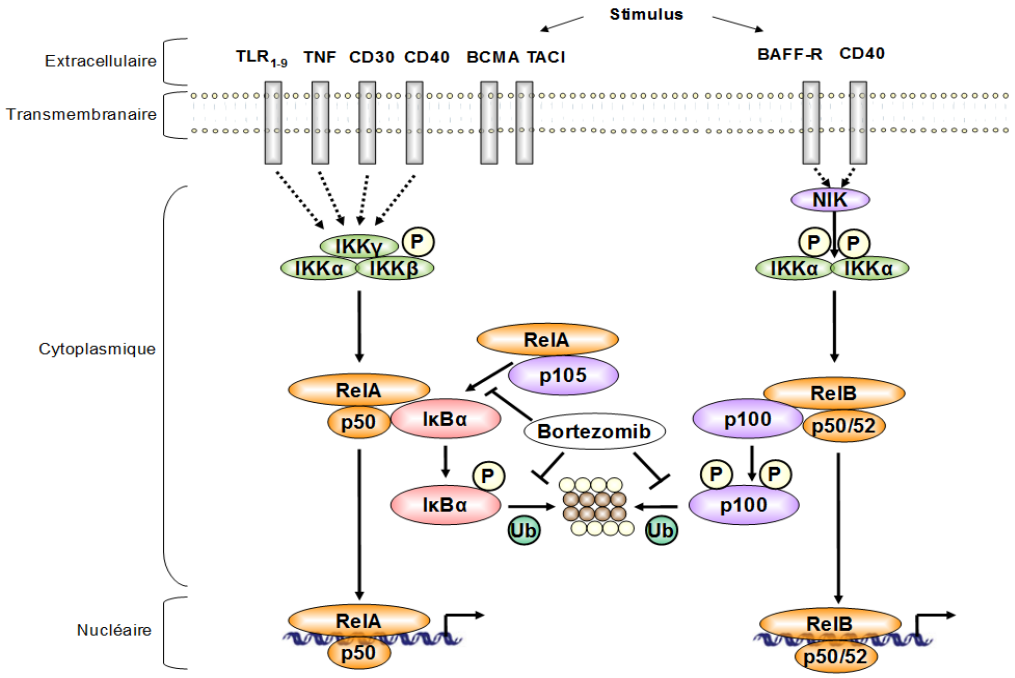


Figure 16 : *Représentation de la voie de signalisation NFκB (Adapté de Oeckinghaus et al., Nat Immunol, 2011). LR: Toll Like Receptor ; TNF: Tumor Necrosis Factor ; BCMA: B-Cell Maturation Factor ; TACI: Transmembrane Activator And CAML Interactor ; BAFF: B-Cell-Activating Factor ; Rel: REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit ; IKK: Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase Alpha/Beta ; NIK (MAP3K14): NF-Kappa-Beta-Inducing Kinase ; Ub: ubiquitine.*

De nombreuses études ont montré une activité constitutive de NFκB dans des cellules de MM et dans environ 70% des plasmocytes tumoraux (Bharti et al., 2004). Ainsi, les ligands des récepteurs au TNF comme APRIL et BAFF, produits par les

cellules stromales de la moelle, fournissent des signaux de survie essentiels à la survie à long terme des plasmocytes en activant les voies de NFκB (Elgueta et al., 2010). La plupart des MM expriment fortement les gènes cibles de NFκB, ce qui suggère un rôle du micro-environnement dans la stimulation continue des plasmocytes tumoraux et pourrait fournir un rationnel pour leur dépendance au stroma. Récemment, l'identification, dans environ 20% des MM, de mutations dans les gènes régulant l'activité de NFkB a fortement suggéré l'implication de cette voie dans la progression myélomateuse (Chapman et al., 2011). D'une façon intéressante, l'inhibition de l'activité de NFκB induit l'apoptose, l'inhibition de la prolifération cellulaire et augmente les effets cytotoxiques des agents anti-tumoraux. Ainsi, le bortezomib et les Imids (thalidomide et lenalidomie) qui constituent des agents thérapeutiques efficaces dans le MM, bloquent la voie NFκB en stabilisant les inhibiteurs IKB (Chesi et al., 2013).

iii. La voie Ras/Raf/MAPK

Les membres de la famille RAS (H-, K- et N-RAS) fonctionnent comme des interrupteurs dans la transduction du signal cellulaire. Divers signaux d'activation conduisent au recrutement des facteurs d'échange de GDP/GTP, growth-factor-receptor bound protein 2 (Grp2) et Sons of Sevenless (SOS) à la membrane plasmique où Ras est localisé (Dong et al., 1996). Le complexe grp2/SOS catalyse l'échange de GDP en GTP sur les protéines RAS et induit ainsi son activation. A l'inverse, les GTPase activating proteins (GAPs) catalysent l'échange GTP en GDP et freinent l'activité de Ras. La forme activée de RAS peut recruter à la membrane plasmique les protéines de la famille RAF1, constituée des sérine-thréonine-kinases ARAF, BRAF et CRAF. Ce processus permet la phosphorylation des protéines MAPK et l'activation de la cascade de signalisation. Les mutations affectant K-Ras et N-Ras, mais rarement H-Ras sont des événements très fréquents dans de nombreux cancers, et particulièrement dans le MM (cf infra) (Chapman et al., 2011) .

Les MAP kinases appartiennent à la famille des serine/thréonine kinases. L'activation de ces protéines dépend de la phosphorylation en série de trois kinases les MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKK), le MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK ou MKK) et la MAP kinase (MAPK). Cette famille est composé de quatorze membres divisés en deux groupes: les MAP kinases classiques et les non conventionnelles. Les MAP kinases classiques se composent des Extracellular signal-regulated kinase

(Erk1, Erk2 et Erk5), des c-Jun N-terminal kinase (JNK1, JNK2 et JNK3) et de la p38α, β, γ et δ. Les MAP kinases atypiques sont les Erk3/4, Erk7/8 et Nlk (nemo-like kinase). Les MAPK définissent sept voies de signalisation (Figure 17) (Reuter et al., 2000).

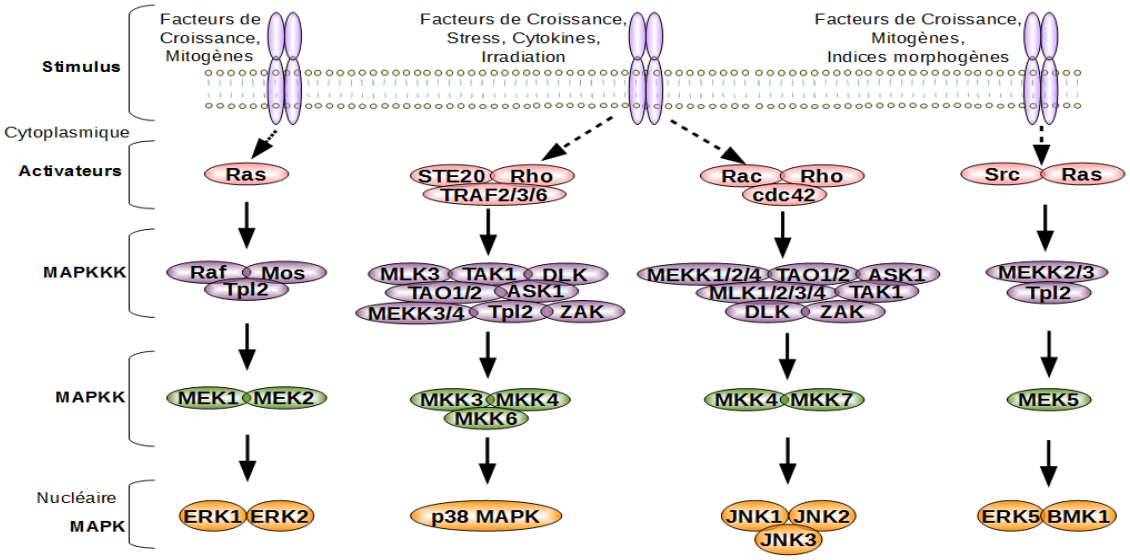


Figure 17: *Schéma de la voie de signalisation de MAPK kinases (Adapté de Reuter et al., Blood, 2000). MAPKKK: MAP kinase kinase kinase ; MAPKK: MAP kinase kinase ; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase ; RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; Mos: V-Mos Moloney Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog ; Tpl2 (MAP3K8): Tumor Progression Locus 2 ; MEK: MAPK/ERK Kinase ; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ; STE20: Serine/Threonine-Protein Kinase ; Rho: Rhodopsin ; TRAF: TNF Receptor Associated Factor ; MLK: Mixed Lineage Kinase ; TAK: Tat-Associated Kinase ; DLK: Dual Leucine Zipper Kinase ; TAO: Thousand And One Amino Acid Protein Kinase ; ASK1 (MAP3K5): Apoptosis Signal Regulating Kinase ; ZAK: Sterile Alpha Motif And Leucine Zipper Containing Kinase AZK ; MKK: MAPK/ERK Kinase ; Rac: Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate ; Cdc42: Cell Division Cycle 42 ; JNK: JUN N-Terminal Kinase ; Src: SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase ; BMK1 (MAPK7): Big MAP Kinase 1.*

iv. La voie PI3K/Akt

Comme la voie des MAPK, la voir PI3K/Akt peut être activée par de nombreux facteurs de croissances et cytokines nécessaires à la survie des plasmocytes tumoraux comme l'IGF1, l'IL-6, le VEGF et le FGF. L'activation de cette voie par l'IL-6 et l'IGF1 est responsable de la prolifération des plasmocytes et des effets anti-

apoptotiques (Ramakrishnan et al., 2012). C'est donc une des voies majeures de la biologie des plasmocytes tumoraux.

-La famille des PI3Ks

Les protéines de la famille des phosphoinositides 3-kinase (PI3K) catalysent la phosphoridation du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate membranaire (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Huit sous-unités catalytiques possédant cette activité ont été décrites. Elles possèdent toutes un domaine PIK (PI-kinase), un domaine C2 capable de se fixer aux phospholipides et un domaine catalytique. Les membres de la famille des PI3Ks sont répartis en trois classes en fonction de leurs spécificités de substrats, de leur structure et de leurs mécanismes de régulation (Figure 18) (Liu et al., 2009).

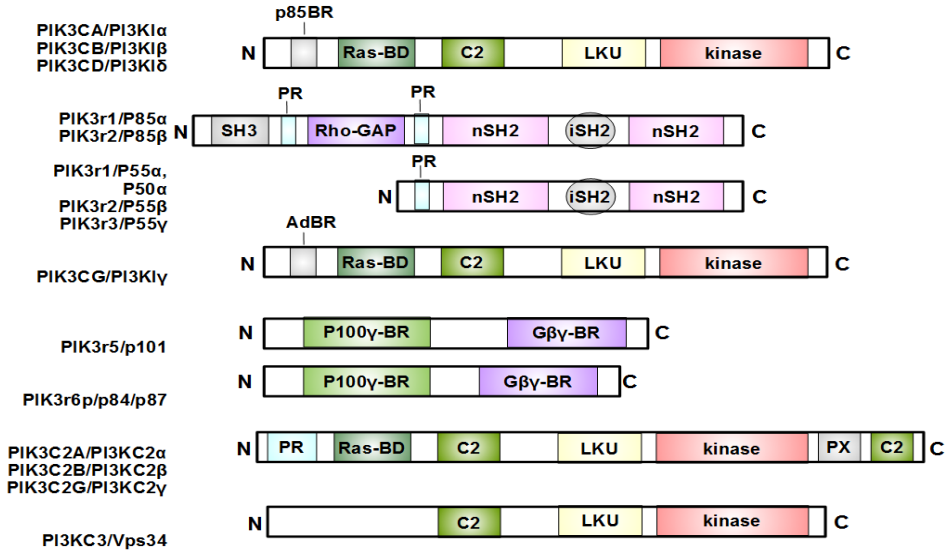


Figure 18 : *Schéma des caractéristques structurales des membres de la famille PI3K (Adapté de Liu et al., Nat Rev Drug Discov, 2009). PI3K: Phosphoinositide 3-kinases ; BR/BD: Binding domain ; LKU: Helical domain ; SH: Src Homology ; PR: proline rich domain ; PX: phox homology domain ; iSH2: inter-SH2 domain (p110 binding domain). AdBR: ADRBK1 binding domain.*

1) *PI3K de classe I*

Les PI3Ks de classe I sont des hétéro-dimères composés d'une sous-unité régulatrice de 50 à 100 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110-120 kDa (p110α, p110β et p110δ) (Liu et al., 2009). L'activation des PI3Ks est sous le contrôle de la signalisation des récepteurs à activité tyrosine-kinase. En aval des RTK, l'activation

de la PI3K peut-être directe, via une interaction de la sous-unité p85 avec le RTK, ou indirecte via une molécule adaptative de type GAB ou IRS. Chaque PI3K est composée d'une région N-terminale qui interagit avec la sous-unité régulatrice PI3-kinase qui lie aux petites protéines G. Elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la régulation de la taille des cellules, la motilité, la survie et la prolifération cellulaire. Les PI3Ks de classe I peuvent être divisées en deux groupes en fonction de la protéine adaptatrice impliquée. Les PI3-Kinases de classe IA sont associées à une sous-unité régulatrice de 50-85 kDa dont p85 est la plus fréquente. Le p85 est composée d'un domaine SH3 (Src Homology 3), d'un domaine BH (breakpoint-cluster-region homology) entouré de deux régions riches en proline et de deux domaines SH2 (Src Homology 2) (Vanhaesebroeck et al., 2001). Les PI3K de classe IA sont régulées par des interactions avec les protéines Ras activées, c'est-à-dire sous forme fixée au GTP, qui s'associent et activent les sous-unités catalytiques p110 (notamment la p110α). Une seule PI3K de classe IB est connue. Elle est formée par une sous-unité catalytique p110γ et une sous-unité régulatrice p101. p110γ possède 36% d'homologie avec p110α, et est composée d'un domaine PIK, d'un domaine kinase et d'un domaine de liaison à Ras.

2) *PI3K de classe II*

Les PI3-kinases de classe II sont des monomères de 170 kDa dont trois isoformes ont été décrites. PI3K-C2α et β sont ubiquitaires tandis que PI3K-C2γ est principalement exprimé dans le foie. Les PI3KC2 sont caractérisées par la présence d'un domaine C2 en C-terminal et d'un domaine PX (phox homology). Les PI3-kinase de classe II jouent un rôle dans le trafic vésiculaire et l'endocytose.

3) *PI3K de classe III*

Les PI3-kinases de classe III est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique homologue de la protéine Vps34p (vacuolar protein sorting mutant) de *S. cerevisiae* et d'une sous-unité régulatrice à activité Ser/Thr kinase, la p150. La PI3K de classe III a pour substrat spécifique le phosphatidylinositol et serait impliquée dans le trafic intracellulaire et l'autophagie.

Grâce aux domaines SH de la p85, la PI3K est recrutée par les RTK phosphorylées. L'interaction entre le domaine SH de p85 et les résidus tyrosine phosphorylés

entraîne d'une part un changement de conformation de la sous-unité p110, ce qui augmente son activité catalytique et permet son activation par Ras. D'autre part, p85 peut être phophorylée sur sa tyrosine 688 par les kinases de la famille des Src, Lck ou Abl. Cette phosphorylation est responsable de la levée de l'inhibition de la p85 sur la p110 entraînant l'augmentation de l'activité de la p110 (Hofmann et al., 2014; Ikeda et al., 2010).

Une fois la protéine PI3-kinase activée, la sous-unité p110 phosphoryle les composés phosphoinositols, notamment le phosphatidylinositol-di-phosphate (PIP2), en phosphatidylinositol-tri-phosphate (PIP3).

- Les kinases Akt

Les membres de la famille des kinases AKT jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal issue des récepteurs membranaires et sont dérégulés dans de nombreux types de cancers (Hanahan D and Weinberg, 2011). Chez l'homme ces sérine/thréonine kinases comprennent trois membres: Akt1/PKBα, Akt2/PKBβ et Akt3/PKBγ. Les trois isoformes sont exprimées de manière tissu-spécifique. Ainsi, Akt1 est présente dans le thymus, tandis que Akt2 et Akt3 sont plus ubiquitaires. Ces trois protéines partagent les mêmes caractéristiques (Hanada et al., 2004): un domaine PH (pleckstrin homology domaine) en N-terminal, ce qui leur permet d'être recrutées aux membranes quand PI3K est activée; un domaine sérine/thréonine kinase, qui reconnaît et phosphoryle les séquences consensus des protéines contenant un résidu hydrophobe (F ou L); un domaine HM (hydrophobic motif) C-terminal, important dans la régulation de l'activité kinase.

Au cours de l'activation, la PI3K produit le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) qui se localise à la membrane plasmique et qui en interagissant avec le domaine PH de Akt, modifie sa conformation, permettant ainsi sa phosphorylation par PDK1 et son activation. Inversement, Akt est négativement régulé principalement par PTEN (phosphatase and tensin homolog), qui lui déphosphoryle PIP3 (Cully et al., 2006). *In vivo*, quatre principaux résidus sont phosphorylés sur Akt (S124, T308, T450 et S473). Parmi eux, la thréonine 308 et la sérine 473 sont directement impliqués dans la régulation de l'activité d'Akt (Vincent et al., 2011)(Figure 19).

En aval de Akt les protéines thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycine) sont des régulateurs clés de processus cellulaires fondamentaux, notamment la réponse aux facteurs de croissance, la synthèse protéique (Hennessy

et al., 2005), le métabolisme de l'AMP (adenosine monophosphate) ou la disponibilité en oxygène (Engelman, 2009). mTOR peut s'assembler avec deux protéines: raptor (regulatory associated protein of mTOR) ou rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) afin de former deux complexes distincts: mTORC1 et mTORC2. La protéine GβL (protéine-G β-like) est présente dans les deux complexes. Le complexe mTORC1 est impliqué dans la signalisation cellulaire induite par Akt, tandis que la fonction principale du complexe mTORC2 est l'activation d'Akt. Akt phosphorylée entraîne l'activation de nombreuses cibles en aval ayant des rôles cruciaux dans la survie des plasmocytes dont mTOR (Maiso et al., 2011). Comme dans de nombreuses prolifération malignes, l'axe Akt/mTOR représente une cible thérapeutique intéressante dans le myélome et plusieurs agents pharmacologiques comme la perifosine ou l'enzastaurin sont en cours d'évaluation (Podar et al., *Leukemia*. 2009).

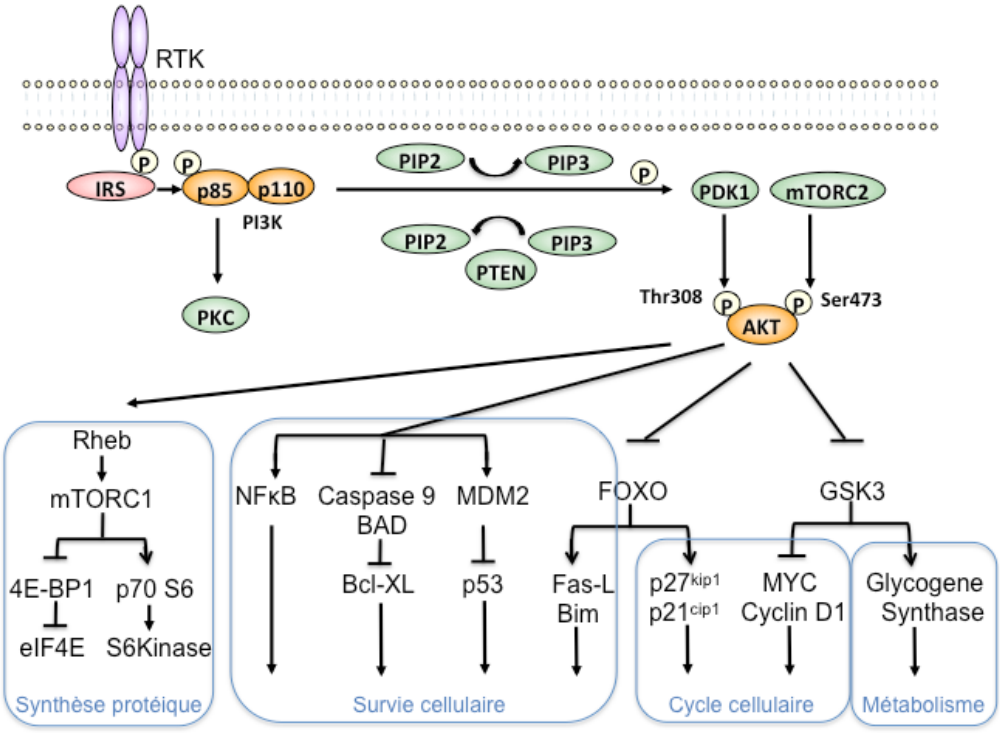
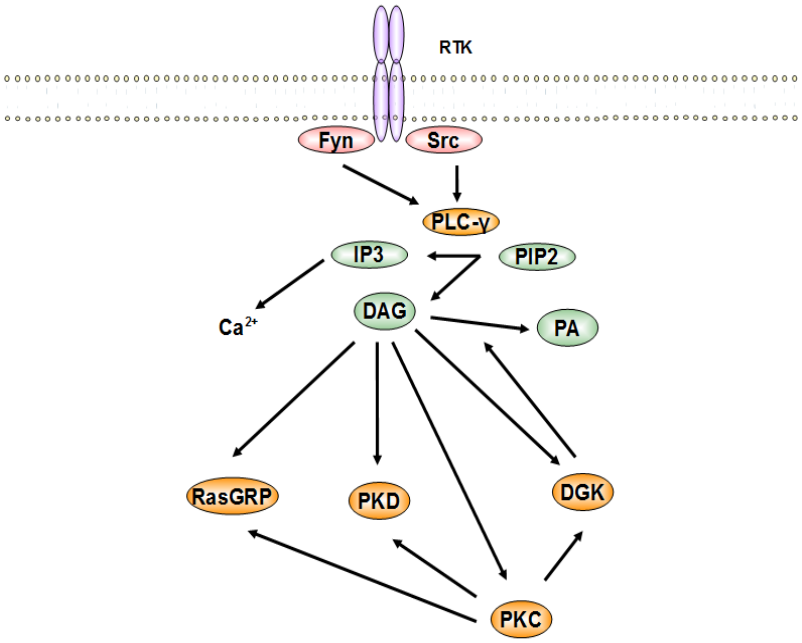


Figure 19 : SSchéma simplifié de la voie de signalisation PI3K/Akt (Adapté de *Hennessy et al., Nat Rev Drug Discov, 2005 et Park et al., Haematologica,* 2010). *RTK: Receptor of Tyrosine Kinase ; IRS: Insulin Receptor Substrate ; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-*

Bisphosphate 3-Kinase ; AKT: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog ; PKC: Protein Kinase C ; PI3K: Phosphoinositide 3-kinases ; PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ; PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog ; PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 ; mTORC2: Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 2; Rheb: Ras Homolog Enriched In Brain ; mTORC1: (mTOR) Mechanistic Target Of Rapamycin ; 4E-BP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1 ; eIF4E: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E ; NFκB: Nuclear Factor Kappa B ; BAD: BCL2 Associated Agonist Of Cell Death ; MDM2: MDM2 Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase ; FOXO: Forkhead Box O ; FasL: Fas Cell Surface Death Receptor Ligand ; Bim: Bcl-2 Interacting Protein ; GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3.

v. La voie d'activation Phospholipase C (PLC)/Protéine kinase (PK) C/PKD2

Les phospholipases C (PLC) constituent une classe d'enzymes membranaires qui hydrolysent le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate pour produire deux molécules clés de la signalisation, d'une part l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et, d'autre part, le diacylglycerol (DAG). Les PLC jouent un rôle majeur dans la physiologie des cellules eucaryotes, notamment en permettant l'activation des voies de transduction en aval des RTK. Il existe treize types de Phospholipase C chez les mammifères qui sont classés en six isotopes (β, γ, δ, ε, ζ, η) selon leur structure. Les activateurs des PLC sont divers (en fonction du sous-type considéré) mais comprennent principalement les petites protéines G (comme RAP2B ou RHOA), des protéines



tyrosine kinases (RTK), la voie calcique (Ca^{2+}) et les phospholipides (Figure 20) (McCudden et al., 2005). Les deux produits de la réaction catalysée par les PLC, le DAG et l'IP3, sont des messagers secondaires importants qui contrôlent de l'activation de nombreuses protéines du signal.

Figure 20: Schéma de la voie de signalisation PLC/PKC/PKD . (Adapté de *Spitaler & Cantrell, Nature Immunology,* 2004) *RTK: Récepteur tyrosine kinase ; Fyn: FYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase ; Src: SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase ; PKC: Protein Kinase C ; PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ; DAG: diacylglycerol ; PLC: phospholipases C ; PKD: Protein Kinase D ; Ras-GRP: RAS Guanyl Releasing Protein ; DGK: diacylglycérol kinase ; PA: acide phosphatidique.*

Parmi elles, les protéines kinases C (PKC) forment une famille de d'une douzaine de sérines/thréonines protéine kinases, présentant pour la plupart, un spectre d'expression ubiquitaire. Elles sont divisées en trois sous-familles en fonction de la structure de leur domaine N terminal. Les isoformes classiques comprennent les formes α, βI, βII, et γ qui sont activées par l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et par le DAG. Les nouvelles PKCs comprennent les isoformes δ, ε, η, et θ, dont l'activation est indépendante Ca^{2+}. Enfin, les PKC atypiques (aPKC ζ et ι/λ) sont dépourvues du domaine calcique et possèdent un domaine PB1 (Phox and Bem 1) impliqué dans les interactions protéine/protéine. Les aPKC sont activées par la kinase PDK1. Toutes les isoformes de PKC partagent un même domaine kinase situé dans la partie C terminale de la protéine (Figure 21) (Mellor and Parker, 1998; Pearce et al., 2010). Ces protéines ont un large éventail de substrats, correspondant à l'étendue des processus dans lesquels elles sont impliquées. Ces substrats comprennent des protéines contrôlant le cycle cellulaire (p21, p53), des facteurs de transcription (RelA, Stat3) ou des protéines du signal (Ras guanine-releasing protein 2, Raf). Elles peuvent également s'auto-activer et phosphoryler les membres de la famille PKD (cf infra) (Kang et al., 2012).

Les membres de la famille des PKC sont impliqués dans de très nombreux processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, la survie, la migration ou l'angiogenèse. Elles sont également des acteurs clés dans différents cancers et leur inhibition représente une stratégie thérapeutique prometteuse (Garg et al., 2014). Ainsi, l'enzastaurin, un inhibiteur des PKC, est capable de bloquer la prolifération, la survie et la migration des plasmocytes tumoraux et de réduire l'effet positif des cellules stromales sur la croissance des cellules de MM *in viro* (Podar et al., 2007). Dans des modèles murins de MM, l'enzastaurin a montré une bonne efficacité, en particulier en bloquant l'angiogenèse associée à la croissance des cellules myélomateuses. Bien que le mécanisme d'action de cette drogue ne soit pas clairement identifié, il semble qu'une part de son activité antitumorale repose sur sa capacité à inhiber l'activation de la voie AKT (Podar et al., 2007 ; Rizvi et al., 2006). Sur la base de ces résultats des études cliniques ont été menées et montrent une efficacité limité en monothérapie (Jourdan et al., 2014) et des réponses partielles en association avec le velcade (Ghobrial et al., 2011). Ainsi, l'inhibition de l'axe PKC présente un intérêt thérapeutique dans le MM.

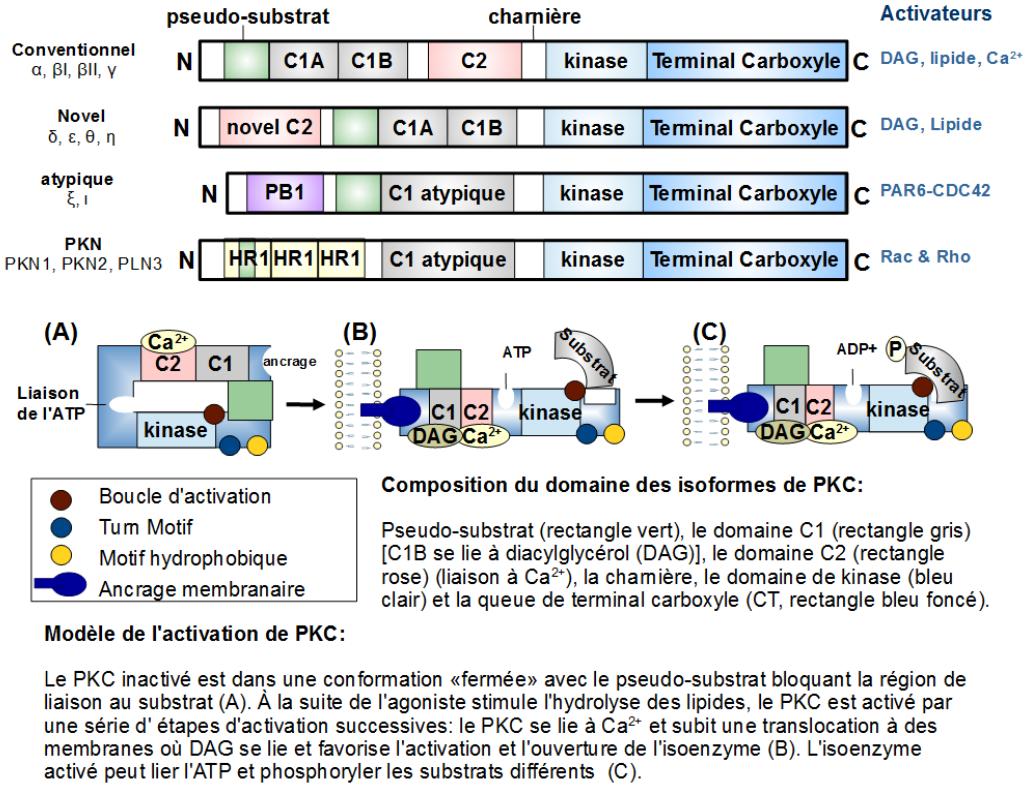


Figure 21 : Schéma des caractéristiques structurales des membres de la famille PKC et le modèle d'activation (Adapté de *Mellor et al., Biochem J, 1998 et Pearce et al., Nat Rev Mol Cell Biol.,* 2010). *HR1: Protein kinase C-related kinase homology region 1 (HR1) domain ; DAG: diacyglycerol.*

La protéine codée par le gène *PRKD2* est un des trois membres de la famille des protéines sérine/thréonine kinase D (PKD) qui comprend également PKD1/PKCμ et PKD3/PKCν. Les PKDs comportent toutes deux domaines dits C1 qui fixent le DAG, une région d'inhibition PH et un domaine kinase en N terminal. En réponse aux stimulations, notamment l'engagement des RTK, l'activité de la PLC produit du DAG qui active PKC et recrute les PKDs par leur domain C1 (Rozengurt et al., 2005). Ainsi, les PKDs peuvent être activées directement par la voie DAG, et par les PKC (Fu and Rubin, 2011). Comme les PKC, les PKDs possèdent un large éventail de substrats potentiels et les voies de signalisation en aval de ces kinases ne sont pas clairement identifiées aujourd'hui (Figure 22)(Navarro et al., 2014).

Chez la souris, Pkd2 joue un rôle important dans la réponse des cellules T à l'engagement du TCR, et son inactivation induit des défauts de production

d'immunoglobuline in vivo (Navarro et al., 2012). Cependant, son rôle dans la physiopathologie du MM est encore totalement inconnu.

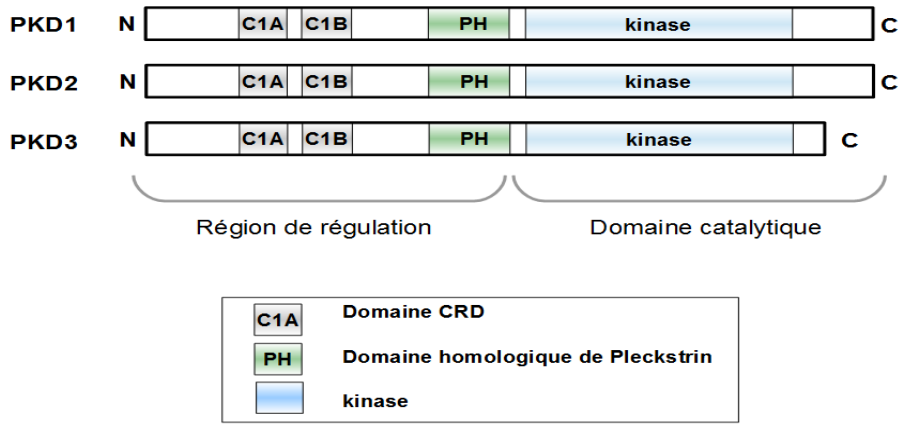


Figure 22: Schéma des caractéristiques structurales des membres de la famille PKD (Adapté de *Durand et al., J Clin Med,* 2016).

Deuxième partie : LE PAYSAGE MUTATIONNEL GLOBAL DANS LE MYÉLOME MULTIPLE

Face à la diversité des mécanismes participant à la progression du myélome et avec le développement des techniques d'analyse génétique globales par séquençage (Whole Genome Sequencing : WGS ou Whole Exome Sequencing : WES), plusieurs groupes ont cherché à identifier les événements génétiques moteurs de la myelomatogénèse. Aujourd'hui seules trois cohortes de patients atteints de MM ont été analysées par ces techniques, en incluant tous les sous-groupes de patients. La première étude a été réalisée par WES en 2011 sur 203 patients au diagnostic et en rechute (Chapman et al., 2011 ; Lohr et al., 2014). Les auteurs ont également analysé 23 cas par WGS. Une seconde cohorte de 67 malades au diagnostic a été étudiée par WES dont 15 cas ont pu être analysés également après rechute (Bolli et al., 2014). Enfin, la plus large série a été publiée en 2015 et comprenait 463 patients inclus dans le protocole XI du National Cancer Research Institute Myeloma (Université de Leeds) (Walker et al., 2015a).

Dans leur ensemble, ces études révèlent que, bien que le MM présente des signes d'instabilité génomique avec de fréquentes translocations, pertes et gains de chromosomes, la fréquence de mutations ponctuelles (SNV) est relativement faible (environ 1.5 SNV/Megabase) en comparaison de certaines tumeurs solides (>10/Mb dans le mélanome) et légèrement plus élevée que dans les cancers pédiatriques réputés génétiquement plus simples (0,5 SNV/Mb) (Lawrence et al., 2014). Par ailleurs, l'analyse approfondie des contextes dans lesquels surviennent les mutations dans un large spectre de tumeurs humaines a permis d'identifier 21 signatures indépendantes caractéristiques du processus de mutagénèse impliqué (Alexandrov et al., 2013). Parmi celles-ci, deux signatures semblent particulièrement associées au Myélome. La signature 1 représente des altérations relativement générales et correspond à un enrichissement de transitions C>T dans un contexte CpG. L'autre signature (signature 2), caractérisée par des transitions C>T, C>G et C>A dans un contexte TpC, est associée à une activité de membres de la famille APOBEC de cytidine déaminase dont appartient AID. Cette signature est particulièrement

associée au MM avec t(14 ;16) ou t(14 ;20) et est directement issue de la dérégulation des APOBEC par l'activité des facteurs de transcription MAF impliqués dans ces translocations (Walker et al, 2015b).

2.1 Mutations affectant les principales voies métaboliques et fonctions cellulaires des plasmocytes tumoraux.

A l'échelle nucléotidique, les altérations révélées par les travaux de séquençage ont identifiés une quinzaine de gènes mutés d'une façon récurrente dans le MM. Les mutations activatrices des gènes *NRAS*, *KRAS* (principalement sur les acides aminés 12) et *BRAF* (V600E) sont les plus fréquentes et affectent ensemble environ 40% des patients (Bolli et al., 2014 ; Lohr et al., 2014) mais sans réel impact sur leur pronostic (Walker et al., 2015a). Certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la voie NFκB, comme TRAF3, CYLD ou LTB, sont également mutés d'une façon récurrente et sont observées dans de 0.5 à 2% des cas. Les protéines régulatrices du cycle cellulaire ou de la réponse aux dommages de l'ADN, en particulier TP53 et ATM/ATR sont retrouvées mutées dans environ 15% des patients et sont associées à des évolutions cliniques plus défavorables (Walker et al., 2015a). Par ailleurs, les gènes contrôlant la différenciation des plasmocytes sont également altérés d'une façon récurrente. Ainsi, le gène *PRDM1* qui code pour le facteur BLIMP1, présente des lésions entraînant des pertes de fonction dans environ 3-5% des cas. De la même façon, le gène *IRF4,* un facteur clé de la différenciation des lymphocytes B, est muté dans environ 2-3% des MM, mutations qui semblent associées à un pronostique favorable (Walker et al., 2015a). Enfin, un groupe de gènes fréquemment mutés dans les MM mais sans fonction oncogénique précédemment établie a été décrit. Les gènes *DIS3* et *FAM46C* sont parmi les plus fréquemment retrouvés et représentent environ 10% des cas chacun. Ils sont aujourd'hui considérés comme des suppresseurs de tumeur.

2.2 Impact sur l'évolution clonale

A côté de l'identification des mutations ponctuelles récurrentes survenant dans le myélome, le développement des techniques de WES a permis d'analyser l'hétérogénéité intra-clonale des plasmocytes tumoraux. En effets, grâce à la

profondeur de séquençage, il est aujourd'hui possible de détecter des événements très minoritaires (< 10% du total des segments séquencés ou « reads » et parfois jusqu'à moins de 2%) et surtout de mesurer leur variation au cours de la progression de la maladie et en réponse aux traitements (Bolli et al., 2014 ; Walker et al., 2015a, Morgan et al., 2012). L'analyse des données de WES a ainsi pu confirmer l'hétérogénéité clonale du MM (entre 0 et 10 sous-clones différents) et jeter un éclairage nouveau sur la nature des événements fondateurs (Lohr et al., 2014 ; Bolli et al., 2014). Bien que l'interprétation des résultats en termes d'évolution clonale soit difficile du fait des limites de la profondeur de séquençage, il apparaît que certains gènes mutés comme *MAX, RB1, CCND1* ou *TP53* soient fréquemment présents dans le clone initial et pourraient représenter des événements fondateurs. A l'inverse, les altérations de *FAM46C* et *TRAF3* semblent survenir souvent dans des sous-clones et donc pourraient correspondre à des lésions tardives de la progression myélomateuse. D'une façon intéressante, les mutations des gènes N- et K-RAS peuvent être clonales ou sou-clonales et même, plus rarement, intervenir séquentiellement (Bolli et al., 2014). L'intégration de ces données a abouti à un modèle de progression du MM selon un modèle « darwinien », qui assure la sélection de certains clones en fonction de paramètres génétiques, environnementaux ou thérapeutiques (Figure 23) (Morgan G. et al., 2012).

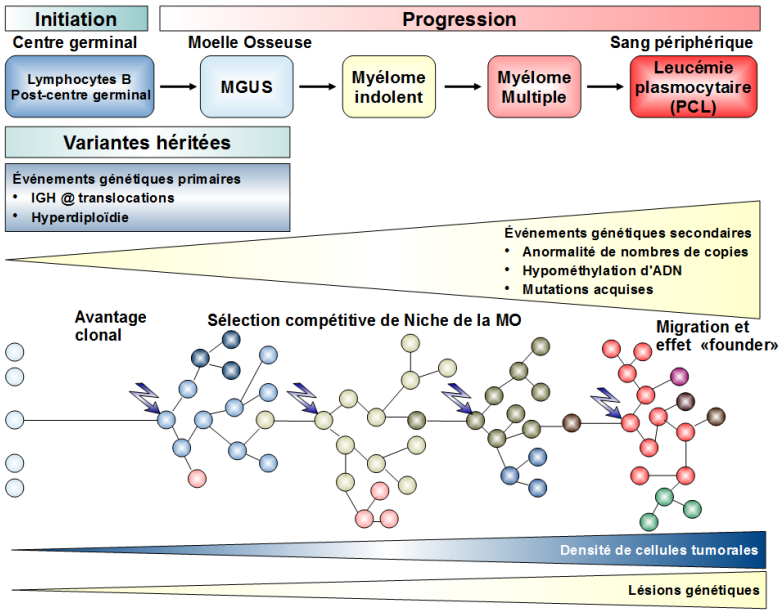


Figure 23 : *Modèle d'évolution clonale du myélome multiple (Adapté de Morgan et al., Nat Rev Cancer. 2012). MGUS : Gammapathie monoclonale de signification indéterminée.*

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Malgré des progrès thérapeutiques récents, le myélome multiple avec t(4;14) représente une des formes de MM les plus graves et reste une maladie incurable. Cependant ce sous-groupe, comme la majorité des myélomes, est hétérogène et les bases moléculaires de cette hétérogénéité sont mal connues.

Mon projet de thèse s'est d'abord intéressé à caractériser l'impact pronostique du point de cassure dans le locus WHSC1 qui produit différentes formes de l'histone méthyltransférase MMSET. Pour cela, j'ai déterminé par PCR la nature du transcrit de fusion IgH/MMSET dans une très large cohorte de patients avec t(4;14). En collaboration avec des cliniciens, j'ai corrélé mes résultats avec les données cliniques des maladies.
Dans une seconde partie, j'ai cherché caractériser les altérations génétiques associées au mauvais pronostic des MM t(4;14). J'ai mis en œuvre des techniques de séquençage du génome (Whole Exome Sequencing) et de séquençage d'ARN (RNA-seq) pour établir le paysage mutationnel chez 63 malades dont 6 présentaient un MM asymptomatique.

Mes résultats démontrent que le point de cassure MB4-2, produisant une protéine MMSET tronquée, est associé aux pronostics les plus défavorables lorsqu'il est associé à une délétion du chromosome 17p. Ils révèlent un paysage mutationnel spécifique des MM avec t(4;14), caractérisé notamment par de fréquentes mutations dans les gènes *ATM/ATR* ainsi que *PRKD2*, ce dernier codant pour la protéine kinase D2 (PKD2). Enfin, j'ai pu identifier cette famille de trois kinases comme étant des cibles thérapeutiques dans le MM et déposer un brevet couvrant l'utilisation d'un nouvel agent pharmacologique anti-myélomateux inhibant leur activité.

L'ensemble de mes résultats jette un éclairage nouveau sur le rôle de MMSET et de PKD2 dans la progression du myélome avec t(4 ;14).

Première partie :

Étude du pronostic des points de cassure de la translocation t(4 ;14).

Le myélome multiple avec t (4; 14) est présent dans 15% des patients et est associé à un pronostic péjoratif. Cependant, ce sous-groupe est hétérogène, est l'origine de cette hétérogénéité est encore mal connue. Des outils pronostiques capables de prédire l'évolution des différentes formes de gammapathies monoclonales avec t (4; 14) permettraient d'adapter la prise en charge des malades à leur risque effectif.

Dans cette première partie, nous avons déterminé les points de cassures (Bp) (MB4-1, -2 et -3) chez 294 patients avec la translocation t(4;14) présentant soit un myélome symptomatique (n = 256), soit asymptomatique (n = 38). Nous avons corrélé la nature du point de cassure à différentes données génétiques comme la délétion du chromosome 17 (del(17p)) et cliniques telles que la survie globale (OS) ou la survie sans progression (PFS).

Nos résultats démontrent que le point de cassure MB4-2 est rarement observé dans les MM asymptomatiques. Bien que le point de cassure ne soit pas associé à une réponse particulière aux traitements, les patients présentant un Bp MB4-2 ont une survie globale plus courte. Le pronostic est particulièrement défavorable lorsque le Bp MB4-2 est associé à la délétion du chromosome 17 (del(17p)).

Ces résultats montrent que le dépistage du point de cassure pourrait présenter un intérêt pour la prise en charge des malades avec t (4;14).

MB4-2 breakpoint in MMSET combined with del(17p) defines a subset of t(4;14) multiple myeloma with very poor prognosis

Multiple myeloma (MM) is a clonal plasma cell disorder, which remains incurable. The t(4;14) translocation is present in 15% of patients with symptomatic disease and, despite recent therapeutic improvements such as bortezomib treatment, still indicates a poor prognosis.[1,2] However, t(4;14) MM is a heterogeneous group, containing both "high risk" and "good risk" patients.[3] In addition, the translocation is also detected in some cases of indolent (stage I) MM and even in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).[4,5] Prognostic tools capable of predicting the evolution of the different forms of t(4;14) monoclonal gammopathies are currently lacking.

The t(4;14) translocation deregulates two potential oncogenes, *FGFR3* and *MMSET/WHSC1*. Previous studies have shown that *FGFR3* expression, which is lost in a subset of t(4;14) MM, does not have a significant impact on patients' survival.[6-9] The *MMSET* gene, which is overexpressed in all t(4;14) MM, encodes for a histone methyltransferase which is involved in tumor progression and genomic instability.[8,10-12] Three major breakpoints within the 5'coding region of *MMSET* (MB4-1, MB4-2 and MB4-3) have been observed at 4p16 on chromosome der(4).[7,11] Each breakpoint overexpresses a specific *IGH/MMSET* fusion transcript. While MB4-1 produces a full length MMSET protein, MB4-2 and MB4-3 give different truncated proteins. The aim of this study was to clarify the prognostic significance of each MB4 breakpoint in a large cohort of patients.

We investigated the MB4 breakpoint distribution and prognostic value in a cohort of 294 patients with t(4;14) monoclonal gammopathies including 38 asymptomatic patients (MGUS or stage I MM according to the Durie and Salmon classification) and 256 symptomatic MM patients diagnosed at the Hematology Laboratory of Paris Saint Louis and Nantes. In all cases, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using cDNA from purified $CD138^+$ bone marrow plasma cells at diagnosis to analyze expression of *FGFR3* and the *IGH-MMSET* fusion transcripts resulting from the three different breakpoints MB4-1, MB4-2 and MB4-3, as described previously.[13]

Among the 38 asymptomatic (MGUS/stage I MM) patients [(14 males and 24 females; median age 61 years (range, 35-78) with a median follow-up since diagnosis of 56 months)], RT-PCR analysis of the different *IGH/MMSET* fusion transcripts revealed a low percentage of the MB4-2 subtype (5%), compared to the MB4-1 and MB4-3 subtypes (74% and 21%, respectively). In contrast, among the patients with symptomatic MM, MB4-2 transcripts were expressed in 21% of cases, as compared to 62% for MB4-1, and 17% for MB4-3. Thus, the MB4-2 breakpoint is rarely observed in t(4;14) indolent monoclonal gammopathy, while it is significantly more frequent in t(4;14) symptomatic MM (P=0.0228) (Table 1). The characteristics of patients with symptomatic MM, including *FGFR3* expression, were similar in all MB4 subtypes at diagnosis (Table 1).

In each subgroup, about two-thirds of patients received

Table 1. Characteristics of MGUS/stage I MM (n=38) and patients with symptomatic MM (n=256), according to the MB4 breakpoint.

Breakpoint	MB4-1	MB4-2	MB4-3
MGUS/stage I MM n=38 (%)	28 (74)	2 (5)	8 (21)
Symptomatic MM n=256 (%)	159(62)	53 (21)	44 (17)
Median age (years)	58 (36-91)	56 (33-76)	59 (46-74)
IgA isotype n=101/235 (%)	57 (38)	25 (53)	19 (47)
Median % of bone marrow plasma cells (range)	22 (1-90)	29 (0-81)	36 (1-94)
Calcemia >2.7 mmol/L n=30/137 (%)	19 (22)	7 (27)	4 (17)
Creatinine>170 µmol/L n=27/138 (%)	14 (16)	5 (19)	8 (35)
Elevated lactate dehydrogenase n=29/102 (%)	16 (25)	4 (21)	3 (21)
Anemia (hemoglobin<10 g/dL) n=74/137 (%)	46 (52)	13 (52)	15 (65)
International Staging System (ISS) n=134 (%)			
ISS 1	20 (30)	6 (33)	4 (20)
ISS 2	27 (41)	4 (22)	8 (40)
ISS 3	19 (29)	8 (44)	8 (40)
FGFR3 expression n=256 (%)			
Yes	129 (81)	43 (81)	36 (82)
No	30 (19)	10 (19)	8 (18)
Treatment n=256 (%)			
Bortezomib-based regimen	109 (69)	41 (77)	31 (70)
Bortezomib+immunomodulatory drug	28 (18)	17 (32*)	4 (10)
High dose therapy + ASCT	113 (71)	40 (75)	34 (77)
Response n=142 (%)			
Overall response	68 (78)	24 (89)	20 (76)
>Very good partial response	44 (49)	19 (70*)	12 (44)
Partial response	24 (29)	5 (19)	8 (32)
Stable disease	8 (10)	0 (0)	2 (8)
Progressive disease	8 (10)	3 (11)	3 (12)

*Significant differences between the three groups: percentage of response superior to very good partial response (P=0.049) and percentage of immunomodulatory drug-based regimen (P=0.0228).

a bortezomib-containing regimen in frontline therapy and two-thirds of patients had an autologous stem cell transplant. Only four patients received such a transplant after relapse. A combined immunomodulator-bortezomib regimen was used more frequently in MB4-2 patients (32%) than in MB4-1 (18%) (P=0.026) or MB4-3 (10%) patients (P=0.0014).

Overall response rates to the first-line therapy, according to International Myeloma Working Group statements[12] were 78%, 89% and 76% in the MB4-1, MB4-2 and MB4-3 sub-groups, respectively. Interestingly, 70% of MB4-2 patients achieved a very good partial response or better, as compared to 49% and 44% of patients with MB4-1 and MB4-3, respectively (P=0.049). Thus, MB4-2 breakpoint was associated with a better quality of response to the front-line treatment, possibly as a result of a more frequent use of a combination of immunomodulatory drugs plus bortezomib.

The prognostic impact of each breakpoint (MB4-1, MB4-2 or MB4-3) was analyzed by comparing patients' outcome (event-free survival, overall survival, survival after the first relapse) using Kaplan-Meier analysis. As shown in Figure 1B, with a median follow-up of 33 months, there was no evidence that event-free survival of the three subgroups was different (P=0.26). In contrast, the overall survival of patients with the MB4-2 breakpoint was shorter than that observed in patients with the other breakpoints (P=0.022) (Figure 1A). Accordingly, survival after first relapse was reduced in the MB4-2 subgroup (median overall survival: 14.6 months *versus* 23.7 months, P=0.036) (Figure 1C). In multivariate analysis testing MB4 breakpoints, hemoglobin level, calcemia, serum beta-2 microglobulin level and International Staging System score as survival parameters, MB4-2 was an independent prognostic factor for survival [hazard ratio (HR)=1.8; 95% confidence interval (CI): 1.05-3.08; P=0.03)] along with hypercalcemia (HR=3.4; 95%CI: 2.04-5.81; P<0.0001). Thus, symptomatic t(4;14) MM patients with the MB4-2 breakpoint are sensitive to first-line therapy, but develop chemo-resistant relapse and have a poorer outcome.

To further investigate the impact of WHSC1 breakpoints on the outcome of patients with t(4;14), deletion of chromosome 17 at p13 [del(17p)], which is associated with high-risk MM, was analyzed by fluorescence in situ hybridization at diagnosis in 162/256 cases for which tumor plasma cells were available. Overall, del(17p) was detected in 34 out of 162 cases (21%). Only 5/34 patients (2 MB4-1, 1 MB4-2 and 2 MB4-3) had a del(17p) in less than 60% of plasma cells (31-45%). The presence of del(17p) was associated with a shortened survival (median survival: 21 *versus* 40 months, P=0.00766) (*data not shown*). The del(17p) was statistically more frequently

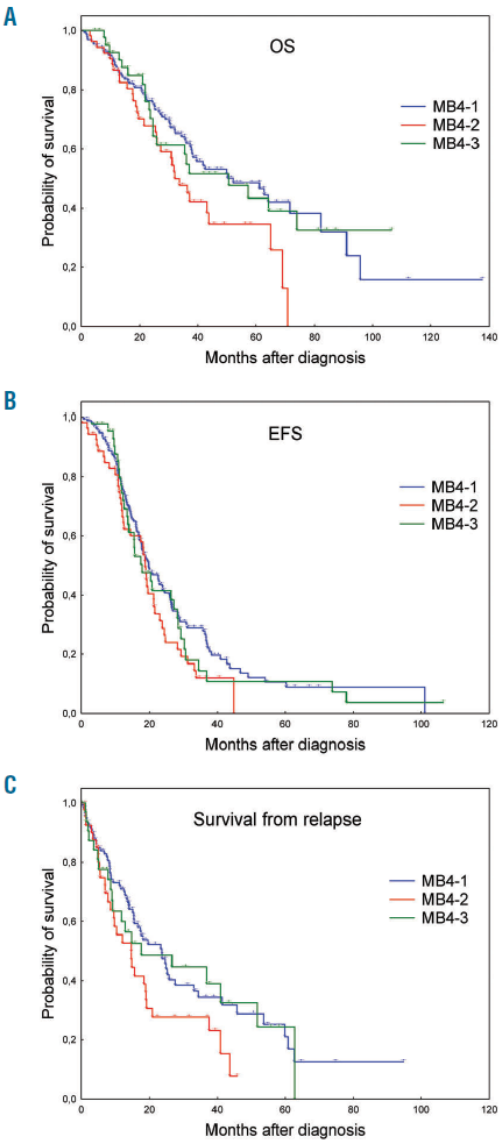


Figure 1. (A) Overall survival (B) event-free survival and (C) survival after the first relapse of the 256 patients with symptomatic MM according to the MB4 breakpoint. MB4-1 (n=159): blue curve, MB4-2 (n=54): red curve and MB4-3 (n=43): green curve. In (B) and (C), statistical significance between MB4-2 and the two other subgroups were P=0.022 and P=0.036, respectively (Kaplan-Meier analysis).

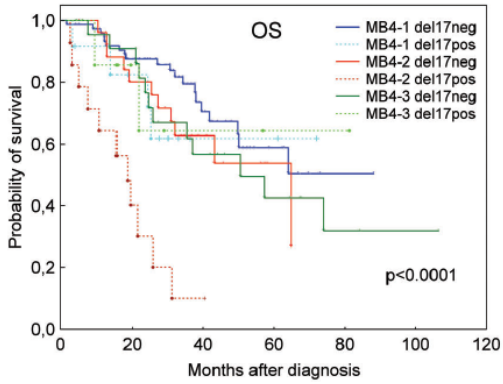


Figure 2. Overall survival of the 162 patients in whom fluorescence *in situ* hybridization 17p analysis was available, according to the MB4 breakpoint and del(17p). Statistical significance between MB4-2 del(17p) positive (pos.) and the other subgroups was P<0.0001. (Kaplan-Meier analysis) (MB4-1: del17 neg: n=77, del 17 pos n=13; MB4-2: del17 neg n=27, del17 pos n=14; MB4-3: del17 neg n=24, del17 pos n= 7).

found in tumor cells with MB4-2 (14/41, 34%) as compared to MB4-1 breakpoint (13/90, 14%) (P=0.0216) but was found at a similar rate in plasma cells with MB4-3 breakpoints (7/31, 28%) (P=0.292). The frontline therapy was similar in the del(17p)-positive and -negative MB4 groups. Interestingly, among patients with del(17p), those with the MB4-2 breakpoint had a shorter overall survival than those with the MB4-1 or MB4-3 breakpoint with a median overall survival of 18.6 months (P<0.0001) (Figure 2). In contrast, the MB4 breakpoint had no impact on overall survival in the absence of del(17p) (Figure 2). In multivariate analysis of patients for whom del(17p) status was determined (n=50), MB4-2 was an independent marker of survival (HR: 2.12; 95% CI: 1.20-3.73; P=0.009). These results indicate that patients with del(17p) and the MB4-2 breakpoint constitute a subset of very high risk patients with a very poor prognosis.

Our results contrast with those of a previous study by Keats *et al.*, who found a similar overall survival in the different MB4 subgroups[11]. However, in that study, survival analysis was performed on a smaller number of patients (n=43). In addition, the survival analysis compared patients with MB4-1 (n=30) to the pooled MB4-2 and MB4-3 subgroup (n=13), according to their ability to encode a full length or a truncated MMSET protein. Pooling MB4-2 and MB4-3 cases may have masked the specific prognostic value of the MB4-2 breakpoint.

At present, the molecular basis for the particularly poor prognosis associated with the MB4-2 breakpoint is not clear. Recent studies have shown that over-expression of MMSET triggers a genome-wide increase of H3K36 dimethylation and drives oncogenic properties *in vitro*.[9-13] In addition, increased H3K36 dimethylation was reported in a series of children with pediatric acute lymphoblastic leukemia expressing mutated or MB4-2-like truncated MMSET.[14,15] Thus, it is possible that the higher genome-wide level of H3K36me2 resulting from over-expression of a truncated MB4-2 MMSET protein could render tumor plasma cells more sensitive to first-line therapy, but could eventually drive the emergence of chemoresistant clones that could shorten patients' survival.

MMSET has also been implicated in the cellular response to DNA damage through its H4K20 histone methyltransferase activity.[10] This function requires the phosphorylation of serine 102 by the ATM protein, which facilitates the binding of MMSET at DNA double-strand breaks and the recruitment of 53BP1.[10] The removal of Ser102 in truncated MMSET isoforms might therefore enhance genomic instability and promote the emergence of resistant clones in patients. However, Ser102 is deleted in the forms derived from both MB4-2 and MB4-3, and so differential effects on DNA damage are unlikely to account for the different clinical outcomes observed for these two breakpoints. One potentially important difference between MB4-2 and MB4-3 could relate to the position of these breakpoints relative to the 5' PWWP domain involved in protein-protein interactions. While the MB4-3 breakpoint leads to a truncated MMSET protein lacking the entire PWWP domain, the product expressed from MB4-2 product retains part of this domain.[11] Future studies will need to address whether these truncated MMSET proteins could interact with different partner proteins and exert different activities on histone H3 and H4, with specific impact on patients' outcome.

In our study, a high frequency of del(17p) was observed in plasma cells overexpressing the MB4-2-derived truncated form of MMSET. The combination of both genetic abnormalities severely impairs patients' outcome. In this retrospective study, del(17p) was specifically included as it was the only poor prognostic marker which had been determined in a large proportion of patients. It is now important to investigate the clinical interactions between the different MMSET breakpoints and other genetic markers associated with poor prognosis, including gain of 1q, del(12p) and del(17p), in prospective studies.

Together, our results indicate that the breakpoint within the MMSET locus may explain, in part, the prognostic heterogeneity of t(4;14) gammopathies. Thus, a systematic identification of the MB4 breakpoint, along with screening for a del(17p), may be useful in the management of patients with t(4;14) MM and may pave the way for specific therapies targeting MMSET activity.

Anne Lazareth,[1,2,3] Xiu-Yi Song,[2,3] Aurelie Coquin,[4] Stephanie Harel,[5] Lionel Karlin,[5] Karim Belhadj,[7] Damien Roos-Weil,[8] Laurent Frenzel,[9] Jerôme Tamburini,[10] Margaret Macro,[11] Sylvie Chevret,[12] Hervé Avet Loiseau,[13] Stephane Minvielle,[14] Jean Paul Fermand,[1,2,3] Jean Soulier,[4] Jean Christophe Bories,[2,3] and Bertrand Arnulf[1,2,3]

[1,2]Immuno-Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris; [2]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; [3]INSERM UMR 1126 Institut Universitaire d'Hématologie, Paris; [4]Biological Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris; [5]Hematology, Avicenne Hospital, Bobigny; [6]Hematology, University Hospital, Lyon; [7]Hematology, Henri Mondor Hospital, Creteil; [8]Hematology, Pitie Salpetriere Hospital, Paris; [9]Hematology, Necker Hospital, Paris; [10]Hematology, Cochin Hospital, Paris; [11]Hematology, Caen Hospital; [12]Biostatistics, Saint-Louis Hospital, Paris; [13]Biological Hematology, Purpan Hospital, Toulouse, and [14]University Hospital, Nantes, France

Correspondence: bertrand.arnulf@sls.aphp.fr
doi:10.3324/haematol.2015.127001

Key words: t(4;14) translocation, heterogeneity, MB4 breakpoint, MMSET, prognostic factor.

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). J Clin Oncol. 2010;28(30):4630–4634.
2. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. Blood. 2002;100(5):1579–1583.
3. Moreau P, Attal M, Garban F, et al. Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. Leukemia. 2007;21(9):2020–2024.
4. López-Corral L, Gutiérrez NC, Vidriales MB, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. Clin Cancer Res. 2011;17(7):1692–1700.
5. Karlin L, Soulier J, Chandesris O, et al. Clinical and biological features of t(4;14) multiple myeloma: a prospective study. Leuk Lymphoma. 2011;52(2):238–246.
6. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood. 2003;101(4):1520–1529.
7. Chesi M, Nardini E, Lim RS, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood. 1998;92(9):3025–3034.
8. Marango J, Shimoyama M, Nishio H, et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. Blood. 2008;111(6):3145–3154.
9. Kuo AJ, Cheung P, Chen K, et al. NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. Mol Cell. 2011;44(4):609–620.
10. Pei H, Zhang L, Luo K, et al. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. Nature. 2011;470(7332):124–128.

11. Keats JJ, Maxwell CA, Taylor BJ, et al. Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16;q32)-positive multiple myeloma patients. Blood. 2005;105(10):4060–4069.
12. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia. 2009;23(1):3–9.
13. Chandesris MO, Soulier J, Labaume S, et al. Detection and follow-up of fibroblast growth factor receptor 3 expression on bone marrow and circulating plasma cells by flow cytometry in patients with t(4;14) multiple myeloma. Br J Haematol. 2007;136(4):609–614.
14. Jaffe JD, Wang Y, Chan HM, et al. Global chromatin profiling reveals NSD2 mutations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2013;45(11):1386–1391.
15. Oyer JA, Huang X, Zheng Y, et al. Point mutation E1099K in MMSET/NSD2 enhances its methyltranferase activity and leads to altered global chromatin methylation in lymphoid malignancies. Leukemia. 2014;28(1):198–201.

Deuxième partie :

Étude des mutations caractérisant les Myélomes avec t(4 ;14).

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai poursuivi la caractérisation de l'hétérogénéité pronostique des MM t(4 ;14). Grâce au développement outils génétiques à hauts débits, j'ai entrepris l'identification par séquençage global (Exomes et RNAseq) des altérations génétiques associées à ce sous-groupe de MM. Mes résultats, obtenus sur 58 échantillons au diagnostic, révèlent des signatures mutationnelles particulières affectant les MM t(4;14).

En particulier, ils révèlent que les gènes *FGFR3, NRAS, KRAS* et *BRAF*, ainsi que ceux codant pour les protéines MAPK sont mutés dans environ 65% des cas. Ils mettent également en évidence une fréquence plus élevée de mutation dans les gènes *ATM/ATR* et *PRKD2*, chacun altéré dans environ 11% des cas. D'une façon remarquable, les mutations du gène *PRKD2* ne sont retrouvées que dans les plasmocytes tumoraux portant la t(4 ;14) et l'inhibition pharmacologique de la sérine/thréonine kinase PKD2, codée par *PRKD2*, bloque la prolifération *in vitro* des plasmocytes tumoraux portant cette mutation.

Ces résultats, qui définissent un paysage mutationnel propre aux MM t(4 ;14), identifient PKD2 comme une nouvelle cible thérapeutique dans le MM et suggèrent un lien fonctionnel entre *PRKD2* et *MMSET* dans la progression myélomateuse.

Global genomic analysis of newly diagnosed t(4;14) multiple myeloma reveals a specific mutational spectrum and identifies PKD2 as a potential therapeutic target.

Xiu Yi Song[1], Raphael Szalat[2], Alexis Talbot[1], Mehmet Samur[2], Aurélie Coquin[3], Wendy Cuccuini[3], David Garrick[1], Michele Goodhardt[1], Nikhil C. Munshi[2], Stéphane Minvielle[4], Hervé Avet Loiseau[5], Jayendra Shinde[6], Eric Letouzé[6], Jean-Paul Fermand[1,7], Bertrand Arnulf[1,7] and Jean-Christophe Bories[1].

[1] INSERM, UMR 1126, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France;
[2]LeBow Institute for Myeloma Therapeutics and Jerome Lipper Center for Multiple Myeloma Research, Harvard Medical School, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, United States;
[3]Biological Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris, France;
[4] Unité Mixte de Génomique du Cancer, Centre Hospitalier Universitaire, INSERM U892, Nantes, France ;
[5]Biological Hematology, Purpan Hospital, Toulouse, France;
[6]INSERM, UMR 1162, Institut Universitaire d'Hematologie, Université Paris Diderot, Université Paris Descartes, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France ;
[7]Immuno-Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris, France ;

Correspondance to : Jean-Christophe Bories, INSERM UMR 1126, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital St. Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris cedex 10, France; jean-christophe.bories@inserm.fr.

Runing title : The mutational spectrum t(4;14) multiple myeloma identifies PKD2 as a potential therapeutic target.

Keywords : Multiple Myeloma, t(4;14) translocation, exome sequencing, PKD2

Abstract

In Multiple Myeloma (MM), the t(4;14) translocation is associated with a poor outcome. However, beside this translocation, the genetic events which determine the adverse evolution of the disease and resistance to treatments remain elusive. Here we performed global exome or RNA sequencing analysis of samples from 6 asymptomatic and 58 newly diagnosed symptomatic t(4;14) MM. We found that the number of mutations was significantly higher in samples with the Del(17p) but was not affected either by the stage of the disease or by the molecular breakpoint of the t(4;14). In addition to alterations in KRAS, NRAS, TP53 and DIS3, the genes coding for FGFR3, MAPK, ATM and PRKD2 were relatively frequently mutated and accounted for 20%, 14%, 11%, and 11% of symptomatic cases, respectively. In the NCI-H929 MM cell line, which is mutated for PRKD2, we observed elevated levels of phosphorylated PKD2, the serine/threonine kinase encoded by PRKD2. Furthermore, pharmacological inhibition of PKD reduced proliferation and induced apoptosis of MM cells in vitro. These results define a specific mutational landscape for t(4;14) MM and identify PKD2 as a potential therapeutic target in MM patients.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is an incurable hematological disorder that arises from the transformation of a plasma cell through a stepwise genetic mutational process (Morgan et al., 2012). MM is a heterogeneous disease and despite recent therapeutic progress, while some patients show long term survival, many others respond poorly to treatments and have short overall survival. There are two major cytogenetic events which are known to correlate with these variable clinical outcomes, namely copy number abnormalities (CNAs) and translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus on chromosome 14 (Avet-Loiseau et al., 2007). Hyperdiploidy is the most frequent CNA, which is observed in more than 50% of cases and is associated with favorable prognosis (Avet-Loiseau et al., 2009). Conversely, other CNAs such as the common del(17p), del(1p) or gain(1q), which are found in approximatively 10%, 9% and 38% of patients respectively, are associated with adverse prognosis. In addition, the t(11;14) translocation, which affects around 15% of the patients, indicates a favorable prognosis, while the translocations t(4;14), t(14;16) and t(14;20), which respectively account for 15%, 4% and 1% of cases, are associated with poor outcomes (Avet-Loiseau et al., 2007; Avet-Loiseau et al., 2009; Fonseca et al., 2003). However, these CNAs and translocations are also detected in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) which is regarded as the pre-tumor stage of MM (Fonseca et al., 2002), indicating that additional events likely cooperate with these initial genetic lesions to induce the development of the disease. This is demonstrated clearly by the subgroup of MM patients bearing the t(4;14) translocation. Although this subgroup is characterized by an overall poor prognosis, within the group there is still considerable heterogeneity, with both “high risk” and “standard risk” patients (Moreau et al., 2007). In addition, the t(4;14) translocation has been seen in some cases of asymptomatic MM as well as in patients with MGUS (Karlin et al., 2011), suggesting that, beside the translocation itself, each patient undergoes specific oncogenic processes. Unlike other translocations recurrently affecting tumor plasma cells, the t(4;14) deregulates two genes, namely *FGFR3* and *MMSET*. Although *FGFR3* was initially suggested to be the driver oncogene in t(4;14) MM, it is lost by deletion of the der(14) chromosome in about 30% of cases, pointing towards a dominant role of MMSET during transformation (Keats et al., 2003). Recently, we have shown that del(17p), when occurring in patients expressing a truncated MMSET protein from the MB4-2 breakpoint translocated allele indicates an especially poor prognosis (Lazareth et al., 2015). However, the genetic abnormalities specific for t(4;14) MM or those associated with their adverse outcomes are yet to be characterized.

The recent development of next generation sequencing has led to the identification of numerous somatic genetic aberrations affecting tumor plasma cells (Bolli et al., 2014; Chapman et al., 2011; Lohr et al., 2014). Activating mutations in *NRAS, KRAS* and *BRAF* occur frequently and together affect more than 43% of MM patients independently of the initial genetic lesions that characterize MM subgroups (Lohr et al., 2014). Other genes such as T*RAF3, CYLD, DIS3* or *FAM46C* are also mutated, however, none of these lesions appear to have an impact on the survival of patients (Walker et al., 2015a). In contrast, mutations in *CCND1*, which regulates cell cycle, and alterations in the *TP53, ATM* or *ATR* genes, which are involved in the response to DNA damage, all indicate adverse prognosis (Walker et al., 2015a). Similarly, deregulation of MYC, which occurs via translocation or amplification in all subgroups of MM, is associated with shorter overall survival (Walker et al., 2014). Thus, genome/exome sequencing is a powerful approach to establish correlations between specific genetic alterations and patients outcomes.

Here we analyzed two sets of 24 and 40 samples from t(4;14) MM at presentation by exome or RNA sequencing, respectively. Our work confirms the high mutational rates in the *NRAS, KRAS, BRAF* and *FGFR3* genes which have been previously described, and strongly suggests that these events are mutually exclusive in t(4;14) MM. Mutations in *ATM/ATR, MAPK* and *MYCBP2* occur at relatively high frequencies (11%, 14% and 8% respectively), while very few t(4;14) patients carry alterations in *FAM46C* or *CCND1*. Mutations in *PRKD2*, the gene coding for the PKD2 serine/threonine kinase, affect around 11% of the cases and this alteration is associated with progression to symptomatic myeloma in one patient. Inhibition of PKD2 activity by kb NB 142-70 induces cell growth arrest and apoptosis of tumor plasma cells *in vitro*. Our results identify a specific mutational landscape for t(4;14) MM and suggest that PKD2 is a potential therapeutic target in these patients.

Results

Landscape of genetic alterations in t(4;14) MM

We analyzed 24 tumor-normal paired samples from 23 patients with t(4;14) MM using whole exome sequencing (WES), copy number variation and cytogenetics. Among those, 6 samples were collected from asymptomatic patients and 18 were collected from symptomatic myeloma at diagnosis. One patient (P6) had samples collected at the asymptomatic stage and after progression (symptomatic stage). The 3 molecular breakpoints (MB) of the translocation within the *WHSC1/MMSET* gene, referred to as MB4-1, -2 and -3, were determined in 17 samples. Nine symptomatic patients displayed a del(17p) by FISH, while none of the asymptomatic cases had this aberration. Copy-number alterations, which were analyzed from the exome sequencing data, identified known recurrent aberrations occurring in t(4;14) MM such as del(1p), (+1q), del(13), del(14q) and del(17p). Gain of chromosomes 3, 7 and 15 was observed in 1 of the 6 asymptomatic patients but was not detected in symptomatic MM (Supplementary Figure 1). Exome sequencing of the 24 samples led to the identification of 641 non-silent coding mutations, 337 silent variants in coding sequences and 51 insertion/deletion (indels) for a total of 1029 lesions (mean 42.88 variants per sample ± 18.19) (Figure 1A). There was no correlations between the number of variants and the molecular breakpoint or the stage of disease, however patients with del(17p) displayed higher numbers of both nonsynonymous and total mutations (mean 34.74 and 55.75 variants per sample respectively) compared to the non del(17p) cases (mean 22.69 and 36.44 variants per sample respectively) (Supplementary Figure 2).

To explore whether t(4;14) MM experienced specific mutational processes, we extracted the mutational signatures using context dependent base substitutions from the exome sequencing data available from 24 samples. In line with previous studies (Alexandrov et al., 2013; Bolli et al., 2014), signatures corresponding to a generic mutation pattern with enrichment of C>T transitions at CpG dinucleotides (Signature 1 in Figure 1B) or characterized by T>C mutations (Signature 5 in Figure 1B), accounted for the majority of variants in t(4;14) patients. Two additional signatures (Signature 2 and 13 in Figure 1B), characterized by C>T, C>G and C>A mutations in a TpC context, which are thought to arise from over-activity of members of the APOBEC family of cytidine deaminases, also contributed to the mutational spectrum but affected a minority of variants (Figure 1B). Overall, we found that there was a bias towards C>T transition, independently of the transcribed strand, in all t(4;14) MM, including asymptomatic cases (Figure 1C and D and

Supplementary figure 3). Thus, our t(4;14) MM display a mixture of several mutational signatures, with a prevalence of C>T transitions.

We next analyzed our exome data set to identify genes that were mutated in at least two of the 18 symptomatic patients and could therefore represent driver events in t(4;14) MM (Figure 2A). Non silent mutations in the *FGFR3* gene were found in 4 cases (22%) and affected both extra- and intra-cellular domains of the receptor (Supplementary figure 4). Activating mutations in *KRAS* or *NRAS* (affecting codons 12, 13, and 61) were present in 5 (27%) and 2 (11%) patients, respectively, while *BRAF* (V600E) was mutated in a single case. Of note, alterations in *FGFR3, NRAS, KRAS* and *BRAF* appeared all mutually exclusive. However, analysis at the reads level revealed that in most cases, the tumor contained a small proportion (<0.5%) of reads bearing an activating mutation in a second one of these genes, suggesting the presence of minor sub-clones carrying this variant (data not shown). In addition, we found mutations in genes encoding members of the mitogen-associated protein kinase (MAPK) family in 2 patients (9.5%), including *MAP2K7* (S311L) and *MAP4K4* (S758F). Altogether, mutations of genes involved in the FGFR3/RAS/BRAF/MAPK pathway were the most prevalent (14/18 patients). Interestingly, *PRKD2*, a gene coding for the PKD2 serine/threonine kinase, appeared mutated in 4 patients (22%). We also identified mutations in the DNA damage response genes *TP53* and *ATM* in 1 and 3 cases respectively. Furthermore, the gene expressing the long non-coding RNA, *MALAT1* (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) was mutated in 4 cases, including one patient (P6) who carried two independent lesions at the asymptomatic stage as well as after progression to a symptomatic stage (Figure 2A). Beside these relatively frequent alterations, we found mutations in other genes, namely *DIS3* (2/18), *DENND3* (2/18), and *MAX* (2/18) (Figure 2A). Of note, mutations in *FGFR3* were observed in 2 asymptomatic cases, while *KRAS*, *MAP3K13* (A667V) and *EZH2* mutations were found in a single patient each (Figure 2A left).

To validate and extend the search for mutations, we performed RNA-seq on 40 additional t(4;14) MM patients at diagnosis and analyzed the mutational profiles of transcribed genes (Figure 2B). In line with the exome sequencing data, we found mutations in *FGFR3, KRAS, NRAS* and *BRAF* in 8 (20%), 3 (7.5%), 4 (10%) and 2 (5%) patients, respectively. Again, these alterations were all mutually exclusive. Six cases (15%) carried a non-silent mutation in at least one member of the *MAPK* family. *MAP3K4* was mutated in 4 patients including 3 cases with a G538R substitution. Mutations in *ATM/ATR* and *PRKD2* were relatively frequent and were present in 4 (10%) and 3 (7.5%) cases, respectively. Other genes such as *MYCBP2*, *MKI67* and *DNND3*, which were altered in a single case in the cohort

analyzed by WES, were found mutated by RNA-seq in 4, 3 and 1 patients respectively. One patient, carried a mutation in *TP53*. Interestingly, for both this patient and the patient from the WES cohort, mutation in TP53 was associated with del(17p). Two further genes, *MYCBP2* and *MKI67*, were each independently mutated in 3 of the 40 patients (7.5%) screened by RNA-seq (Figure 2B).

Compared to previously published series (Bolli et al., 2014; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2015a), the pooled results of WES and RNA-seq reveal that *NRAS* and *KRAS* are less frequently mutated (15% and 8% respectively) in the symptomatic t(4;14) MM subgroup than in total MM, while mutations in *FGFR3* were more frequent (20%) (Supplementary Figure 4). Overall, in our study the *FGFR3/RAS/BRAF/MAPK* genes were mutated in 37/58 (63%) t(4;14) MM. In addition, we found marked elevated frequency of mutations in *PRKD2* (12%), *ATM/ATR* (12%) and *MYCBP2* (8.6%), reduced frequency in *FAM46C* (1.7%) and no mutation in *TRAF3* and *CCND1*. Of note, among the 67 MM sequenced by Bolli and colleagues, none of the non t(4;14) patients were mutated in *PRKD2*, suggesting that this genetic lesion might be associated with t(4;14) MM. Altogether, our results define a specific mutational landscape for t(4;14) MM, including prevalence of mutation in members of the *FGFR3/RAS/BRAF/MAPK* pathway, elevated frequency of *ATM/ATR* or *PRKD2* alterations and decreased mutation rates in *FAM46C, TRAF3* and *CCND1*.

Non-silent mutations in PRKD2 correlates with MB4-1 or -3 breakpoints and is associated with disease progression in one t(4;14) patient.

We next investigated the correlation between the mutations occurring in our cohort of 64 t(4;14) MM samples and several recurrent cytogenetic abnormalities. We found that mutation in *ATM/ATR* were strongly associated with the MB4-2 Bp and significantly correlated with mutations affecting genes coding for members of the MAPK family (Figure 3A). As expected from the mutually exclusive occurrence of mutations in *NRAS, KRAS, BRAF* and *FGFR3* (Figure 3A), there was a negative correlation between mutations in *FGFR3* and those occurring in *NRAS*, *KRAS* and *BRAF* (pooled together). Last, we observed a positive correlation between non-silent mutations in *PRKD2* and the MB4-1 or -3 Bp.

To get further insights into the mechanisms associated with progression of t(4;14) MM, we analyzed the evolution of the mutational landscape in one patient (P6) with serial samples collected at diagnosis and 33 months later, at time of progression from asymptomatic to symptomatic MM. From the exome sequencing data, we first analyzed the copy-number variation to characterize clonal evolution from large scale genomic aberrations over time. We found no major changes in copy-number, with similar loss within chromosome 8, 13, 18 and

22 in early and late samples (Figure 3B). In contrast, in addition to initial alterations, non-silent mutations in *LRFN1*, *NOL12*, *ZCCHC4* and *PRKD2* genes, which were barely (or not) detectable in the early sample, were each present in around 20% of the reads in the late sample (Table 1). From the percentages of mutated reads at each altered gene, and assuming that there was similar contamination of non-tumor cells in the early and late samples, we clustered point mutations based on clonality and plotted the fraction of tumor cells harboring each variant on the x axis for the early asymptomatic sample, and on the y axis for the late sample (Figure 3D). This representation clearly shows the linear evolution of the tumor during symptomatic disease progression with appearance of additional mutations. Thus, in the absence of copy-number variation, mutations in only 4 genes, including *PRKD2*, are associated with progression from asymptomatic to symptomatic MM in this t(4;14) patient.

PRKD2 is expressed in tumor plasma cells and is mutated in t(4;14) MM cell lines

Our exome and RNA sequencing results pointed towards a role of PKD2, the protein encoded by the *PRKD2* gene, in the progression of a subset of t(4;14) MM. To get insights into the role of PKD2 in MM, we searched for *PRKD2* mutations in the publicly available sequence data of a series of more than 60 MM cell lines accessible at the Translational Genomics Research Institute (https://myelomagenomics.tgen.org/). Three cell lines, namely NCIH929, JIM1 and JIM3, all carrying a t(4;14) translocation, display missense mutations in *PRKD2*, leading to I582T, V385E and V385E substitutions, respectively, which were confirmed by Sanger sequencing of cDNA (Supplementary Table 2 and data not shown). A fourth t(4;14) bearing cell line, KMS 18, has a silent mutation in *PRKD2*, while JJN3 t(14,16) and JMW1 t(4;14) display a fusion of this gene with *NCOA3* and *POLD1*, respectively. These observations are consistent with our results in MM patients and show that single nucleotide variants in the coding sequence of *PRKD2* preferentially affect t(4;14) tumor plasma cells.

Next, we analyzed a publically available expression array to investigate *PRKD2* expression in the tumor plasma cells from a large cohort of MM patients. We found that *PRKD2* is transcribed in MM cells and that its expression is not restricted to a specific sub group of patients (Figure 4A). In line with this, we found that the PKD2 protein is expressed in plasma cells isolated from 3 patients as well as in several MM cell lines, except LP1 (Figure 4B). The PKD serine/threonine kinases share two C1-domains, which bind diacylglycerol and phorbol esters (PMA) and an auto-inhibitory PH-domain. Upon stimulation, both PKC-dependent and -independent activation of PKDs occur at serine residues. Phosphorylation of both Ser707 and Ser711 in the activation loop of the kinase domain is followed by trans- or auto-phosphorylation at Ser876 in the C-terminal region which marks the activation of the protein

(Fu and Rubin, 2011). To explore the activation status of PKD2 in MM cells, we performed western blot analysis of PKD2 phosphorylation at serine 876 (p-PKD2) in MM cells. We found low levels of p-PKD2 in tumor plasma cells from patients as well as in U266, MM.1S and RPMI8226 cell lines (Figure 4B). In contrast, PKD2 was overexpressed in NCI-H929 where there was a marked elevated level of p-PKD2. Surprisingly, JIM3 cells, which like NCI-H929 carry a mutation in the PRKD2 gene, weakly expressed PKD2. Despite low PKD2 expression, JIM3 cells had similar levels of p-PKD2 as most MM cell lines (Figure 4B). Together, these results suggest that PKD2 is activated in NCI-H929 and to a lesser extent in JIM3 cell lines.

PKD inhibitor kb NB 142-70 induces growth arrest of tumor plasma cells and inhibits phosphorylation of PRKD2 in MM cell lines.

Given the potential role of *PRKD2* in the pathophysiology of t(4;14) MM, we next examined the impact of PKD2 inhibition on MM-cell growth and survival. kb NB 142-70, an inhibitor of PKD proteins (Bravo-Altamirano et al., 2011), induced marked dose-dependent growth inhibition in all MM cell lines investigated, including MM.1S, RPMI 8226 (RPMI), U266, that have wild type PRKD2, as well as NCI-H929 and JIM3, that express mutated PKD2 (Figure 5A). IC50 ranged from 0.3 μM for NCI-H929, which is mutated for PRKD2, to 1 μM for RPMI8226, which has lower overall PKD2 expression than the other cell lines (Figure 5A). Importantly, kb NB 142-70 also induced growth inhibition of ($CD138^{+}$) MM cells isolated from 3 patients with drug-resistant disease and carrying un-mutated *PRKD2* (Figure 5B). We next sought to evaluate whether kb NB 142-70 induces apoptosis by staining MM cell lines with annexin V and 7-AAD. Our data demonstrate that NCI-H929 cells are more sensitive to kb NB 142-70 induced apoptosis than RPMI or U266 cells (Figure 5C). Similar results were found with freshly isolated tumor plasma cells from 3 patients. Western blot confirmed that kb NB 142-70 reduced cellular levels of p-PKD2 in NCI-H929 and JIM3 cells (Figure 5D). As expected, phosphorylation of PKD2 on Ser876 was enhanced by treatment of U266, NCI-H929 and JIM3 cells by PMA, a classic activator of the PKC pathway (Figure 5D). Together, these data demonstrate that inhibition of PKD2 activity inhibits cell growth and induces apoptosis of MM cells *in vitro*.

Discussion

We report here the exome or RNA sequencing of 64 samples of t(4;14) myeloma. 24 samples were analyzed by whole exome sequencing among whom 6 (25%) were collected from patients with asymptomatic myeloma, and 18 (75%) with a symptomatic disease. This distribution is enriched in asymptomatic cases but is in line with previous studies showing that up to 25% of t(4;14) MM are MGUS or smoldering at presentation (Karlin et al., 2011). The selection of patients in our series was somewhat biased, with overrepresentation of del(17p) cases (20%) compared with 16% in previous studies (Hebraud et al., 2015). Although we cannot exclude that this bias has no impact on the frequency of some mutations, we believe that this is not the case for most variants. In fact, the frequency of mutations in *FGFR3, NRAS, KRAS* and *BRAF* were similar in the cohorts analyzed by RNA-seq, (containing only 4 del(17p) cases (10%)), and that analyzed by WES. In line with this, there was relatively high percentages of patients carrying mutations in *ATM/ATR* or *PRKD2* genes in both series (12% vs 14% and 12% vs 19%). In addition, mutations in FAM46C were detected at low levels by WES (0/24) and by RNA-seq (1/40). Last, we did not find correlations between the del(17p) and specific genetic alterations. Thus, the frequencies of mutations reported here likely represent the mutational rates occurring in t(4;14) MM.

Our study reveals that mutations in *FGFR3, NRAS, KRAS* and *BRAF* occur frequently in t(4;14) MM at diagnosis. This result is in line with previous studies performed in pooled MM sub groups (Bolli et al., 2014; Chapman et al., 2011; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2015a). Furthermore, we detected mutations in genes coding for members of the MAPK family in about 10% of cases. Taken together, these studies indicate that activation of the FGFR3/RAS/MAPK pathway is a driver event in most t(4;14) patient and suggest that inhibition could represent an efficient therapeutic approach. Interestingly, using serial sampling over time and high depth of sequencing, it has been shown that, in 1/3 of cases, *NRAS or KRAS* and *BRAF* activating mutations could co-occur in the same patient, mostly as the result of sub-clonal evolution over time (Bolli et al., 2014). Activating mutations in *NRAS* and *KRAS* were also reported in the main tumor sub clone in one patient, indicating that these alterations were not mutually exclusive. Here, we observed paired (two by two) co-occurrence of mutations in *FGFR3, NRAS, KRAS* or *BRAF.* However, in our study, the second mutation always occurred in a very minor sub-clone, generating at most 1% of the reads which makes it impossible to determine if the two alterations occur in the same cells (data not shown). In addition, in one patient (P6), progression from smoldering to symptomatic MM was not associated with modification in the ratio of sub-clones carrying rare *NRAS* and *BRAF*

mutations. Although we cannot rule out that some rare patients could carry two activating mutations in *FGFR3, NRAS, KRAS* or *BRAF* genes, we believe that the vast majority of t(4;14) tumor plasma cells carry only one activating mutations in either *FGFR3, NRAS, KRAS* or *BRAF* genes, making these lesions mutually exclusive. Whether specific treatments, such as those blocking the FGFR3/RAS/MAPK pathway, could induce emergence of sub clones that display different patterns of mutations remains to be tested.

We found elevated rates of *ATM/ATR* mutations in t(4;14) MM (10%) compared to the frequency reported in other MM (± 4%) (Supplementary Figure 4). These events were not significantly associated with del(17p) but correlated with the MB4-2 breakpoint. Alterations in ATM/ATR functions induce genomic instability and are associated with poor outcomes in many hematological disorders, including MM (Walker et al., 2015a). Thus, *ATM/ATR* lesions could contribute to worsen the prognosis of t(4;14) patients. In line with this, we recently showed that the MB4-2 breakpoint is an adverse event in t(4;14) patients (Lazareth et al., 2015). The correlation between mutations in *ATM/ATR* and the MB4-2 translocation provide a mechanistic rational for this initial observation. How the truncated MMSET protein, overexpressed from the MB4-2 translocation gives rise to an elevated mutation rate in the *ATM/ATR* loci may provide a rational for development of more efficient treatments.

Deregulation of MYC through translocations or amplifications is one of the most common chromosomal abnormalities in myeloma, and is associated with adverse clinical outcomes (Affer et al., 2014; Walker et al., 2015b). However, there was a negative correlation of MYC translocations with the t(4;14) (Affer et al., 2014), suggesting that deregulation of MYC in this subgroup could occur via different processes. We report here that mutations in MYCBP2 occurred in 7.5% of t(4;14) cases. MYCBP2 is thought to be an E3 ubiquitin ligase that binds specifically to MYC within regions that are frequently mutated in lymphomas, therefore suggesting that it could suppress MYC activity (Guo et al., 1998). Thus, alterations in the *MYCBP2* gene could represent an alternative mechanism of MYC activation in subgroups of patients, including t(4;14) MM.

LncRNAs are emerging as key regulators of various biological processes, including cellular proliferation, differentiation and cancer (Brunner et al., 2012). For example, *MALAT1*, a lncRNA involved in alternative splicing and transcriptional regulation, is upregulated in a large variety of cancers (Gutschner et al., 2013). In MM, *MALAT1* expression is increased in tumor cells compared to normal plasma cells, suggesting that it contributes to tumor progression (Ronchetti et al., 2016). We report here that *MALAT1* is mutated in 17% of the t(4;14) samples analyzed by exome sequencing. Although additional works are needed to

investigate how the mutations affect the stability and/or the function of *MALAT1*, our findings further point toward a role of this lncRNA in the pathophysiology of MM.

Our sequencing study reveals that mutations in *PRKD2* are relatively frequent in symptomatic t(4;14) MM (11.4%). Similar to our results, an association between *PRKD2* mutations and the t(4;14) translocation has recently been reported (Walker et al., 2015a). Indeed, among all the patients sequenced by Bolli and colleagues (n = 67), no *PRKD2* mutations were detected in non t(4;14) cases. Similarly, among more than 60 MM cell lines for which exome sequences are available at Tgen (myelomagenomics.tgen.org), only those with t(4;14) showed point mutations in *PRKD2*. Thus, we conclude that point mutations in the *PRKD2* gene occur almost exclusively in t(4;14) MM. This result suggests a functional link between PKD2 and the oncogenes FGFR3 and MMSET that are deregulated by the t(4;14) translocation. Interestingly, PKD2 was shown to be activated in response to TCR stimulation in Jurkat T cells and to phosphorylate the SET protein (Irie et al., 2006). Thus, in t(4;14) MM, mutated PKD2 could directly or indirectly affect the post-translational regulation of MMSET and consequently impair its activity. In line with this, we show here that inhibition of PKD2 by kb NB 142-70 induced cell growth arrest and apoptosis in MM cell lines. A similar effect has been reported for enzastaurin, a PKC inhibitor which blocks phosphorylation of PKC downstream signaling molecules including MARCKS and PKDs (Podar et al., 2007). Our results suggest that the major anti-myeloma activity of enzastraurin might be mediated by its ability to inhibit PKD2 in MM cells. They indicate that kb NB 142-70, which preferentially targets PKDs, but might target PKC family members at higher concentrations, might be more specific than enzastaurin which inhibits upstream signaling molecules. Interestingly, the drug was more efficient on t(4;14) cell lines (JIM3 and NCI-H929) than on non t(4;14) cells such as RPMI8226, suggesting a link between activity of PKD2 and the overexpression of FGFR3 or MMSET. In mouse lymphoid cells, Pkd2 was shown to have multiple potential substrates (Navarro et al., 2014), suggesting that several pathways could be impaired by *PRKD2* mutations in MM cells. Although additional experiments are required to clarify the role of PKD2 in MM, our results identify PKD2 as a potential therapeutic target in MM and kb NB 142-70 as an efficient inhibitor of MM cell growth.

Material and Methods

Patient Samples

Samples were taken, after informed consent, from patients newly diagnosed with myeloma. Patients with a suboptimal response were randomly assigned to pre-transplant treatment with a proteasome inhibitor triplet. Older or less fit patients did not receive an autologous stem-cell transplant. We sequenced the protein-coding exome of 18 tumour samples from 17 patients with MM. Two serial samples were available for one patient at diagnosis of asymptomatic MM and at progression to symptomatic MM. FISH was available for all patients. The 17 patients [10 males and 7 females; median age 61.4 years (range 44–78) with a median follow-up since diagnosis of 16 months] was combined with 6 t(4;14) MM patients published (Bolli et al., 2014). 40 patients, from the IFM-DFCI 2009 cohort (NCT01191060), had a proteasome inhibitor triplet with autologous stem-cell transplant. t(4;14) was detected by classical fluorescence in situ hybridization (FISH) as described previously, in 40 samples (13,6% of all samples). 19/40 t(4;14) patients were treated with ASCT in first line. The t(4;14) was also confirmed by RT-PCR in 35 samples (87.5%). In total, we sequenced 23 patients with t(4;14) by whole exome sequencing and 40 patients by RNA-seq. [28 males, 27 females and 21 NA; median age 56.6 years (range 30-78)

Exome Sequencing and Variants Calling

Plasma cells from BM were CD138-selected using a magnetic-activated cell sorting system (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch-Gladbach, Germany; http://www.miltenyibiotec.com). For each patient, DNA from both tumor and non-tumor samples were used for the exome capture and libraries were generated with the Nextera DNA Library Preparation Kits (Illumina). Samples were sequenced on Illumina HiSeq 2500 sequencer (paired end 100bp reads) and data were further analyzed on the Galaxy platform at (https://galaxy-public.curie.fr/). Alignment to the GRCh37/hg19 genome was performed with Bowtie2 (v.2.1.0) and Bam files were piled up using Samtools (Mpileup). Single nucleotide variants (SNVs) and short indels for paired tumor and normal files were called using VarScan Somatic (v.2.3.5) with minimum coverage for normal and tumor samples of 8 and 6 respectively. Variants were annotated using ANNOVAR. All SNV and Indels were validated by direct analysis on IGV (v.2.3.66, Integrative Genomics Viewer, Broad Institute).

Copy-number analysis

Copy number across the exome was determined using control–FREE copy number and allelic content caller Control-FREEC (v.6.7) (http://bioinfo-out.curie.fr/projects/freec/) and cancer

clonal fraction calculated. Copy number across the exome was determined using Control-FREEC using 500 base pair bins, each overlapping with the subsequent and previous 250bp. A minimum average read depth of 50 was required in the control samples, with at least 2 neighboring bins required to show copy number aberration to call a region as gained or lost. To assess the CN state of mutated genes, genes mapping in CNA regions were retrieved using UCSC RefSeq transcript annotation track. The Circos plot represents somatic amplifications (red) and deletions (blue) found in each case, distributed across all chromosomes. Samples are displayed according to increasing case number from inner to outer track.

Somatic Signature analysis

We performed a mutational signature analysis in order to determine the contributions of mutational signatures previously described in multiple myeloma (Bolli et al., 2015) in our series. The input data was the proportion of mutations belonging to the 96 possible mutation categories, taking into account the type of substitution and the surrounding bases at 5' and 3' of the mutated base, as previously described (Alexandrov et al., 2013). The sequence context of each mutation was retrieved using the R package *SomaticSignatures* (Gehring et al., 2015). We used non-negative matrix factorization (NMF) to decompose our mutation matrix M (n x r, where n is the 96 type mutation categories and r is the number of samples) as the product of a matrix P (n x p, where n is the 96 type mutation categories and p is the mutational processes) representing the signature of each mutagenic process and a matrix E representing the exposure of each tumor to each process. The P matrix comprised of a pre-defined set of signatures (COSMIC signatures 1, 2, 5 and 13) previously identified in multiple myeloma (Forbes et al., 2015). We implemented the fast combinatorial strategy approach from the NMF package (Gaujoux and Seoighe, 2010) in order to solve the following nonnegative least squared problem. min ||P – M*E||_F, s.t. E >=0 where |.|_F is the Frobenius norm. The resulting output E(r x p) gives the intensity of each process in each tumor. Signatures contributing less than 5% of mutations were excluded from the model.

RNA sequencing

RNA purification and preparation was performed as previously described (Rashid et al., 2014). Briefly, RNA was extracted from purifued CD138 positive (purity >90%) cells. RNA quality was determined on the Bioanalyzer using the RNA Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA). We used 100 ng of total RNA for each sample. Libraries were prepared using the NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA). Libraries were analyzed by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using the Universal Library Quantification Kit for Illumina (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) and run on the

7900HT Fast quantitative PCR machine (ABI, Grand Island, NY). Libraries passing QC were diluted to 2 nM using sterile water, and then sequenced on the HiSequation 2000 (Illumina, San Diego, CA) at a final concentration of 12 pM, following all manufacturers' protocols.

RNA sequencing data analysis

We followed a computational workflow for the analysis of mutational profiles on RNA-seq data using a set of possibly unmatched normal samples from the same study, as reported previously (Mosen-Ansorena et al., ASH, 2015). Briefly, we first ran FASTQC to check the quality of the paired-end 50bp reads in all samples and then used the spliced aligner MapSplice (version 2.1.7) (Wang et al., 2010) in order to map the reads to the transcriptome of the human reference genome hg19 (GRCh37). We subsequently followed GATK's best practices for RNA-seq variant detection. We used the computational algorithms VEP (Cunningham et al., 2015), Sorting intolerant from tolerant (SIFT, http://sift.jcvi.org/www/SIFT_dbSNP.html) and Polymorphism pheno-typing (Polyphen, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dbsearch.shtml) to perform mutation annotations. A number of filters were finally applied to reduce the initial set of variants to a collection where most of the variants are the more likely to be somatic mutations, as opposed to having a germline or artefactual origin. In order to minimize potential batch effects, we also removed recurrent variants associated with certain batches.

Correlation Studies

Correlation between mutated genes and cytogenetic abnormalities was determined for the 64 samples using Pearson product-moment correlation coefficient (PCC) performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Correlation coefficients were plotted using corrplot (http://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html).

Antibody and chemicals

kb NB 142-70 (R&D systems (TOCRIS)) and Bortezomib (formerly PS-341; Velcade;JANSSEN-CILAG) were dissolved in DMSO. Other reagents were obtained as follows: PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma Aldich). Antibodies raised against PRKD2, phospho-PRKD2(Ser876) were purchased from Merck Millipore (Merck); Antibodies raised against Akt1, phospho-Akt(Ser308), p44/42 MAPK were purchased from Cell Signaling Technology) and phospho-ERK (E-4) was purchased from Santa CruzBiotechnology.

Cell culture

Cell lines JIM3,NCIH929MM.1S, RPMI8226 and U266 were maintained in RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. The LP1 cell lines was maintained in DMEM medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. For inhibition assays, cells were plated at 2 x 10^5 cells/mL, and grown with (or without) 20µM kb NB 142-70 for 24 hours. For activation, cells were treated with PMA (0.1µg/mL) for 20 minutes.

Cell lysis and Western blotting

For western blot, cells were harvested and lysed on ice for 30 minutes with 30 µL of a modified NP40 lysis buffer (1% NP-40, 1% SDS, 50 mM Tris (Ph-7.5), 150 mM NaCl, deuterium depleted water, 10 % Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1 % phosphatase inhibitor and 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma Aldrich). Cell lysates (30µg/lane) were separated by 8% SDS-PAGE prior to electrophoretic transfer onto Amersham™ Protran™ nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Inc.). After blocking with 5% nonfat milk in phosphate-buffered saline-Tween 20 buffer at room temperature for 1 h, membranes were sequentially blotted with the indicated specific primary Abs and then with horseradish peroxidase-conjugated secondary mouse or rabbit Abs and were developed using chemiluminescence (Amersham Biosciences, Inc.).

DNA synthesis and cell-proliferation assay

Cells were plated at 2.0 × 10^5 cells/mL in a volume of 100µl in 96 well plates in triplicate. All cells were treated with kb NB 142-70 for 48 hours at concentrations of 0.1µM, 0.3µM, 1µM, and 3µM, then labeled with [methyl-3H] thymidine (1µCi/well) overnight at 37°C. Thymidine incorporation was analyzed using a liquid scintillation counter (Wallace, PerkinElmer).

Colorimetric assays were also performed to assay drug activity. Cells from 48-hour cultures were pulsed with 10 µL of 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) to each well for 4 hours, followed by 100 µL isopropanol that contained 0.04 HCl. Absorbance readings at a wavelength of 570 nm were taken on a spectrophotometer (Bio-Tek, Inc.).

Annexin/7-AAD stain

Measurement of apoptosis was carried out using the Apoptosis Detection Kit, Miltenyi Biotec GmbH. Briefly, MM cell lines were treated without and with PKD Inhibitor, kb NB 142-70 (1µM and 3µM) for 48 hours. Cells were harvested, washed with cold PBS and stained with Annexin V-APC and 7-AAD (eBioscience) in binding buffer at room temperature for 15

minutes in the dark. Stained cells were fixed in binding buffer and acquired on a BD FACSCanto II (Becton Dickinson) 20 min later using Diva Software (v.8.0.1). The flow cytometric data was analyzed by Flowjo (v7.6.5).

Figure Legends

Figure 1. **Sequencing metrics of the study.** (A) Total number of somatic variants in coding regions for each patient in the t(4;14) cohort. Variant types are indicated by different colors. (B) Mutation context identifies four signatures in t(4;14) myeloma: signatures 1, 2, 5 and 13 as indicated. (C) Breakdown of total variants by nucleotide change. (D) Breakdown of total variants by nucleotide change according to transcribed (blue) and untranscribed (red) DNA strands. NS = non-significant.

Figure 2. **Landscape of genetic alterations and recurrently mutated genes in t(4;14) multiple myeloma.** (A) Table summarizes recurrently mutated genes in the exome sequencing study. Patients are represented in columns. Recurrently mutated genes, color coded for missense (light green), nonsense (dark green) and synonymous (grey); indels are in blue. In case of multiple mutations in the same gene in a patient, the number of variant is indicated in the box. In case a mutation is associated with the deletion of the wild-type allele, the gene shows a black contour. The del(17p), as established by FISH, is represented by a black box. (B) Table summarizes relevant genetic alterations and recurrently mutated genes in the RNA-seq study. Variants are indicated as in (A).

Figure 3. **Correlation of the genetic alterations in t(4;14) MM and evolution during disease progression.** (A) Cross-correlation between specific mutations or recurrent cytogenetic abnormalities within the 64 t(4;14) MM samples. Intensity of color shade represents the degree of correlation (blue, negative; red, positive) as per scale. Only significant correlations are represented on the plot. Nonsignificant correlations are in white. Cases with del(17p) or mutations in TP53 are pooled together (del(17p) or TP53). Patients with the MB4-1 or MB4-3 breakpoint are pooled. (B) Clonal evolution of one t(4;14) patient during progression to symptomatic MM. (Left) Chromosomal copy-number plots for the early (asymptomatic MM) and late (symptomatic MM) samples; the copy number, for each chromosome is indicated in blue and red. (Right) Two-dimensional density plots showing the clustering of the fraction of tumor cells carrying each mutation (black dots) at early or late phase; increasing intensity of red indicates the location of a high posterior probability of a cluster.

Figure 4. ***PRKD2* is expressed in tumor plasma cells.** (A) Expression of *PRKD2* (probe 209282_at, Affymetrix U133Plus2.0 array) in CD138+ plasma cells from bone marrow of patients with newly diagnosed multiple myeloma from the data set of Zhan and colleagues (Zhan et al., 2006) (GEO accession GSE2658). Data was extracted from a total of 252 patients distributed across 6 myeloma disease subtypes based on transcriptomic clustering :

the group overexpressing Cyclin D genes (*CCND1* or *CCND3*) (CD group, n=64), the group with a hyperdiploid signature (HY group, n=65), the group characterized by signature of: low bone disease (LB group, n=30), overexpression of *c-MAF* or *MAFB* (MF group, n=21), overexpression of *MMSET* (MS group, n=43), and by a proliferative signature (PR group, n=29). The graph shows log2-transformed values of normalized expression (Affymetrix Microarray Suite GCOS1.1 softwaresuite). (B) Western blot analysis of PKD2 in CD138+ plasma cells isolated from 3 MM patients and in MM cell lines as indicated. Immunoblots were probed with anti-PKD2 and anti-p-PKD2ser876 antibodies. Actin was used as a loading control.

Figure 5. **PKD2 inhibitor kb NB 142-70 inhibits growth of MM plasma cells.** (A) Dose-related effects of kb NB 142-70 on proliferation of MM cell lines. Cells were cultured with indicated concentrations of kb NB 142-70. Uptake of [3H]-thymidine was measured during the last 10 hours of 48-hour cultures. (B) Survival of CD138+ plasma cells from bone marrow of MM patients in the presence or absence of kb NB 142-70 (10µM). MTT cleavage was measured during the last 4 hours of 48-hour cultures. (C) Apoptosis of MM cell lines and plasma cells from patients. Cells were culture with or without kb NB 142-70 for 48h and analyzed for AnnexinV and 7AAD staining by flow cytometry. Histograms show the percentage of AnnexinV/7AAD negative live cells. Data shown are the mean ± SD of experiments performed in triplicate (except for apoptosis of MM cells from patients). (D) kb NB 142-70 inhibits phosphorylation of PKD2 on ser876. Cells were cultured for 6h with or without kb NB 142-70 (20µM) and stimulated (or not) with PMA (0.1µg/mL) for 20minutes. Immunoblots of cell lysates were probed with indicated antibodies. Representative of at least 3 experiments.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the “Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammapathies monoclonales” and by the Fondation de France (Engt n° 2012 29156).

Figure 1

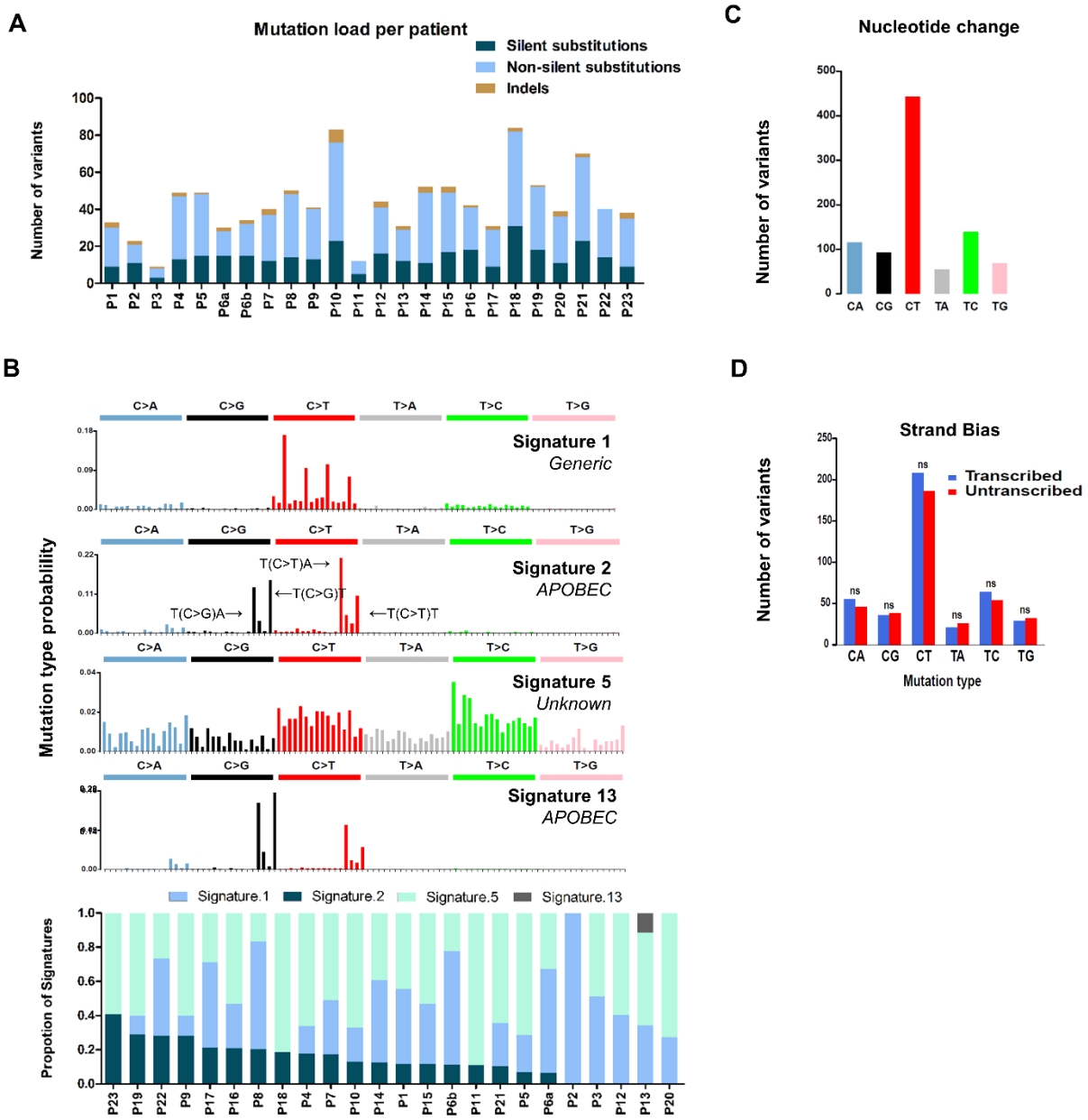
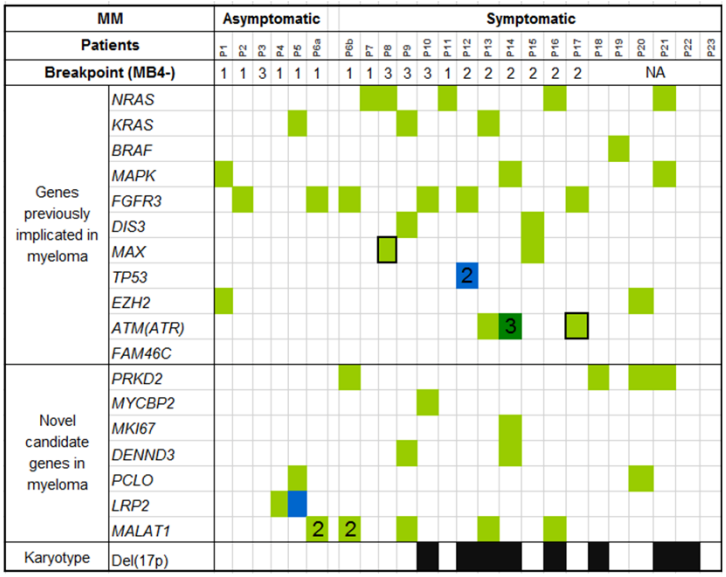
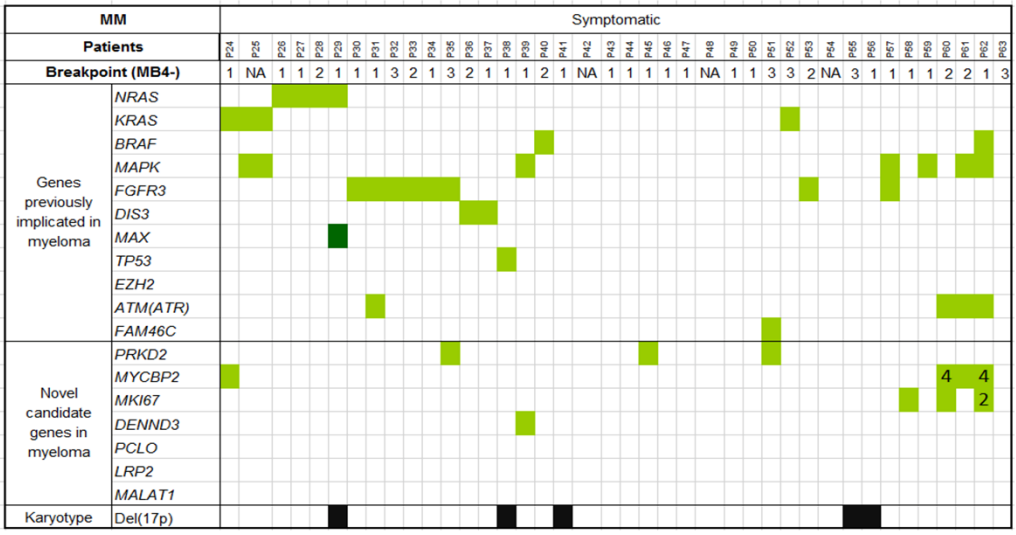

A
Mutation load per patient
Silent substitutions
Non-silent substitutions
Indels
Number of variants
P1 P2 P3 P4 P5 P6a P6b P7 P8 P9 P10 P11 P12 P13 P14 P15 P16 P17 P18 P19 P20 P21 P22 P23
C
Nucleotide change
Number of variants
CA CG CT TA TC TG
B
Mutation type probability
C>A C>G C>T T>A T>C T>G
Signature 1
Generic
Signature 2
APOBEC
T(C>T)A⟶
⟵T(C>G)T
T(C>G)A⟶
⟵T(C>T)T
Signature 5
Unknown
Signature 13
APOBEC
Signature.1 Signature.2 Signature.5 Signature.13
Propotion of Signatures
P23 P19 P22 P9 P17 P16 P8 P18 P4 P7 P10 P14 P1 P15 P6b P11 P21 P5 P6a P2 P3 P12 P13 P20
D
Strand Bias
Transcribed
Untranscribed
ns
Number of variants
CA CG CT TA TC TG
Mutation type

Figure 2

A



B



Frameshift indel Missense Nonsense Synonymous Del WT Allele

2 Number of mutations in one gene

Figure 3

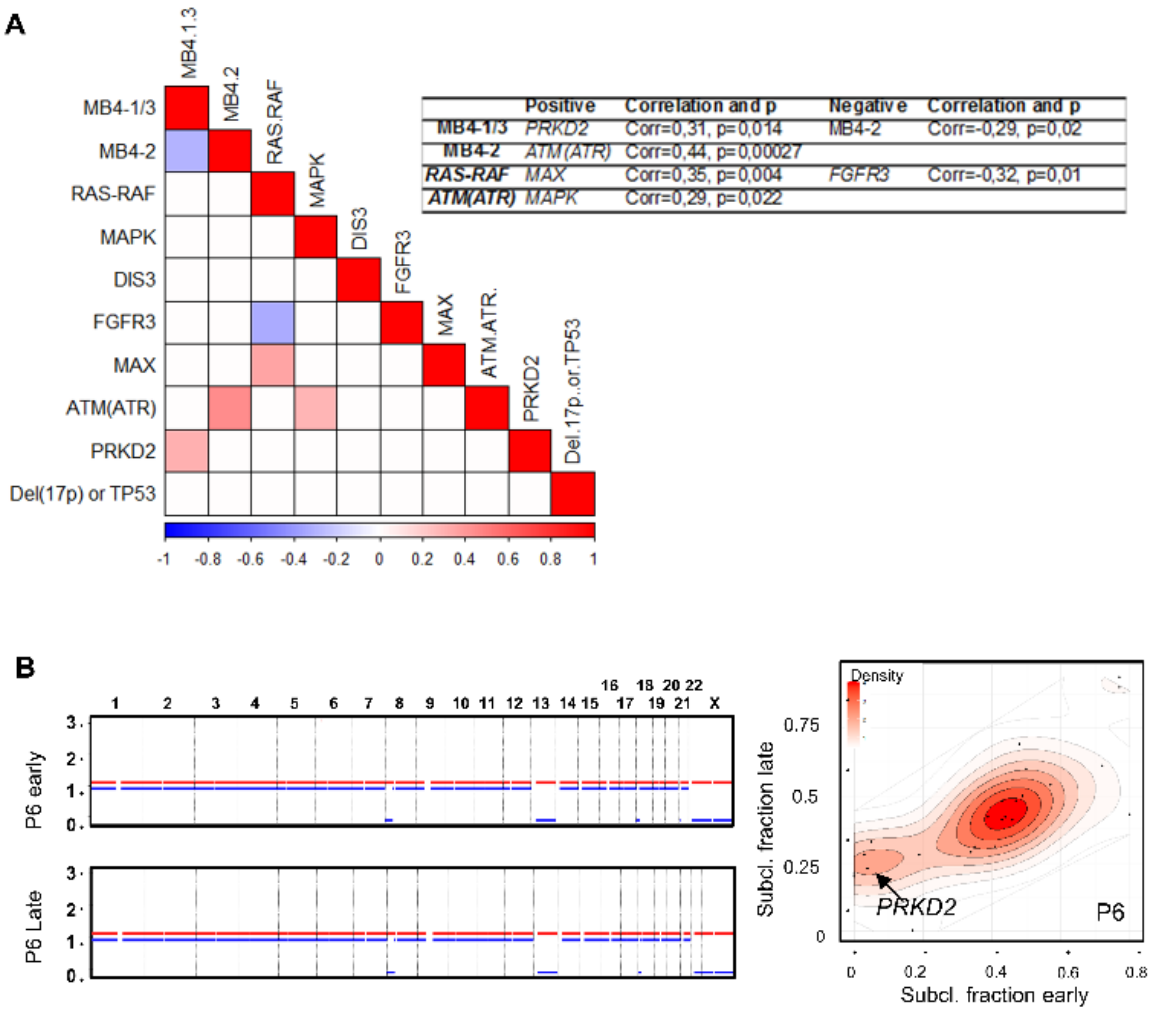

A
MB4.1.3
MB4.2
RAS.RAF
MAPK
DIS3
FGFR3
MAX
ATM.ATR.
PRKD2
Del.17p..or.TP53
MB4-1/3
MB4-2
RAS-RAF
MAPK
DIS3
FGFR3
MAX
ATM(ATR)
PRKD2
Del(17p) or TP53
-1 -0.8 -0.6 -0.4 -0.2 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1
Positive Correlation and p Negative Correlation and p
MB4-1/3 PRKD2 Corr=0,31, p=0,014 MB4-2 Corr=-0,29, p=0,02
MB4-2 ATM(ATR) Corr=0,44, p=0,00027
RAS-RAF MAX Corr=0,35, p=0,004 FGFR3 Corr=-0,32, p=0,01
ATM(ATR) MAPK Corr=0,29, p=0,022
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X
P6 early
P6 Late
Density
Subcl. fraction late
Subcl. fraction early
PRKD2
P6
0 0.25 0.5 0.75
0 0.2 0.4 0.6 0.8

Figure 4

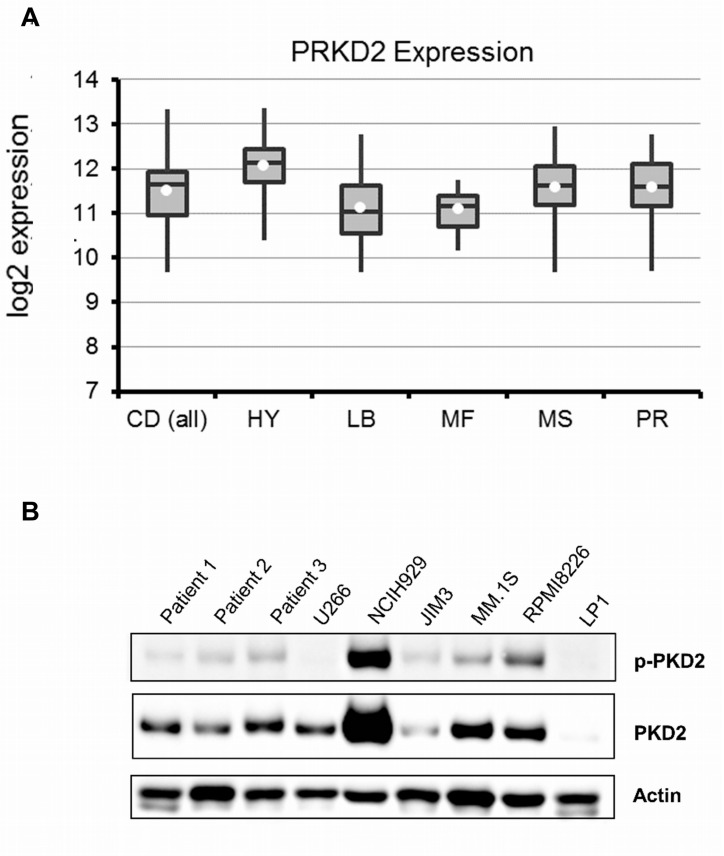
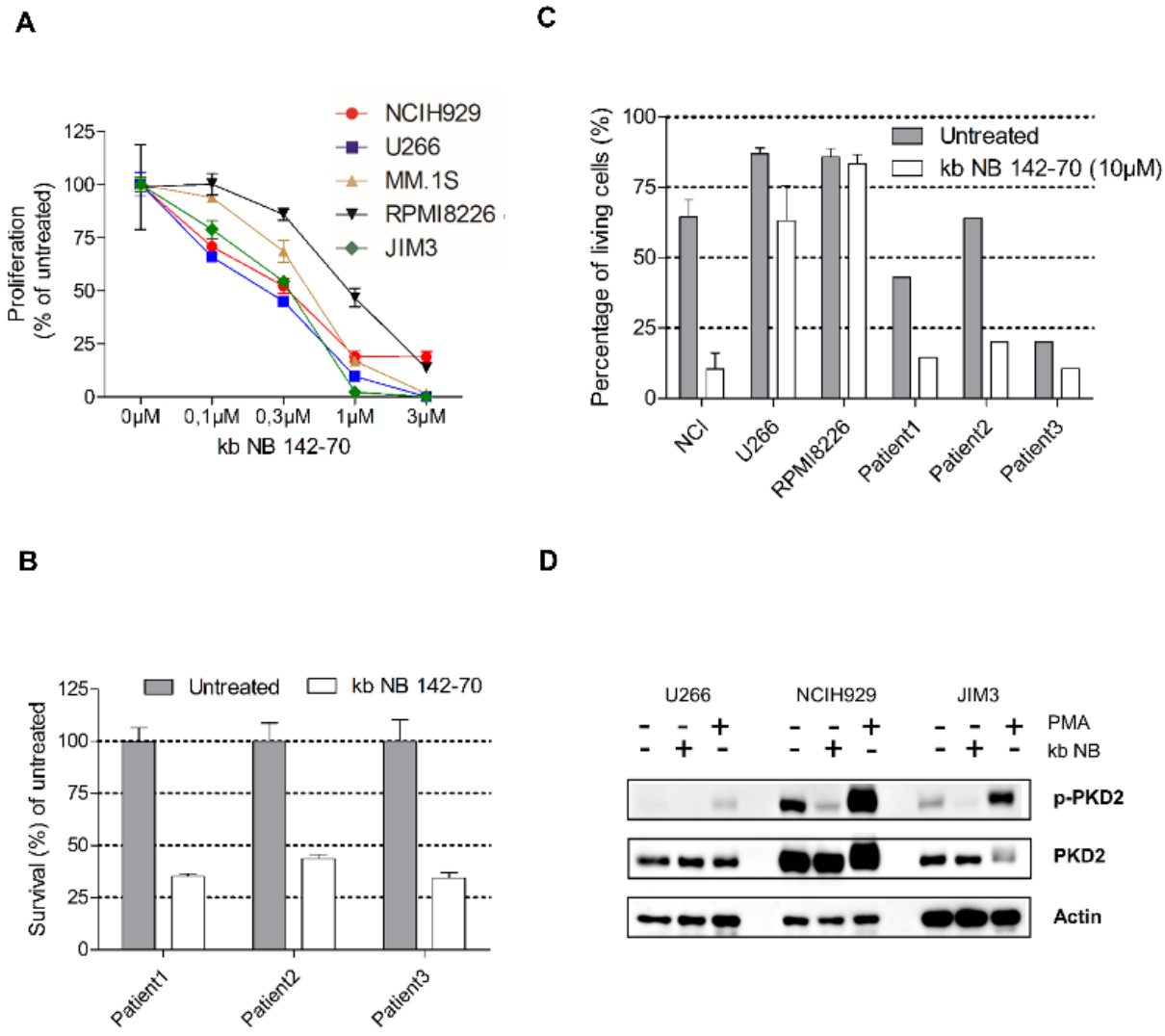
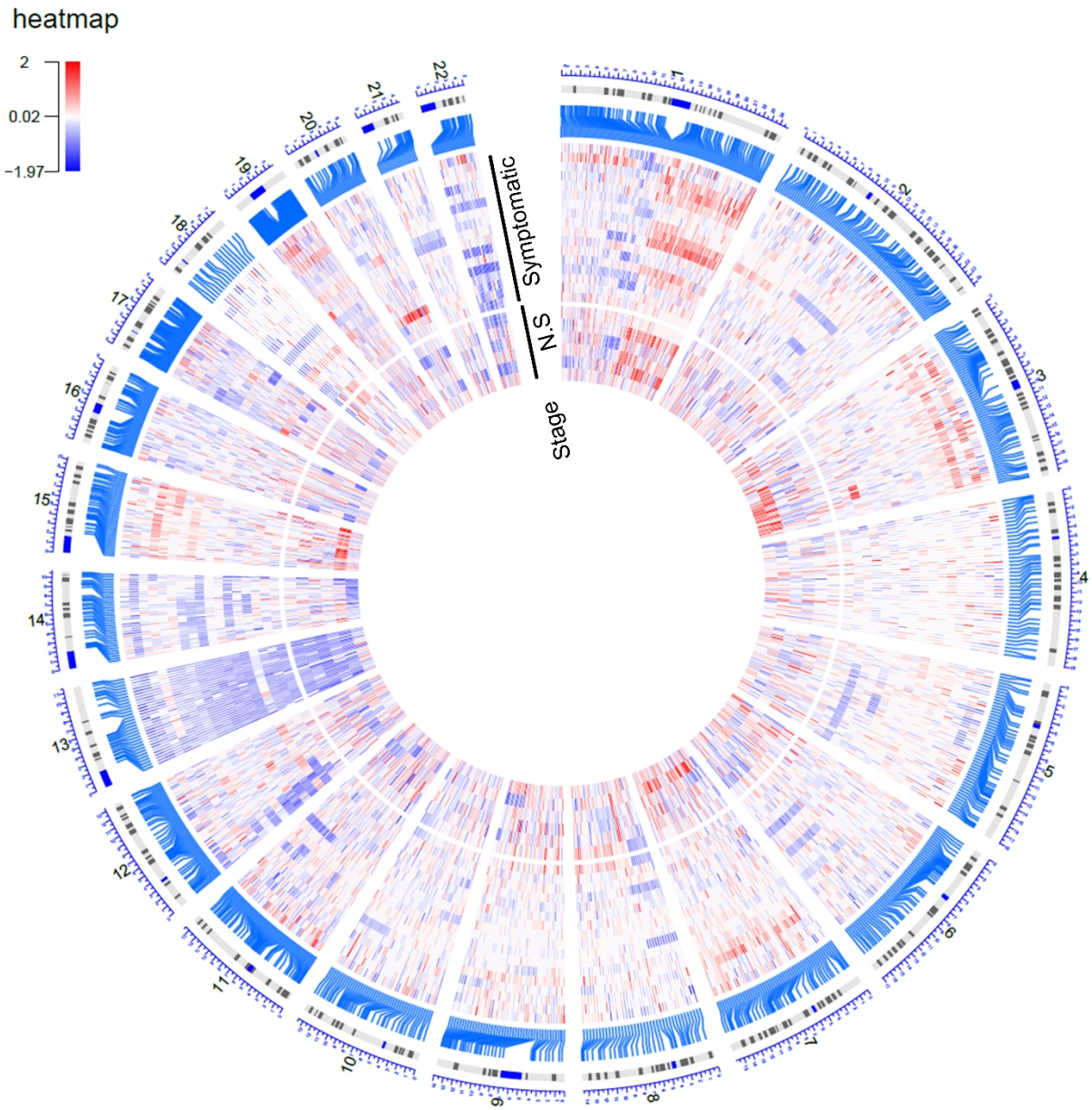

A
PRKD2 Expression
log2 expression
14
13
12
11
10
9
8
7
CD (all)
HY
LB
MF
MS
PR
B
Patient 1
Patient 2
Patient 3
U266
NCIH929
JIM3
MM.1S
RPMI8226
LP1
p-PKD2
PKD2
Actin

Figure 5

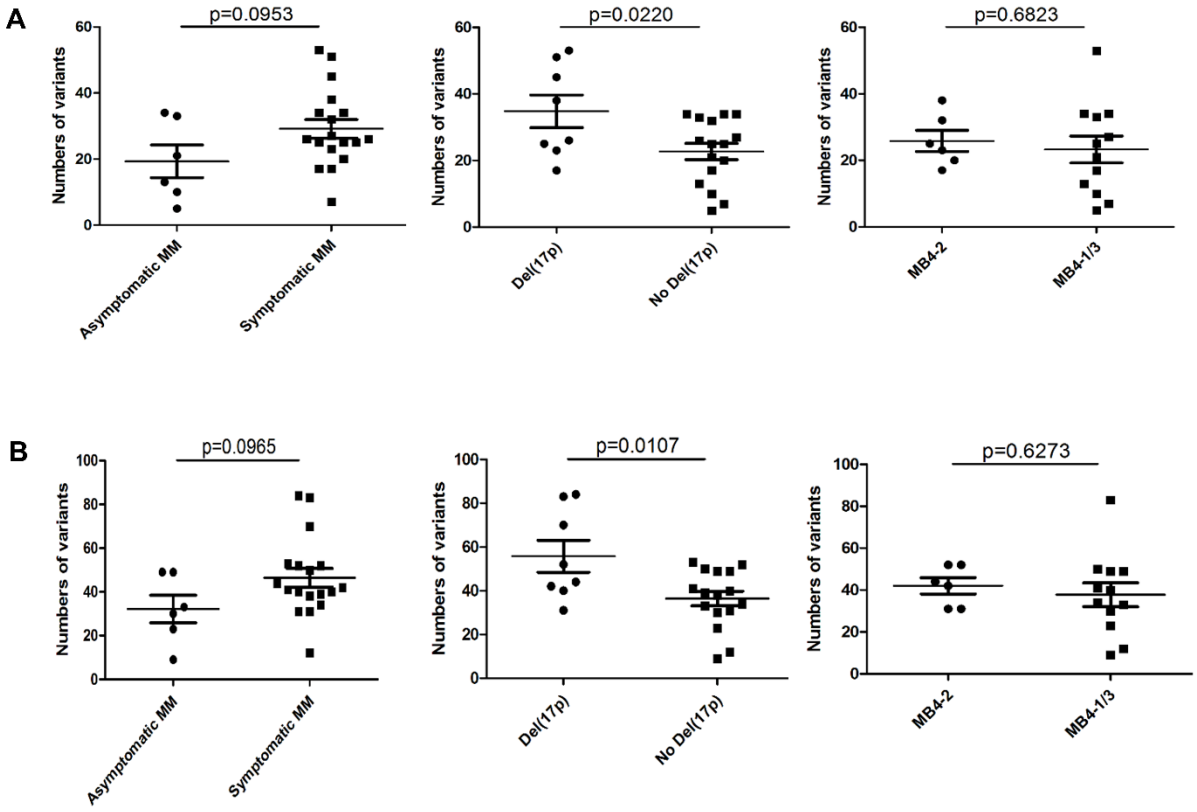

A
NCIH929
U266
MM.1S
RPMI8226
JIM3
Proliferation (% of untreated)
125
100
75
50
25
0
0µM
0,1µM
0,3µM
1µM
3µM
kb NB 142-70
C
Untreated
kb NB 142-70 (10µM)
Percentage of living cells (%)
100
75
50
25
0
NCI
U266
RPMI8226
Patient1
Patient2
Patient3
B
Untreated
kb NB 142-70
Survival (%) of untreated
125
100
75
50
25
0
Patient1
Patient2
Patient3
D
U266
NCIH929
JIM3
PMA
kb NB
p-PKD2
PKD2
Actin

Supplementary Figure 1



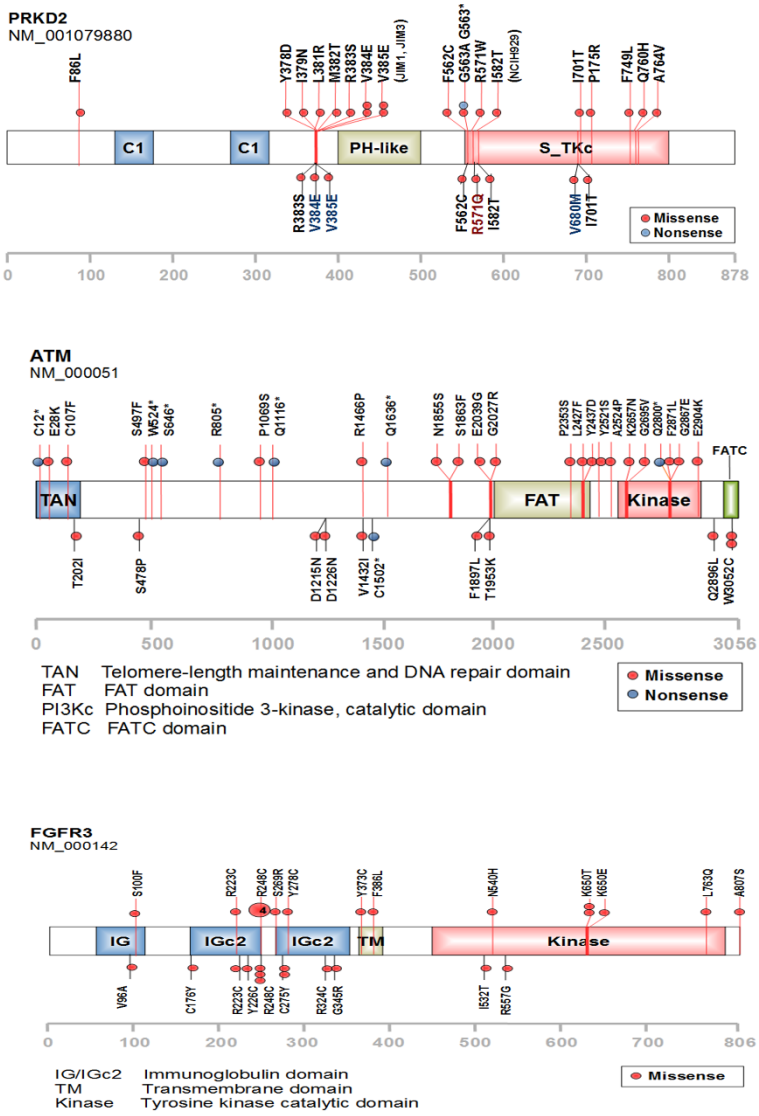
Circos plot showing copy number variation in asymptomatic (N.S) and symptomatic MM patients analyzed by exome sequencing.
Red=gain, blue=loss. Chromosome are indicated by numbers.

Supplementary Figure 2



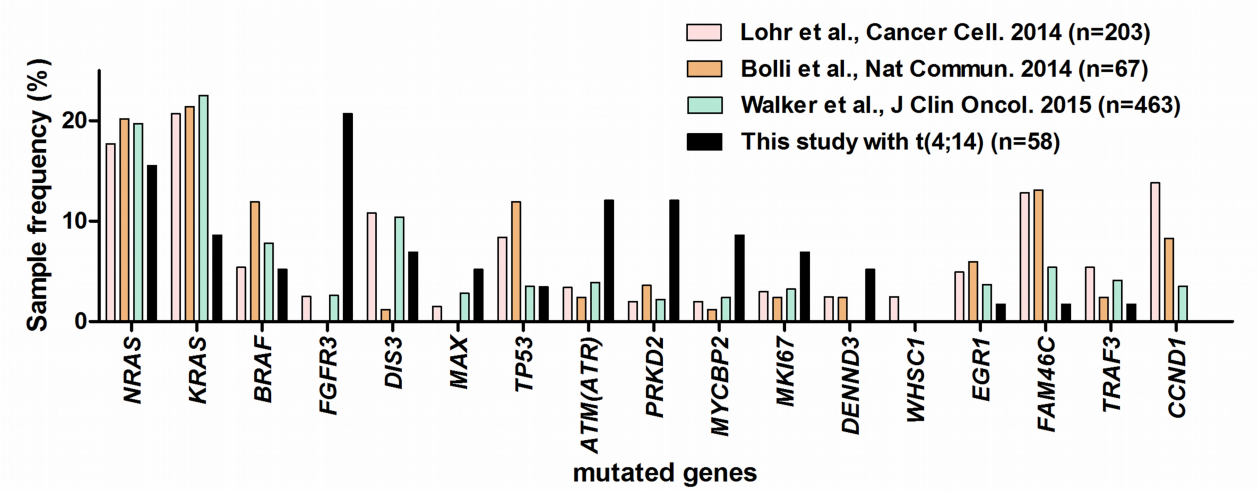
Correlations between coding exonic non-synonymous variants (A) and total variants (B) and the stage of disease, presence of del(17p) or type of breakpoint (MB4-1, -2 or -3).

Supplementary Figure 3



Locations of mutations on *PRKD2, ATM* and *FGFR3* genes. Data below the gene ruler are from previous publications and data above the gene ruler were generated in this paper.

Supplementary Figure 4



Frequency of a selection of mutations in the different sequencing datasets.

Table 1

Genes	Early sample		Late sample		Non-tumor Control	
	Propotion of mutated reads	Total number of reads	Propotion of mutated reads	Total number of reads	Propotion of mutated reads	Total number of reads
CABS1	0.43	83	0.41	91	0	435
CELSR3	0.49	47	0.5	36	0	162
CLIP3	0.35	23	0.31	16	0	373
EFCAB13	0.46	99	0.41	61	0	162
FAM194B	0.77	39	0.9	42	0	404
KIAA0947	0.34	58	0.29	73	0	531
LMO3	0.47	55	0.48	83	0	121
MROH2B	0.41	67	0.31	70	0	382
OPHN1	0.77	65	0.94	82	0	365
PCDHA5	0.57	58	0.54	89	0	125
PLEK2	0.39	61	0.42	36	0	196
RNF19B	0.48	27	0.69	13	0	411
SHBG	0.44	72	0.42	59	0	342
WDR36	0.43	122	0.48	100	0	376
FGFR3	0.19	83	0.28	53	0	171
FLG	0.72	417	0.61	520	0	2461
LRFN1	0	80	0.21	38	0	267
NOL12	0	20	0.2	32	0	510
PRKD2	0.03	60	0.28	61	0	123
ZCCHC4	0.04	26	0.23	35	0	248

Evolution of the frequency of mutated reads during symptomatic progression of P6.
Early sample (smoldering MM), late sample (symptomatic MM). In red the genes which are mutated in the late sample.

Supplementary Table 2

Cell line	Chr	Position	Reference	Alteration	Gene	Transcript_ID	Functional_Class	AA_Change
NCIH929 t(4;14)	19	47193921	A	G	PRKD2	ENST00000595515	MISSENSE	I582T
JIM1 t(4;14)	19	47201075	A	T	PRKD2	ENST00000595515	MISSENSE	V385E
JIM3 t(4;14)	19	47201075	A	T	PRKD2	ENST00000595515	MISSENSE	V385E
KMS18 t(4;14)	19	47217130	C	T	PRKD2	ENST00000595515	SYNONYMOUS_CODING	V123V

Cell line TruSeqRNA	Left_Gene	Left Chr	Left postion	Right_Gene	Right Chr	Right Pos	Span_Reads	Span_Mates	Span_Fusions
JJN3 t(14;16)	NCOA3	chr20	46212004	PRKD2	chr19	47201106	15	69	34
JMW1 t(4;14)	PRKD2	chr19	47192793	POLD1	chr19	50914047	97	136	88

Shown are the alterations affecting *PRKD2* in MM cell lines. Data are available at (https://myelomagenomics.tgen.org/)

References

Affer, M., Chesi, M., Chen, W.D., Keats, J.J., Demchenko, Y.N., Tamizhmani, K., Garbitt, V.M., Riggs, D.L., Brents, L.A., Roschke, A.V.*, et al.* (2014). Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. Leukemia *28*, 1725-1735.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L.*, et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. Nature *500*, 415-421.

Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L.*, et al.* (2007). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. Blood *109*, 3489-3495.

Avet-Loiseau, H., Li, C., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.L., Attal, M., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T.*, et al.* (2009). Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. J Clin Oncol *27*, 4585-4590.

Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D.C., Van Loo, P., Alexandrov, L.B., Martincorena, I., Dawson, K.J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G.R.*, et al.* (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. Nat Commun *5*, 2997.

Bolli, N., Manes, N., McKerrell, T., Chi, J., Park, N., Gundem, G., Quail, M.A., Sathiaseelan, V., Herman, B., Crawley, C.*, et al.* (2015). Characterization of gene mutations and copy number changes in acute myeloid leukemia using a rapid target enrichment protocol. Haematologica *100*, 214-222.

Bravo-Altamirano, K., George, K.M., Frantz, M.C., Lavalle, C.R., Tandon, M., Leimgruber, S., Sharlow, E.R., Lazo, J.S., Wang, Q.J., and Wipf, P. (2011). Synthesis and Structure-Activity Relationships of Benzothienothiazepinone Inhibitors of Protein Kinase D. ACS Med Chem Lett *2*, 154-159.

Brunner, A.L., Beck, A.H., Edris, B., Sweeney, R.T., Zhu, S.X., Li, R., Montgomery, K., Varma, S., Gilks, T., Guo, X.*, et al.* (2012). Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. Genome Biol *13*, R75.

Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.P., Ahmann, G.J., Adli, M.*, et al.* (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature *471*, 467-472.

Cunningham, F., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S.*, et al.* (2015). Ensembl 2015. Nucleic Acids Res *43*, D662-669.

Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J.*, et al.* (2003). Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood *101*, 4569-4575.

Fonseca, R., Blood, E.A., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Bailey, R.J., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., Hoyer, J.D., Harrington, D.*, et al.* (2002). Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. Blood *99*, 3735-3741.

Forbes, S.A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S.*, et al.* (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res *43*, D805-811.

Fu, Y., and Rubin, C.S. (2011). Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. EMBO Rep *12*, 785-796.

Gaujoux, R., and Seoighe, C. (2010). A flexible R package for nonnegative matrix factorization. BMC Bioinformatics *11*, 367.
Gehring, J.S., Fischer, B., Lawrence, M., and Huber, W. (2015). SomaticSignatures: inferring mutational signatures from single-nucleotide variants. Bioinformatics *31*, 3673-3675.
Guo, Q., Xie, J., Dang, C.V., Liu, E.T., and Bishop, J.M. (1998). Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 9172-9177.
Gutschner, T., Hammerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., Revenko, A., Arun, G., Stentrup, M., Gross, M.*, et al.* (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. Cancer Res *73*, 1180-1189.
Hebraud, B., Magrangeas, F., Cleynen, A., Lauwers-Cances, V., Chretien, M.L., Hulin, C., Leleu, X., Yon, E., Marit, G., Karlin, L.*, et al.* (2015). Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. Blood *125*, 2095-2100.
Irie, A., Harada, K., Tsukamoto, H., Kim, J.R., Araki, N., and Nishimura, Y. (2006). Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. Int Immunol *18*, 1737-1747.
Karlin, L., Soulier, J., Chandesris, O., Choquet, S., Belhadj, K., Macro, M., Bouscary, D., Porcher, R., Ghez, D., Malphettes, M.*, et al.* (2011). Clinical and biological features of t(4;14) multiple myeloma: a prospective study. Leuk Lymphoma *52*, 238-246.
Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., Belch, A.R., and Pilarski, L.M. (2003). In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood *101*, 1520-1529.
Lazareth, A., Song, X.Y., Coquin, A., Harel, S., Karlin, L., Belhadj, K., Roos-Weil, D., Frenzel, L., Tamburini, J., Macro, M.*, et al.* (2015). MB4-2 breakpoint in MMSET combined with del(17p) defines a subset of t(4;14) multiple myeloma with very poor prognosis. Haematologica *100*, e471-474.
Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G.*, et al.* (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. Cancer Cell *25*, 91-101.
Moreau, P., Attal, M., Garban, F., Hulin, C., Facon, T., Marit, G., Michallet, M., Doyen, C., Leyvraz, S., Mohty, M.*, et al.* (2007). Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. Leukemia *21*, 2020-2024.
Morgan, G.J., Walker, B.A., and Davies, F.E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. Nat Rev Cancer *12*, 335-348.
Navarro, M.N., Feijoo-Carnero, C., Arandilla, A.G., Trost, M., and Cantrell, D.A. (2014). Protein kinase D2 is a digital amplifier of T cell receptor-stimulated diacylglycerol signaling in naive CD8(+) T cells. Sci Signal *7*, ra99.
Podar, K., Raab, M.S., Zhang, J., McMillin, D., Breitkreutz, I., Tai, Y.T., Lin, B.K., Munshi, N., Hideshima, T., Chauhan, D.*, et al.* (2007). Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). Blood *109*, 1669-1677.
Ronchetti, D., Agnelli, L., Taiana, E., Galletti, S., Manzoni, M., Todoerti, K., Musto, P., Strozzi, F., and Neri, A. (2016). Distinct lncRNA transcriptional fingerprints characterize progressive stages of multiple myeloma. Oncotarget 7, 14814-14830.
Walker, B.A., Boyle, E.M., Wardell, C.P., Murison, A., Begum, D.B., Dahir, N.M., Proszek, P.Z., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Melchor, L., et al. (2015a). Mutational Spectrum, Copy

Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. J Clin Oncol 33, 3911-3920.
Walker, B.A., Wardell, C.P., Brioli, A., Boyle, E., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Johnson, D.C., Ross, F.M., Davies, F.E., et al. (2014). Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. Blood Cancer J *4*, e191.
Walker, B.A., Wardell, C.P., Murison, A., Boyle, E.M., Begum, D.B., Dahir, N.M., Proszek, P.Z., Melchor, L., Pawlyn, C., Kaiser, M.F*., et al.* (2015b). APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. Nat Commun *6*, 6997.
Wang, K., Singh, D., Zeng, Z., Coleman, S.J., Huang, Y., Savich, G.L., He, X., Mieczkowski, P., Grimm, S.A., Perou, C.M*., et al.* (2010). MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. Nucleic Acids Res *38*, e178.
Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B*., et al.* (2006). The molecular classification of multiple myeloma. Blood *108*, 2020-2028.

Au cours des dernières années, la survie des patients atteints de MM a été considérablement améliorée, principalement grâce à l'introduction de nouveaux médicaments comme le thalidomide, le bortezomib et le lénalidomide (Kumar et al., 2016). Aujourd'hui, presque la moitié des patients de moins de 65 ans survivent plus de 10 ans après le diagnostic. Pour les autres malades, la survie moyenne a également progressée et est maintenant de l'ordre de 5 à 6 ans. Cependant, ces données masquent une grande hétérogénéité entre les patients. Ces progrès ont été rendus possibles grâce à l'identification de facteurs pronostiques fiables permettant d'adapter le traitement à la survie prévisible de sous-groupes de patients particuliers (Manier et al., 2016). Parmi ces facteurs pronostiques, les altérations génétiques récurrentes se sont révélées particulièrement pertinentes pour prévoir l'évolution de la maladie. Ainsi, la présence d'une translocation t(4 ;14) est associée à un pronostique défavorable, même si les nouvelles thérapies ont amélioré la survie de ces patients (Avet-Loiseau et al., 2013). D'une façon intéressante, même au sein de ce sous-groupe, l'évolution des patients est assez hétérogène, suggérant que d'autres facteurs pourraient déterminer la réponse aux traitements.

Au cours de la première partie de mon travail de thèse, je me suis attachée à évaluer l'impact du point de cassure (Bp), intervenant dans les gènes *IgH* et *WHSC1*, dans le pronostic des malades avec t(4 ;14). Nos résultats, obtenus sur une très large série de 294 patients traités de façon homogène, indiquent que le point de cassure MB4-2 est associé au pronostic le plus mauvais des malades avec t(4 ;14). Cette évolution est particulièrement défavorable lorsque cet événement est associé à la perte du chromosome 17p. Les 2 autres Bp MB4-1 et -3 n'ont pas de valeur pronostique particulière. La particularité du point de cassure MB4-2 est qu'il produit une protéine MMSET tronquée comprenant une partie du domaine PWWP N terminal ainsi que le domaine SET, mais qui est dépourvue du site de phosphorylation sur la sérine 102. Ce résidu est une cible pour l'activité de la protéine ATM en réponse aux lésions sur l'ADN et semble être nécessaire pour le recrutement des facteurs de réparation de

l'ADN (Pei et al., 2011). Bien que le rôle de MMSET dans la réparation de l'ADN dans les plasmocytes ne soit pas établi, nos résultats suggèrent que la protéine issue de MB4-2 pourrait altérer le processus de réparation et contribuer à induire une instabilité génomique responsable de l'émergence de clones résistants aux traitements. Dans ce modèle, la protéine tronquée exprimée en excès à partir du promoteur Iμ jouerait un rôle dominant positif par rapport à la protéine native dans la progression tumorale. Cependant, au cours de la seconde partie de mon travail, j'ai montré qu'il existe une corrélation entre le Bp MB4-2 et les mutations dans le gène ATM. Bien que les conséquences fonctionnelles de ces mutations ne soient pas connues, les mutations de ATM sont souvent associées à une perte de fonction dans de nombreux cancers (Cremona and Behrens, 2014). De plus, nos résultats montrent que le nombre de mutations affectant les malades MB4-2 est similaire à celui dans les autres sous-groupes, suggérant un niveau comparable d'instabilité génomique. Dans ce contexte, l'association entre MB4-2 et les mutations de ATM pourraient révéler un autre processus oncogénique dans lequel MMSET ne serait pas directement impliqué dans le mécanisme de réponse aux dommages sur l'ADN.

Des travaux récents ont établi une corrélation entre la surexpression de MMSET, son activité HMT (H3K36me2) et son activité oncogénique dans des cellules NIH3T3 (Kuo et al., 2011). Ainsi, l'association de MB4-2 avec un mauvais pronostique dans le MM t(4 ;14) pourrait indiquer que la protéine MMSET issue de ces translocations pourrait exercer une activité HMT différente de la protéine native et de celle produite par le Bp MB4-3 dépourvue du domaine PWWP N terminal. Cette hypothèse est étayée par des travaux récents montrant que les mutants E1099K de MMSET, retrouvés dans environ 15% des LAL-B t(12;21), comme la protéine MB4-2, présentent une activité H3K36me2 plus importante que la protéine native (Jaffe et al., 2013). Ces données et nos résultats suggèrent que l'activité HMT excessive de MMSET-MB4-2 pourrait déréguler des loci particuliers et ainsi permettre l'expression (ou favoriser la mutation) de facteurs impliqués dans la progression du MM ou la résistance aux traitements, dont l'activité pourrait nécessiter l'inactivation de ATM. Des travaux visant à établir des corrélations entre les gènes dérégulés par la surexpression de MMSET et ceux mutés dans les MM t(4 ;14) contribueraient à valider cette hypothèse.

Les résultats de l'analyse de séquençage des MM t(4 ;14) révèlent à la fois l'existence d'un paysage mutationnel particulier pour ce sous-groupe de malades et de traits communs avec les autres MM. Tout d'abord, ils indiquent que le nombre de variants n'est pas associé d'une façon statistiquement significative ni au stade de la maladie, ni à la présence du Bp MB4-2. De plus, ils démontrent que les signatures mutationnelles ne sont pas spécifiques des MM t(4 ;14) MB4-2, mais comme dans la plupart des autres groupes, qu'elles correspondent à des mélanges de signatures génériques (signature 1) et APOBEC (signature 2). Enfin, en dehors de ATM, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence de mutations ponctuelles associées à ce sous-groupe. Dans leur ensemble, mes résultats ne supportent pas l'implication d'un processus mutationnel global spécifique des MM t(4 ;14) MB4-2.

A l'inverse, nos données dévoilent un éventail de mutations particulières dans les MM t(4 ;14) comparé aux autres groupes. En particulier, la fréquence des altérations de ATM est plus élevée (10%) que dans la totalité des MM (2-4%). Comme suggéré par d'autres études (Bolli et al., 2014; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2015), les mutations dans FGFR3 sont fréquentes et nous évaluons ici leur fréquence à environ 20% des cas. Trois autres gènes, *MYCBP2*, *MALAT1* et *PRKD2*, apparaissent mutés avec une fréquence plus élevée dans les MM t(4 ;14). De même, les membres de la famille des MAPK présentent des altérations dans près de d'un quart des malades. Enfin, d'une façon marquante, les gènes *TRAF3* et surtout *FAM46C* sont très rarement altérés dans les MM t(4 ;14).

La dérégulation de MYC est un événement très fréquent dans le MM qui intervient par divers mécanismes, en particulier par des translocations ou des amplifications génétiques (Walker et al., 2015). Globalement, la dérégulation de MYC est retrouvée dans environ 55% des cas est associée à un pronostic défavorable, pourtant, ces événement sont moins fréquents dans les MM t(4 ;14) (Affer et al., 2014). La régulation de l'activité des membres de la famille MYC répond à des processus complexes qui font intervenir différents mécanismes d'activation et d'inhibition post-traductionnels (Gustafson and Weiss, 2010). Ainsi, l'activité des Ubiquitin ligases jouent un rôle clé dans le niveau d'expression de MYC et leurs dérégulations sont associée à de nombreux cancers (Thomas and Tansey, 2011). MYCBP2 est une E3 Ubiquitine ligase qui interagit avec MYC dans des régions mutées dans des

prolifération lymphoïdes (Lymphomes). La fréquence relativement élevée de mutation dans le gène *MYCBP2* pourrait contribuer à augmenter le niveau d'expression de MYC dans les MM t(4 ;14) et fournir un rationnel à la diminution des altérations génétiques affectant le locus *MYC* dans ce sous-groupe de patients. Plus largement, mes résultats pourraient fournir un ratio pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblant l'activité de cette classe d'Ubiquitine ligases dans le MM.

Parmi les gènes qui semblent mutés d'une façon récurrente dans les MM t(4 ;14), nous avons identifié le gène *MALAT1* (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) qui produit un long ARN non codant (lncRNA). Ce locus est muté dans 17% des cas analysés par WES. En dépit de cette fréquence relativement élevée, nous n'avons pas retrouvé ce type de lésion génétique dans les MM étudiés par RNA-seq. L'analyse des données de WES et de RNA-seq sont réalisées selon des méthodes très différentes qui utilisent des algorithmes d'alignements particuliers. En particulier, le « mapping » des RNA-seq a été réalisé avec « MapSplice » qui restreint l'analyse aux espèces d'ARN épissées alors que les données de WES ont été alignées avec l'algorithme « Bowtie2 » qui prend en compte l'ensemble du génome humain. Alors que beaucoup de lncRNA ne sont pas épissés, il est probable que *MALAT1* n'est pas été pris en compte dans l'analyse par RNA-seq. Les lncRNA apparaissent aujourd'hui comme des éléments importants dans le contrôle de processus biologiques fondamentaux comme la prolifération, la différenciation ou les cancers (Brunner et al., 2012). MALAT1 est l'un des lncRNA les plus étudié et participe à la régulation des mécanismes d'épissage alternatif, de la transcription et semble être impliqué dans le développement de certains cancers (Gutschner et al., 2013). Plusieurs articles récents suggèrent l'implication de cet ARN dans le MM. Ainsi, l'expression de *MALAT1* est augmentée dans les plasmocytes tumoraux et est un indicateur de l'évolution de la maladie et de la réponse aux traitements (Cho et al., 2014). De plus, des approches génétiques ont démontré que l'expression de *MALAT1* est corrélée à la dérégulation de la voie p53 dans le MM (Ronchetti et al., 2001). Globalement, l'expression de ce lncRNA est associé à un pronostic défavorable. Bien que nous n'ayons pas pu corréler les mutations de *MALAT1* avec d'autres événements génétiques, nos résultats indiquent un lien entre cet ARN et la progression myélomateuse. Ils suggèrent que l'altération de la séquence de *MALAT1*

pourrait modifier sa fonction ou sa stabilité. Des travaux spécifiques visant à caractériser le rôle de *MALAT1* dans la biologie des plasmocytes tumoraux permettrait de jeter un éclairage nouveau sur les mécanismes associés non seulement à l'émergence du MM, mais aussi aux processus de chimio-résistances.

Notre analyse indique que la voie d'activation FGFR3/RAS/RAF/MAPK est la cible principale du processus mutationnel dans les patients t(4 ;14) et est affectée dans près de 65% des cas. En comparaison, les gènes tels que *TRAF3, CYLD* ou *LTB* impliqués dans la régulation de la voie NFκB (Lohr et al., 2014), sont plus rarement mutés dans les MM de notre série que dans l'ensemble des MM. Ce paysage mutationnel suggère l'existence d'un processus oncogénique propre au MM t(4 ;14) impliquant l'activation de la voie RTK/RAS/MAPK. D'une façon intéressante, les mutations dans les gènes *FGFR3, KRAS, NRAS* et *BRAF* semblent être mutuellement exclusives dans notre série, suggérant que l'activation d'une seule de ces protéines du signal est suffisante pour induire la progression du MM. Ce résultat est cohérent avec les données déjà publiées qui montrent, dans la plupart des cas de MM séquencés, des mutations soit dans *KRAS, NRAS* ou *BRAF* (Bolli et al., 2014). Cependant, cette conclusion était nuancée, d'une part par la présence de mutations activatrices à la fois dans *KRAS* et *NRAS* chez un patient et d'autre part, par la détection, dans plusieurs cas, de « reads » très minoritaires suggérant la présence de mutations simultanées dans ces gènes. Nos résultats montrent également la présence de « reads » minoritaires pouvant suggérer l'émergence de mutations à la fois dans les gènes *KRAS, NRAS* et *BRAF.* Cependant, compte tenu de la grande hétérogénéité intra-clonale qui caractérise le MM, nous pensons que les mutations secondaires minoritaires observées chez nos patients correspondent davantage à des clones différents qui, un à un pourraient n'avoir qu'une unique altération dans les locus *KRAS, NRAS* et *BRAF*. Nos résultats montrent que dans leur grande majorité, les cellules présentent des mutations exclusives dans les gènes *KRAS, NRAS* et *BRAF,* mais également dans le locus FGFR3. Quel que soit la redondance des altération dans les gènes *RAS* et *RAF*, l'ensemble de nos résultats souligne l'intérêt thérapeutique de la voie RTK/RAS/RAF/MAPK dans les MM t(4 ;14).

Un aspect original de notre travail est l'identification des mutations dans le gène *PRKD2*, codant pour la sérine/thréonine kinase PKD2 dans plus de 10% des patients portant la translocation t(4 ;14) et le fait que ces d'altérations semblent restreintes à ce sous-groupe de malades. La prépondérance des mutations de PKD2 dans les MM t(4 ;14) est confirmée par notre analyse de plus de 60 lignées de plasmocytes tumoraux qui indique que les mutations ponctuelles de *PRKD2* sont retrouvées exclusivement dans les lignées avec cette translocation. Une corrélation entre ces deux événements génétiques avait été rapportée par l'étude de Walker et collègues en 2015 et nos données sont en accord avec ces résultats. Elles suggèrent que les oncogènes FGFR3 et surtout MMSET, dérégulés par la translocation t(4 ;14), pourraient coopérer avec les mutants PKD2 dans l'évolution de ces myélomes. Un tel mécanisme est crédibilisé par la sélection d'un clone présentant une altération dans *PRKD2* au cours de la progression du patient P6 d'un stade asymptomatique à un MM symptomatique. De plus, un autre patient montrait l'acquisition d'une mutation de PKD2 dans les plasmocytes tumoraux lors de la rechute (Bolli et al., 2014 ; cette étude). Ces résultats suggèrent fortement l'implication de PKD2 dans l'évolution du MM t(4 ;14) et seule une étude plus large pourrait établir l'impact de ces mutations dans le pronostic des malades.

L'inhibition des voies de signalisation activées de façon constitutives dans les cellules tumorales représente une stratégie thérapeutique classique et souvent très efficace dans les hémopathies malignes. Ainsi, l'utilisation de l'Imatinib (Gleevec) pour inhiber l'activité de la protéine tyrosine kinase de fusion BCR-ABL1 a été déterminant dans le traitement des LMC. Dans le myélome, les inhibiteurs des PKC (enzastraurin), ont été testés en donnant des résultats intéressants, mais sans données moléculaires ou génétiques précises (Podar et al., 2007). Notre travail révèle l'implication de PKD2 dans la physiopathologie des MM t(4 ;14) et démontre l'efficacité de kb NB 142-70, un inhibiteur de cette kinase, dans l'inhibition de la prolifération des plasmocytes tumoraux et l'induction de leur apoptose *in vitro*. Comme l'enzastraurin, kb NB 142-70 est capable d'inhiber PKD2, mais à une concentration plus faible et semble plus spécifique (Bravo-Altamirano et al., 2011). Cette drogue a été évaluée dans le traitement du MM avec des résultats contrastés. Combinée au Bortezomib, l'enzastraurin semble donner des réponses complètes dans une majorité de malades (Ghobrial et al., 2011), alors qu'en monothérapie, elle

semble peu efficace (Jourdan et al., 2014). Nos résultats, qui identifient PKD2 comme une cible thérapeutique potentielle dans le MM, suggèrent qu'une inhibition plus étroite des protéines kinases D par des composés comme kb NB 142-70, en « épargnant » l'activité des PKC, pourrait être plus efficace et permettre l'utilisation de doses plus fortes chez les patients. Nos résultats ne nous permettent pas d'évaluer la spécificité de kb NB 142-70, mais ils jettent les bases pour des travaux visant à analyser l'intérêt de l'inhibition des PKD dans le MM.

En conclusion, mes travaux de thèse ont révélés l'intérêt de la détermination du point de cassure de la translocation t(4 ;14) pour évaluer le pronostique des MM t(4 ;14). Ils ont également permis de caractériser le paysage mutationnel de ce sous-groupe de myélome en identifiant plusieurs gènes altérés d'une façon récurrente chez ces patients. Parmi eux, les gènes codant pour les acteurs de la voie de signalisation FGFR3/RAS/RAF/MAPK semblent jouer un rôle prépondérant. D'une façon remarquable, mes données ont identifié le gène *PRKD2* comme un locus altéré spécifiquement dans les MM t(4 ;14) et nous ont conduit à démontrer l'intérêt thérapeutique d'un nouvel inhibiteur pharmacologique de ces kinases dans le MM. L'ensemble de ce travail permet de mieux comprendre la physiopathologie du myélome et pourrait conduire au développement de nouveaux traitements.

Références

Agazie, Y.M., Movilla, N., and Ischenko, I. (2003). The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. Oncogene 22, 6909–6918.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Campbell, P.J., and Stratton, M.R. (2013). Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. Cell Rep. 3, 246–259.

Allen, C.D.C., and Cyster, J.G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. Semin. Immunol. 20, 14–25.

Alt, F.W. (2007). From Gene Amplification to V(D)J Recombination and Back: a Personal Account of My Early Years in B Cell Biology. Eur. J. Immunol. 37, S138–S147.

Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of Programmed DNA Lesions and Genomic Instability in the Immune System. Cell 152, 417–429.

Ashman, C.R., and Davidson, R.L. (1987). Sequence analysis of spontaneous mutations in a shuttle vector gene integrated into mammalian chromosomal DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 3354–3358.

Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., et al. (2007a). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. Blood 109, 3489–3495.

Avet-Loiseau, H., Attal, M., and Moreau P (2007b). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. Blood Cancer J. 109, 3489–3495.

Avet-Loiseau, H., Li, C., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.-L., Attal, M., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T., et al. (2009). Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 27, 4585–4590.

Avet-Loiseau, H., Hulin, C., Campion, L., Rodon, P., Marit, G., Attal, M., Royer, B., Dib, M., Voillat, L., Bouscary, D., et al. (2013). Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myélome experience. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31, 2806–2809.

Avril López-Otero, Guillermo J. Ruiz-Delgado, Ana Hernández-Arizpe, Alejandro Ruiz-Argüelles, and Guillermo J. Ruiz-Argüelles. (2010). The flow-cytometric DNA content of the plasma cells of patients with multiple myeloma is a prognostic factor: a single institution experience. Hematology. 15(6), 378-381.

Barillé, S., Collette, M., and Bataille, R. (1995). Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. Blood 86, 3151–3159.

Bergemann, A.D., Cole, F., and Hirschhorn, K. (2005). The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. Trends Genet. TIG 21, 188–195.

Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene 20, 5611–5622.

Bergsagel, P.L., Mateos, M.-V., Gutierrez, N.C., Rajkumar, S.V., and San Miguel, J.F. (2013). Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. Blood 121, 884–892.

Bharti, A.C., Shishodia, S., Reuben, J.M., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. Blood 103, 3175–3184.

Bladé, J. (2006). Monoclonal gammophaathy of undetermined significance. N. Engl. J. Med. 355, 2765–2770.

Boboila, C., Oksenych, V., Gostissa, M., Wang, J.H., Zha, S., Zhang, Y., Chai, H., Lee, C.-S., Jankovic, M., Saez, L.-M.A., et al. (2012). Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 2473–2478.

Bolli, N., Avet-Loiseau, H., and Wedge, D. (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. Nat. Commun. 5.

Bravo-Altamirano, K., George, K.M., Frantz, M.-C., Lavalle, C.R., Tandon, M., Leimgruber, S., Sharlow, E.R., Lazo, J.S., Wang, Q.J., and Wipf, P. (2011). Synthesis and Structure-Activity Relationships of Benzothienothiazepinone Inhibitors of Protein Kinase D. ACS Med. Chem. Lett. 2, 154–159.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J Exp Med.192:1545–52.

Brito, J., Walker, B., and Jenner, M. (2009). MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. Haematologica 94, 78–86.

Brunner, A.L., Beck, A.H., Edris, B., Sweeney, R.T., Zhu, S.X., Li, R., Montgomery, K., Varma, S., Gilks, T., Guo, X., et al. (2012). Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. Genome Biol. 13, R75.

Bruno, B., Giaccone, L., and Rotta, M. (2005). Novel targeted drugs for the treatment of multiple myeloma: from bench to bedside. Leukemia 19, 1729–1738.

Carlebach, M., Amiel, A., Gaber, E., Radnay, J., Manor, Y., Fejgin, M., and Lishner, M. (2000). Multiple myeloma: monoallelic deletions of the tumor suppressor genes TP53 and RB1 in long-term follow-up. Cancer Genet. Cytogenet. 117, 57–60.

Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K., et al. (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. EMBO J. 17, 2404–2411.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity 10, 105–115.

Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.-P., Ahmann, G.J., Adli, M., et al. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature 471, 467–472.

Chaudhuri, J., and Alt, F. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. Nat. Rev. Immunol. *4*, 541–552.

Chauhan, D., Uchiyama, H., and Akbarali, Y. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. Blood *87*, 1104–1112.

Chen, H.X., and Sharon, E. (2013). IGF-1R as an anti-cancer target—trials and tribulations. Chin. J. Cancer *32*, 242–252.

Chen, E., Staudt, L.M., and Green, A.R. (2012). Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. Immunity *36*, 529–541.

Chen, J., Lee, B.H., Williams, I.R., Kutok, J.L., Mitsiades, C.S., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., Coburn, A., et al. (2005). FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. Oncogene *24*, 8259–8267.

Chesi, M., and Bergsagel, P.L. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. Blood *88*, 674–681.

Chesi, M., and Bergsagel, P.L. (2013). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. Int. J. Hematol. *97*, 313–323.

Chesi, M., Bergsagel, P.L., and Shonukan, O. (1998a). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. Blood *91*, 4457–4463.

Chesi, M., Nardini, E., and Lim, R. (1998b). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood *92*, 3025–3034.

Chesi, M., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2002). The enigma of ectopic expression of FGFR3 in multiple myeloma: a critical initiating event or just a target for mutational activation during tumor progression. Curr. Opin. Hematol. *9*, 288–293.

Chevrier, S., Emslie, D., Shi, W., Kratina, T., Wellard, C., Karnowski, A., Erikci, E., Smyth, G.K., Chowdhury, K., Tarlinton, D., et al. (2014). The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity. J. Exp. Med. 211, 827–840.

Chim, C.-S., Fung, T.-K., Cheung, W.-C., Liang, R., and Kwong, Y.-L. (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. Blood 103, 4630–4635.

Cho, S.-F., Chang, Y.C., Chang, C.-S., Lin, S.-F., Liu, Y.-C., Hsiao, H.-H., Chang, J.-G., and Liu, T.-C. (2014). MALAT1 long non-coding RNA is overexpressed in multiple myeloma and may serve as a marker to predict disease progression. BMC Cancer 14, 809.

Cremona, C.A., and Behrens, A. (2014). ATM signalling and cancer. Oncogene 33, 3351–3360.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu. Rev. Immunol. 29, 621–663.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer 6, 184–192.

Cyster, J.G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu. Rev. Immunol. 23, 127–159.

Daniels, G.A., and Lieber, M.R. (1995). RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. Nucleic Acids Res. 23, 5006–5011.

Davies, F.E., Dring, A., and Li, C. (2003). Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. Blood *102*, 4504–4511.

De Bruyne, E., Bos, T.J., Schuit, F., Van Valckenborgh, E., Menu, E., Thorrez, L., Atadja, P., Jernberg-Wiklund, H., and Vanderkerken, K. (2010). IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. Blood *115*, 2430–2440.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. J. Exp. Med. *197*, 1291–1296.

Dispenzieri, A., Gertz, M.A., Therneau, T.M. & Kyle, R.A. (2001) Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. Mayo Clinic Proceedings, *76,* 476–487.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. Cell *136*, 435–446.

Dong, C., Waters, S., and Holt, K. (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. J. Biol. Chem. *271*, 6328–6332.

Durie, B., and Salmon, S. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer *36*, 842–854.

Elgueta, R., de Vries, V.C., and Noelle, R.J. (2010). The immortality of humoral immunity. Immunol. Rev. *236*, 139–150.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat. Rev. Cancer *9*, 550–562.

Fairfield, H., Falank, C., and Avery, L. (2016). Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1364*, 32–51.

Fonseca, R., Oken, M., and Harrington, D. (2001). Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. Leukemia *15*, 981–986.

Fritz, EL., Rosenberg, BR., Lay, KA. (2013). A comprehensive analysis of AID's effects on the transcriptome and methylome of activated B cells. Nat. Immunol. *14(7)*, 749-755.

Fu, Y., and Rubin, C.S. (2011). Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. EMBO Rep. *12*, 785–796.

Gabrea, A., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2006). Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma. DNA Repair *5*, 1225–1233.

Garg, R., Benedetti, L.G., Abera, M.B., Wang, H., Abba, M., and Kazanietz, M.G. (2014). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. Oncogene *33*, 5225–5237.

Genschel, J., and Modrich, P. (2003). Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. Mol. Cell *12*, 1077–1086.

Genschel, J., Bazemore, L.R., and Modrich, P. (2002). Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. J. Biol. Chem. *277*, 13302–13311.

Ghobrial, I.M., Munshi, N.C., Harris, B.N., Shi, P., Porter, N.M., Schlossman, R.L., Laubach, J.P., Anderson, K.C., Desaiah, D., Myrand, S.P., et al. (2011). A phase I safety study of enzastaurin plus bortezomib in the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. Am. J. Hematol. *86*, 573–578.

Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. *16*, 225–260.

Golombick, T., Nut, D., and Diamond, T. (2016). Addition of Rice Bran Arabinoxylan to Curcumin Therapy May Be of Benefit to Patients With Early-Stage B-Cell Lymphoid Malignancies (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Smoldering Multiple Myeloma, or Stage 0/1 Chronic Lymphocytic Leukemia): A Preliminary Clinical Study. Integr. Cancer Ther.

Gomez-Bougie, P., Halliez, M., and Maïga, S. (2015). Curcumin induces cell death of the main molecular myeloma subtypes, particularly the poor prognosis subgroups. Cancer Biol. Ther. 16, 60–65.

Groen, R., de Rooij, M., and Kocemba, K. (2011). N-cadherin-mediated interaction with multiple myeloma cells inhibits osteoblast differentiation. Haematologica 96, 1653–1661.

Gustafson, W.C., and Weiss, W.A. (2010). Myc proteins as therapeutic targets. Oncogene 29, 1249–1259.

Gutschner, T., Hämmerle, M., and Diederichs, S. (2013). MALAT1 -- a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. J. Mol. Med. Berl. Ger. 91, 791–801.

Hanada, M., Feng, J., and Hemmings, B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. Biochim. Biophys. Acta 1697, 3–16.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674.

Harousseau, J.-L., Attal, M., and Avet-Loiseau, H. (2010). Bortezomib Plus Dexamethasone Is Superior to Vincristine Plus Doxorubicin Plus Dexamethasone As Induction Treatment Prior to Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Results of the IFM 2005-01 Phase III Trial. J. Clin. Oncol. *28*, 4621–4629.

Hebraud, B., Magrangeas, F., Cleynen, A., Lauwers-Cances, V., Chretien, M.-L., Hulin, C., Leleu, X., Yon, E., Marit, G., Karlin, L., et al. (2015). Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. Blood *125*, 2095–2100.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem. J. *374*, 1–20.

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. *4*, 988–1004.

Hideshima, T. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. Nat. Rev. Cancer *7*, 585–598.

Honjo, T., Muramatsu, M., and Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? Immunity *20*, 659–668.

Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. Nature *432*, 406–411.

Ichii, M., Oritani, K., and Kanakura, Y. (2014). Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. World J. Stem Cells *6*, 421–431.

Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A., and Muto, A. (2014). Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. Immunol. Rev. *261*, 116–125.

Imai, K., Zhu, Y., Revy, P., Morio, T., Mizutani, S., Fischer, A., Nonoyama, S., and Durandy, A. (2005). Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2. Clin. Immunol. Orlando Fla *115*, 277–285.

Jaffe, J.D., Wang, Y., Chan, H.M., Zhang, J., Huether, R., Kryukov, G.V., Bhang, H.C., Taylor, J.E., Hu, M., Englund, N.P., et al. (2013). Global chromatin profiling reveals NSD2 mutations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Nat. Genet. *45*, 1386–1391.

Janeway, C.A., Travers, P., and Walport, M. (2005). The Development and Survival of Lymphocytes. In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease,.

Jourdan, E., Leblond, V., Maisonneuve, H., Benhadji, K.A., Hossain, A.M., Nguyen, T.S., Wooldridge, J.E., and Moreau, P. (2014). A multicenter phase II study of single-agent enzastaurin in previously treated multiple myeloma. Leuk. Lymphoma *55*, 2013–2017.

Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., and Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Methods *159*, 197–207.

Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., et al. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. Immunity *26*, 555–566.

Kang, J.-H., Toita, R., Kim, C.W., and Katayama, Y. (2012). Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. Biotechnol. Adv. *30*, 1662–1672.

Kaufman, J., and Lonial, S. (2004). Multiple myeloma: The role of transplant and novel treatment strategies. Semin. Oncol. *31*, 99–105.

Keats, J., Reiman, T., and Maxwell, C. (2003). In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood *101*, 1520–1529.

Keats, J., Maxwell, C., and Taylor, B. (2005). Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16;q32)-positive multiple myeloma patients. Blood *105*, 4060–4069.

Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat. Rev. Immunol. *8*, 22–33.

Korde, N., Kristinsson, S., and Landgren, O. (2011). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. Blood *117*, 5573–5581.

Krejci, P., Mekikian, P.B., and Wilcox, W.R. (2006). The fibroblast growth factors in multiple myeloma. Leukemia *20*, 1165–1168.

Krejci, P., Murakami, S., Prochazkova, J., Trantirek, L., Chlebova, K., Ouyang, Z., Aklian, A., Smutny, J., Bryja, V., Kozubik, A., et al. (2010). NF449 is a novel inhibitor of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling active in chondrocytes and multiple myeloma cells. J. Biol. Chem. 285, 20644–20653.

Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat. Rev. Cancer 2, 175–187.

Kuhn, D.J., Berkova, Z., Jones, R.J., Woessner, R., Bjorklund, C.C., Ma, W., Davis, R.E., Lin, P., Wang, H., Madden, T.L., et al. (2012). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. Blood 120, 3260–3270.

Kumar, S., Witzig, T., and Timm, M. (2003). Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. Leukemia 17, 2025–2031.

Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K.C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., Munshi, N., Lonial, S., Bladé, J., Mateos, M.-V., et al. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol. 17, e328-346.

Kuo, A., Cheung, P., and Chen, K. (2011). NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. Molcular Cell 44, 609–620.

Kyle, R.A., San-Miguel, J., and Mateos, M. (1999). Monoclonal gammopathies of undetermined significance. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 13, 1181–1202.

Landgren, O., and Kyle, R.A. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 113, 5412–5417.

Laubach, J., Garderet, L., Mahindra, A., Gahrton, G., Caers, J., Sezer, O., Voorhees, P., Leleu, X., Johnsen, H.E., Streetly, M., et al. (2016). Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. Leukemia 30, 1005–1017.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., and Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. Nature *505*, 495–501.

Leonard, W.J. (2001). Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. Int. J. Hematol. *73*, 271–277.

Lin, K.-I., Tunyaplin, C., and Calame, K. (2003). Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. Immunol. Rev. *194*, 19–28.

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat. Rev. Drug Discov. 8, 627–644.

Lohr, J.G., Stojanov, P., and Carter, S. (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. Cancer Cell 25, 91–101.

Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. Science 267, 1825–1828.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. Mol. Cell 21, 187–200.

Maiso, P., Liu, Y., Morgan, B., Azab, A.K., Ren, P., Martin, M.B., Zhang, Y., Liu, Y., Sacco, A., Ngo, H., et al. (2011). Defining the role of TORC1/2 in multiple myeloma. Blood 118, 6860–6870.

Manier, S., Salem, K.Z., Park, J., Landau, D.A., Getz, G., and Ghobrial, I.M. (2016). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. Nat. Rev. Clin. Oncol.

Manis, J.P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., and Alt, F.W. (1998). Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. J. Exp. Med. 187, 2081–2089.

Marango, J., Shimoyama, M., and Nishio, H. (2008). The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. Blood 111, 3145–3154.

Martin, A., Li, Z., Lin, D.P., Bardwell, P.D., Iglesias-Ussel, M.D., Edelmann, W., and Scharff, M.D. (2003). Msh2 ATPase activity is essential for somatic hypermutation at a-T basepairs and for efficient class switch recombination. J. Exp. Med. 198, 1171–1178.

Martomo, S.A., Yang, W.W., and Gearhart, P.J. (2004). A role for Msh6 but not Msh3 in somatic hypermutation and class switch recombination. J. Exp. Med. 200, 61–68.

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 62, 551–577.

Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. Biochem. J. 332, 281–292.

Mitchell, J.S., Li, N., Weinhold, N., Försti, A., Ali, M., van Duin, M., Thorleifsson, G., Johnson, D.C., Chen, B., Halvarsson, B.-M., et al. (2016). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. Nat. Commun. *7*, 12050.

Moreau, P., Masszi, T., and Grzasko, N. (2016). Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N. Engl. J. Medcine *374*, 1621–1634.

Morgan, G.J., Walker, B.A., and Davies, F.E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. Nat. Rev. Cancer *12*, 335–348.

Munshi, N.C., Anderson, K.C., Bergsagel, P.L., Shaughnessy, J., Palumbo, A., Durie, B., Fonseca, R., Stewart, A.K., Harousseau, J.-L., Dimopoulos, M., et al. (2011). Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. Blood *117*, 4696–4700.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase

(AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. J. Biol. Chem. *274*, 18470–18476.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Fagarasan, S. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell *102*, 553–563.

Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N.A., and Honjo, T. (2007). Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. Adv. Immunol. *94*, 1–36.

Navarro, M.N., Sinclair, L.V., Feijoo-Carnero, C., Clarke, R., Matthews, S.A., and Cantrell, D.A. (2012). Protein kinase D2 has a restricted but critical role in T-cell antigen receptor signalling in mature T-cells. Biochem. J. *442*, 649–659.

Navarro, M.N., Feijoo-Carnero, C., Arandilla, A.G., Trost, M., and Cantrell, D.A. (2014). Protein kinase D2 is a digital amplifier of T cell receptor-stimulated diacylglycerol signaling in naïve $CD8^+$ T cells. Sci. Signal. *7*, ra99.

Nera, K.-P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.-M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. Immunity *24*, 283–293.

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

Nimura, K., Ura, K., and Shiratori, H. (2009). A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. Nature *460*, 287–291.

Nutt, S.L., Hodgkin, P., and Tarlinton, D. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 160–171.

Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. J. Biol. Chem. *281*, 38226–38234.

Ocqueteau, M., Orfao, A., Almeida, J., Bladé, J., González, M., García-Sanz, R., López-Berges, C., Moro, M.J., Hernández, J., Escribano, L., et al. (1998). Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. Am. J. Pathol. *152*, 1655–1665.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. Nat. Immunol. *12*, 695–708.

Olteanu, H., Wang, H.-Y., Chen, W., McKenna, R.W., and Karandikar, N.J. (2008). Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. BMC Clin. Pathol. *8*, 13.

O'Shea, J.J., Pesu, M., and Borie, D. (2004). A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. Nat. Rev. Drug Discov. *3*, 555–564.

Palumbo, A., and Anderson, K. (2011). Multiple Myeloma. N. Engl. J. Med. *364*, 1046–1060.

Palumbo, A., Sezer, O., Kyle, R., Miguel, J.S., Orlowski, R.Z., Moreau, P., Niesvizky, R., Morgan, G., Comenzo, R., Sonneveld, P., et al. (2009). International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. Leukemia *23*, 1716–1730.

Palumbo, A., Rajkumar, S.V., San Miguel, J.F., Larocca, A., Niesvizky, R., Morgan, G., Landgren, O., Hajek, R., Einsele, H., Anderson, K.C., et al. (2014). International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and

supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *32*, 587–600.

Pan-Hammarström, Q., Lähdesmäki, A., Zhao, Y., Du, L., Zhao, Z., Wen, S., Ruiz-Perez, V.L., Dunn-Walters, D.K., Goodship, J.A., and Hammarström, L. (2006). Disparate roles of ATR and ATM in immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation. J. Exp. Med. *203*, 99–110.

Park, S., Chapuis, N., Tamburini, J., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Willems, L., Green, A., Mayeux, P., Lacombe, C., and Bouscary, D. (2010). Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. Haematologica *95*, 819–828.

Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 9–22.

Pei, H., Zhang, L., and Luo, K. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. Nature *470*, 124–128.

Pei, H., Wu, X., and Liu, T. (2013). The histone methyltransferase MMSET regulates class switch recombination. J. Immunol. *190*, 756–763.

Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. Nature *418*, 99–103.

Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. Nature *432*, 635–639.

Pleiman, C.M., D'Ambrosio, D., and Cambier, J.C. (1994). The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. Immunol. Today *15*, 393–399.

Podar, K., Raab, M.S., Zhang, J., McMillin, D., Breitkreutz, I., Tai, Y.-T., Lin, B.K., Munshi, N., Hideshima, T., Chauhan, D., et al. (2007). Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). Blood *109*, 1669–1677.

Podar, K., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2009). Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. Leukemia *23*, 10–24.

Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K., and Nutt, S.L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 1719–1728.

Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. Curr. Biol. CB *12*, 1748–1755.

Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M., and Palumbo, A. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol. *15*, e538–e548.

Ramakrishnan, V., and D'Souza, A. (2016). Signaling Pathways and Emerging Therapies in Multiple Myeloma. Curr. Hematol. Malig. Rep. *11*, 156–164.

Ramakrishnan, V., Kimlinger, T., Haug, J., Painuly, U., Wellik, L., Halling, T., Rajkumar, S.V., and Kumar, S. (2012). Anti-myeloma activity of Akt inhibition is linked to the activation status of PI3K/Akt and MEK/ERK pathway. PloS One *7*, e50005.

Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. Nat. Immunol. *4*, 452–456.

Reaban, M.E., and Griffin, J.A. (1990). Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. Nature *348*, 342–344.

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

Reuter, C.W., Morgan, M.A., and Bergmann, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? Blood *96*, 1655–1669.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell *102*, 565–575.

Rizvi, M.A., Ghias, K., Davies, K.M., Ma, C., Weinberg, F., Munshi, H.G., Krett, N.L., and Rosen, S.T. (2006). Enzastaurin (LY317615), a protein kinase Cbeta inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. Mol. Cancer Ther. *5*, 1783–1789.

Rodrigue, A., Lafrance, M., Gauthier, M.-C., McDonald, D., Hendzel, M., West, S.C., Jasin, M., and Masson, J.-Y. (2006). Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. EMBO J. *25*, 222–231.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. *273*, 5858–5868.

Ronchetti, D., Greco, A., and Compasso, S. (2001). Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. Oncogene *20*, 3553–3562.

Rozengurt, E., Rey, O., and Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. J. Biol. Chem. *280*, 13205–13208.

San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., et al. (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. N. Engl. J. Med. *359*, 906–917.

Sato, N., Hattori, Y., Wenlin, D., Yamada, T., Kamata, T., Kakimoto, T., Okamoto, S., Kawamura, C., Kizaki, M., Shimada, N., et al. (2002). Elevated level of plasma basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. Jpn. J. Cancer Res. Gann *93*, 459–466.

Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. Nat. Rev. Immunol. *11*, 251–263.

Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. Immunity *27*, 49–63.

Scheid, C., Reece, D., Beksac, M., Spencer, A., Callander, N., Sonneveld, P., Kalimi, G., Cai, C., Shi, M., Scott, J.W., et al. (2015). Phase 2 study of dovitinib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma with or without t(4;14) translocation. Eur. J. Haematol. *95*, 316–324.

Schrader, C.E., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Stavnezer, J. (1999). Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes. J. Exp. Med. *190*, 323–330.

Schroeder Jr., H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S41–S52.

Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. Immunity *25*, 225–236.

Scuto, A., Krejci, P., Popplewell, L., Wu, J., Wang, Y., Kujawski, M., Kowolik, C., Xin, H., Chen, L., Wang, Y., et al. (2011). The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and

FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. Leukemia *25*, 538–550.

Shaughnessy, J.D., Zhan, F., Burington, B.E., Huang, Y., Colla, S., Hanamura, I., Stewart, J.P., Kordsmeier, B., Randolph, C., Williams, D.R., et al. (2007). A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. Blood 109, 2276–2284.

Shi, W., Liao, Y., Willis, S.N., Taubenheim, N., Inouye, M., Tarlinton, D.M., Smyth, G.K., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., and Corcoran, L.M. (2015). Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. Nat. Immunol. *16*, 663–673.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. Nat. Immunol. *4*, 435–441.

Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. Science *345*, 1058–1062.

Sibermann, R., and Roodman, G.D. (2013). Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. J. Bone Oncol. *2*, 59–69.

Smadja, N., Bastard, C., and Brigaudeau, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood *98*, 2229–2238.

Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., and Lonial, S. (2016). Treatment of Multiple Myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. Blood.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. Oncogene *26*, 7780–7791.

Spitaler, M., and Cantrell, D.A. (2004). Protein kinase C and beyond. Nat. Immunol. *5*, 785–790.

Sprynski, A.C., Hose, D., Caillot, L., Rème, T., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., Seckinger, A., Moreaux, J., Hundemer, M., Jourdan, M., et al. (2009). 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 113, 4614–4626.

Stark, G.R., and Darnell, J.E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. Immunity 36, 503–514.

Stavnezer, J., Guikema, J., and Schrader, C. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. Annu. Rev. Immunol. 26, 261–292.

Thomas, L.R., and Tansey, W.P. (2011). Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. Adv. Cancer Res. 110, 77–106.

Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature 302, 575–581.

Trudel, S., Li, Z.H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C., and Stewart, A.K. (2005). CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. Blood 105, 2941–2948.

Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 1158–1165.

Vanhaesebroeck, B., Leevers, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu. Rev. Biochem. *70*, 535–602.

Vincent, E.E., Elder, D.J.E., Thomas, E.C., Phillips, L., Morgan, C., Pawade, J., Sohail, M., May, M.T., Hetzel, M.R., and Tavaré, J.M. (2011). Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. Br. J. Cancer *104*, 1755–1761.

Vougiouklakis, T., Hamamoto, R., Nakamura, Y., and Saloura, V. (2015). The NSD family of protein methyltransferases in human cancer. Epigenomics *7*, 863–874.

Walker, B.A., Boyle, E., and Wardell, C. (2015a). Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. J. Clin. Oncol. *33*, 3911–3920.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Ross, F.M., Davies, F.E., Gonzalez, D., and Morgan, G.J. (2013). Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. Blood *121*, 3413–3419.

Walker, B.A., Wardell, C., and Murison, A. (2015b). APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. Nat. Commun. *6*.

Wu, X. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat. Rev. Cancer *5*, 713–725.

Xie, Z., and Chng, W.J. (2014). MMSET: role and therapeutic opportunities in multiple myeloma. BioMed Res. Int. *2014*, 636514.

Yaccoby, S., Wezeman, M., and Henderson, A. (2004). Cancer and the Microenvironment: myeloma-Osteoclast Interactions as a Model. Cancer Res. *64*, 2016–2023.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. Nature *449*, 478–482.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. Nat. Immunol. *4*, 442–451.

Zhan, F., Hardin, J., Kordsmeier, B., Bumm, K., Zheng, M., Tian, E., Sanderson, R., Yang, Y., Wilson, C., Zangari, M., et al. (2002). Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. Blood 99, 1745–1757.

Zhang, X., Bataille, R., and Jourdan, M. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. Blood *76*, 2599–2605.

Zingone, A., and Kuehl, W.M. (2011). Pathogenesis of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Progression to Multiple Myeloma. Semin. Hematol. *48*, 4–12.