

Thèse de Doctorat

Pierre GILLARDIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-santé*

Discipline : *Biologie des organismes – Biotechnologie animales, végétales et microbiennes*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *UMR1232*

Soutenu le *15 Décembre 2017*

Thèse N° :

Régulation épigénétique et protéique de p73 dans le myélome Multiple

JURY

Rapporteurs :

Brigitte SOLA, Directrice de recherche CNRS, équipe MICAH, UFR Santé Caen

Jérôme MOREAUX, Maître de conférences, Département d'Hématologie Biologique, CHU Montpellier

Directeur de Thèse :

Agnès MOREAU-AUBRY, Maître de conférence, Université de Nantes, UMR 1232

Co-directeur de Thèse :

Catherine PELLAT-DECEUNYNCK, Directrice de recherche CNRS, UMR1232

REMERCIEMENTS

Il me tient profondément à cœur de remercier Agnès Moreau-Aubry et Catherine Pellat-Deceunynck. De même, je dois remercier, pour mes stages de L3 et de M1, Vehary Sakanyan et sa collègue, Michèle Lecocq. En premier lieu, pour la qualité de leur encadrement, sous-tendu par une rigueur scientifique et leurs compétences inspirantes. Mais aussi et surtout pour leurs profondes qualités humaines – gentillesse, patience, bienveillance - qui m’ont tant apporté et m’ont permis de tenir. L’étudiant que je suis tiens à les remercier d’avoir été là pour me permettre d’apprendre. L’humain que je suis les remercie avec plus d’intensité encore pour avoir été là. Merci. Pour tout.

Ces considérations ne se limitent pas à mes encadrants directs. J’adresse à toute l’équipe 10 ma totale gratitude comme ma sympathie. Merci à Martine Amiot pour m’avoir accueilli dans son équipe, et pour nos échanges divers. Merci à Géraldine Descamps, pour les différentes techniques qu’elle m’a transmis et cette leçon qu’un sourire à quelqu’un qu’on croise dans un couloir ne coûte rien, mais peut offrir beaucoup. Merci à Sophie Maïga, pour l’aide régulière et patiente, la résistance peu commune à mes plaisanteries et son abnégation pour m’aider à ne pas repartir avec les bonbons et gâteaux que j’apportais. Merci à David Chiron pour ses conseils et remarques. Merci à Christelle Dousset, pour ses – nécessaires ! – rappels à l’ordre. Merci à Céline Bellanger pour ses conseils et enfin à Patricia pour les astuces, scientifiques comme esthétiques. Merci à tous pour votre patience. Ce que vous m’avez apporté en termes professionnels est précieux. Mais bien plus l’est ce que je que je garderai en dehors du laboratoire.

Remerciements également à mes co-rameurs sur la trirème de la recherche. Au Docteur Benoit Tessoulin dont les propos tranchants masquent mal la profonde gentillesse, à Antonin Papin et à ses remarques pertinentes et son équanimité, à Anne Lok pour les Western-Blot à pas d'heure, Charlotte Kervoelen pour l'accueil, Antoine Bonnet pour être le pénultième et Jessie Bourcier pour ses interrogations sociologiques

En dehors de l'équipe, je tiens à remercier Valérie Amarger et Delphine Fradin pour leur aide précieuse pour les techniques de pyroséquençage. Merci à Arianne Plet pour m'avoir amené sur cette voie.

Hors du laboratoire, je tiens à remercier mes amis. Emmanuel M.V. et Lena , Adrien-San , Marc Cram, Eleonore et Guillaume M.F., Vanessa, Julien, Valentin, Janic, Aurore, Laurence et tant d'autres. Merci pour les rires, pour le soutien dans les moments difficiles. Merci à vous aussi pour avoir été là. Merci d'être mes amis, pour le chemin parcouru. Je vous aime.

Merci à mon papa qui m'a soutenu de façon indéfectible et à Marie. Merci à ma sœur Manou, à ses enfants Martin, Grégoire et Clotilde. Merci à mon tonton Philippe pour son humour raffiné et à Josiane. Je vous aime.

Enfin, merci à Eya pour chaque instant, passé et à venir. Merci pour la lumière. Je t'aime ma chérie.

« When you're going through hell, keep going ! » Sir Winston Churchill, peintre Britannique.

« Il faut avoir voulu mourir pour savoir combien il est bon de vivre » Alexandre Dumas, Gastronomes dans « Le comte de Monte-Cristo ».

« So I hope you can accept nature as She is – absurd » Richard Feynman, crocheteur de serrures.

« Ce n'est qu'en essayant continuellement qu'on finit par réussir. En d'autres termes, plus ça rate, plus on a de chances que ça marche. » Les Shadoks, « Principes fondamentaux de la recherche - épistémologie appliqué à la paillasse ».

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIÈRES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
I - Le myélome multiple	9
A - Définition, caractérisation et prévalence	9
B - Oncogenèse et développement de la maladie	10
1 - A l'origine de la cellule de myélome, le plasmocyte.....	10
2 - Un cancer précédé d'un stade pré-malin, le MGUS	12
3 - Le myélome indolent.....	13
4 - Myélome multiple symptomatique	14
5 - Stade ultime de la maladie et établissement de lignées	14
C - Anomalies génétiques du myélome multiple	15
1 - Anomalies primaires.....	15
2 - Anomalies cytogénétiques secondaires	19
3 - La méthylation de l'ADN, anomalie secondaire.....	27
II - p53, au cœur de la cancérologie et du myélome multiple	31
A - Structure.....	31
B - Régulation	33
1 - P53 est finement régulé par (dé)ubiquitinylation	33
2 - Des modifications post-traductionnelles au secours de p53.....	34
C - P53, micro-processeur cellulaire	35
1 - P53, facteur de transcription	36
2 - P53, acteur cytoplasmique	38
D - Anomalies de p53 et cancers	38
1 - Délétion du bras du chromosome 17	39
2 - Mutations de <i>TP53</i>	39
3 - Hyperméthylation du promoteur du gène	40
E - p53 dans le myélome multiple	40
III - Le gène <i>TP73</i> et la protéine p73	42
A - <i>TP53</i> , une affaire de famille	42
B - Structure de <i>TP73</i> et de p73.....	43
C - Le niveau de transcrit de <i>TP73</i> est également sous régulation protéique	44
D - Régulations et modifications post-traductionnelles	44
E - p73, facteur de transcription.....	46
F - Isoformes de p73	47
G - P73 dans les cancers	49
H - Projet de thèse : étude de la répression et du déverrouillage de <i>TP73</i>	51

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	53
I - Lignées cellulaires.....	53
II - Traitement des cellules par des drogues.....	54
III - Traitement des cellules avec un agent déméthylant.....	54
IV - Traitements avec des agents alkylants.....	54
V - Traitement avec le MG132, un inhibiteur du protéasome et la nutlin-3a, antagoniste de MDM2.....	55
VI - Extraction ADN.....	56
VII - Conversion au bisulfite de Sodium.....	56
VIII - PCR.....	56
IX - PCR Méthylation-Spécifiques (MS-PCR).....	57
X - MS-PCR nichées.....	57
XI- PCR Pré-pyroséquençage.....	59
XII - Pyroséquençage.....	60
XIII - Extraction ARN.....	61
XIV - Reverse transcription.....	61
XV - PCR Quantitative :.....	61
XVI - PCR sur ADNc.....	62
XVII - Extraction et dosage des protéines.....	63
XVIII - Western-blots.....	63
XIX - Extinction de p53.....	65
RESULTATS.....	66
I - Expression constitutive de <i>TP73</i> dans les lignées de MM.....	66
II - Méthylation de l'îlot 302 CpG dans le promoteur de <i>TP73</i>	68
A - Position de l'îlot 302 CpG et obtention de la séquence.....	68
B - La conversion au bisulfite permet le ciblage de la méthylation par PCR.....	69
C - MS-PCR directes.....	75
D - MS-PCR nichées.....	76
1 - Mises au point sur ADN témoins et lignée XG5.....	76
2 - Amélioration de la conversion au bisulfite.....	80
3 - Résultats des MS-PCR nichées sur les lignées.....	82
E - Pyroséquençage de la zone ciblée par les MS-PCR.....	84
1 - Principe de la technique.....	84
2 - Pyroséquençage des CpG couverts par les amorces de MS-PCR.....	86
3 - Pyroséquençage de la dernière partie de l'îlot.....	89
F - La décitabine induit la transcription de <i>TP73</i> dans les lignées au promoteur méthylé.....	95
G - Nature des transcrits induits par la décitabine.....	96
H - Bilan sur la méthylation.....	98
III - Induction et stabilisation de p73.....	99
A - Agents alkylants et inhibiteur du protéasome.....	99
B - Rôle de p53 dans la réponse au melphalan.....	103
C - Effet de la nutlin-3a sur la protéine p73.....	104
D - Combinaison de déméthylation et de dommage à l'ADN.....	105
E - Bilan sur la régulation protéique de p73 par les agents alkylants.....	106

DISCUSSION/CONCLUSION	107
ANNEXE - ARTICLE : Decitabine and melphalan fail to reactivate p73 in p53 deficient myeloma cells	117
BIBLIOGRAPHIE	130

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
aCGH : array-Comparative genomic hybridization
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNc : ADN converti
Ag : Antigène
APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APC : Adenomatous Polyposis Coli
APS : Adenosine 5'-Phosphosulfate
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related

Bax : Bcl-2 Associated X
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
Bcl-XL : B cell Lymphoma extra-large
BRCA1 : Breast Cancer 1

CBP : CREB-Binding Protein
CDK4/6 : Cyclin Dependent Kinase 4/6
chk1/2 : checkpoint kinase 1/2
c-IAP2 : cellular inhibitor of apoptosis protein A/2
COP1 : Coat Protein 1
CRAB : Calcium level, Renal Dysfunction, Anemia, Bone lesion
CREB : c-AMP Response Binding protein
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

DIABLO : diablo IAP-Binding mitochondrial protein
DBD : DNA Binding Domain
DNMT : DNA Methyl-Transferase

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor 3
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GADD45a : Growth Arrest DNA-Damage inducible
GEP : Gene Expression Profiling
GPX3 : Glutathione Peroxidase 3

HAT : Histone Acetyl Transferase
HAUSP : Herpes virus Associated USP
HMCL : Human Myeloma Cell Line
h-MM : Myélomes hyperdiploïdes
hMOF : human Males Absent On the First

Ig : ImmunoGlobuline
IL-6 : Interleukine 6
IMWG : International Myeloma Working Group
Itch : Itchy Homolog
JNK ; Jun N-terminal Kinase

LINE-1 : Long Intersped Nuclear Element 1
LOH : Loss Of Heterozygosity

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MCL-1 : Myeloid leukemia Cell différenciation protein
MDM2/4/X : Mutant Double Minute 2/4/X
MGUS : Monoclonal Gammopathies of Undetermined Significance
MM : Myelome Multiple
MMSET : Multiple Myeloma SET domain
MULE : Mcl-1 Ubiquitin-Ligase E3
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin

NES : Nuclear Export Signal
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa
Nh-MM : Myélomes non-Hyperdipoïdes
NIK : NF-kappa-B-inducing kinase
NLS : Nuclear Localisation Signal
NSD2 : Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein

OD : Oligomerisation Domain

PAX1 : PAired boX 1
PC : Plasmocyte
PCAF : P300/CBP-associated factor
PCL : Plasma Cell Leukemia
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pirh2 : p53 Induced Ring H2 domain protein
PR : Prolin Rich
PRIMA : p53 reactivation and induction of massive apoptosis
PUMA : p53-Upregulated Mediator of Apoptosis

Q-PCR : quantitative PCR

Rb : RetinoBlastoma protein
RE : Response Element

SAM : Sterile Alpha Motif
SAT- α : Satellite alpha
SP1 : Specificity Protein 1
SPARC : Secreted Protein, Acidic and Cystein-Rich protein

TGFBI : Transforming Growth Factor Beta 1
TID : Transcription Inhibitory Domain
TIP60 : Tat Interacting Protein 60)

UCSC : University of California, Santa-Cruz
USP7/10 : Ubiquitin Specific Protein 7/10

WB : Western-Blot
WT : Wild-Type

YAP : Yes-Associated Protein

WHSC1 : Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1

INTRODUCTION

I - Le myélome multiple

A - Définition, caractérisation et prévalence

Le myélome multiple (ou MM) est une tumeur hématologique, caractérisée par la survie et la multiplication anormales de plasmocytes, généralement dans la moelle osseuse. Cette accumulation anormale de plasmocytes tumoraux conduit à un pic monoclonal d'immunoglobulines (Ig) dans le sang. Ce pic est détectable par électrophorèse des protéines sanguines et l'accumulation de ces immunoglobulines provoque une insuffisance rénale. La multiplication des cellules tumorales au détriment des cellules médullaires saines conduit quant à elle à une anémie et une immunodépression. Un des principaux critères de diagnostic est la lyse osseuse provoquée par les cellules tumorales. En effet, cette lyse osseuse s'accompagne souvent de douleurs osseuses, augmente les risques de fractures spontanées et libère du calcium qui, en raison de l'insuffisance rénale va s'accumuler en hypercalcémie, ce qui constitue deux autres critères de diagnostic. De manière générale, le diagnostic de MM symptomatique doit remplir les critères du « CRAB » (pour Calcium level, Renal dysfunction, Anemia, Bone lesion) réunissant ces diverses atteintes (Rajkumar et al., 2014). Avec une incidence annuelle de 5,6 cas pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux, cette pathologie représente 1 % des cancers environ et 2 % de tous les décès par cancers, constituant de ce fait le second type de tumeurs hématologiques en nombre, derrière les lymphomes non-hodgkiniens.

De même que ces derniers, le myélome multiple est principalement une pathologie du sujet âgé, avec un âge moyen de 67 ans au diagnostic, et touche d'avantage les hommes que les femmes.

Durant la dernière décennie, un grand nombre de nouvelles approches thérapeutiques a été testé (Anderson, 2016). Ces tests ont conduit à l'utilisation de nouveaux médicaments, tels que les inhibiteurs du protéasome ou les IMiD (Brenner et al., 2008; Kumar et al., 2008; Turesson et al., 2010). Ces nouveaux médicaments ont permis une augmentation de la qualité de vie et de l'espérance de vie des patients, celle-ci dépassant parfois dix ans. Ce qui transforme ce cancer en maladie chronique, en particulier chez les patients les plus jeunes. Néanmoins, cette maladie demeure incurable et une grande disparité existe entre les patients vis à vis des réponses obtenues.

B - Oncogénèse et développement de la maladie

1 - A l'origine de la cellule de myélome, le plasmocyte

Les plasmocytes sécréteurs d'anticorps constituent l'étape ultime de la différenciation lymphocytaire B. Cette dernière étape peut être le fruit d'une confrontation avec un antigène entraînant sa différenciation immédiate. Mais cette différenciation peut aussi impliquer le passage par un centre germinatif associé une hypermutation somatique et à une commutation isotypique, permettant une augmentation de l'affinité de l'Ig pour son antigène. Dans le premier cas, le plasmocyte sera à courte durée de vie et sécrètera des Ig de type M, dans le second, il sera à longue durée de vie et sécrètera des Ig de type G, A.

Les cellules de MM sécrètent des Ig de type G ou A présentent des mutations dans les séquences hypervariables des chaînes lourdes des Igs témoignant de commutation isotypique et d'hypermutation somatique, et ce, de façon stable au décours de la maladie, ce qui suggère que la cellule de MM provient de la transformation tumorale d'un lymphocyte B au stade post-germinatif ou d'un plasmoblaste (Bakkus et al., 1992; Vescio et al., 1995).

L'origine de la cellule transformée, lymphocyte B post germinatif/plasmoblaste/plasmocyte, est toujours sujet à débat (Chiron et al., 2012; Johnsen et al., 2016). Ce débat est néanmoins important, car identifier et cibler le réservoir tumoral non plasmocytaire pourrait mener à la guérison des patients. Une grande part de l'origine du débat tient au phénotype, en particulier l'expression des CD19, CD38, CD138, des cellules capables de générer des tumeurs *in vitro* ou *in vivo*. Les plasmocytes normaux et tumoraux surexpriment les marqueurs CD38 et CD138 mais sous expriment le CD19 par rapport aux lymphocytes B (Bataille et al., 2006; Rawstron et al., 2008) : l'expression du CD138 est acquise très tardivement, après le stade plasmoblastique (Jego et al., 2001). L'équipe de Brigitte Sola a montré que la sénescence induit une plasticité du phénotype (plus proche des lymphocytes B que des PCs) des cellules de lignées de MM et que les cellules sénescents sont tumorigènes (Cahu et al., 2012). Le débat est complexifié par la perte de l'expression membranaire du CD138 lorsque les cellules entrent en apoptose (Jourdan et al., 1998). Comme le propose Johnsen dans sa revue récente, les analyses à l'échelle de la cellule isolée, analyses dites « single cell », permettront peut-être de clore ce débat et de pouvoir cibler avec certitude le réservoir tumoral.

2 - Un cancer précédé d'un stade pré-malin, le MGUS

Le myélome multiple évolue toujours depuis un stade pré-malin, la Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée (MGUS pour Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) qui est caractérisée par un pic monoclonal d'Ig et un faible envahissement de PC dans la moelle osseuse (Landgren et al., 2009; Weiss et al., 2009). Les cellules de MGUS sont des plasmocytes monoclonaux localisés dans la moelle osseuse qui présentent des anomalies cytogénétiques (translocations chromosomiques impliquant le locus 14q32) qualifiées de primaires car elles sont retrouvées tant dans les cellules de MGUS que dans les cellules de MM.

Les patients au stade MGUS ont une probabilité de transformation en myélome multiple de 1 % par an. Cette faible probabilité fait que la majorité des MGUS n'évolue pas en MM, le MM étant diagnostiqué chez des patients qui ont un âge moyen de 65-70 ans. Pour avoir lieu, la transformation nécessite la survenue d'anomalies chromosomiques supplémentaires, dites « secondaires », en particulier des mutations de *RAS* (**figure 1**).

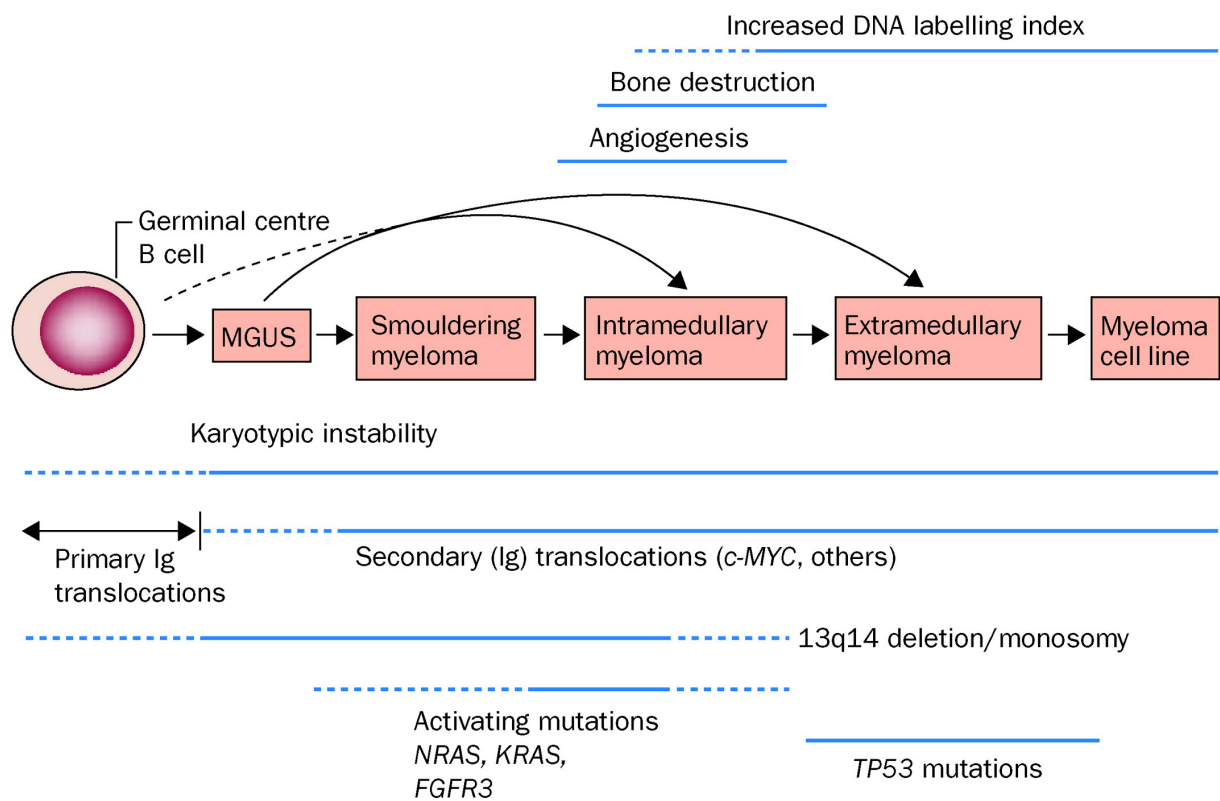


Figure 1 : Le MM évolue à mesure que s’accumulent les anomalies (Repris depuis Sirohi and Powles, 2004).

3 - Le myélome indolent

Le myélome peut être dans un premier temps asymptomatique (myélome indolent ou SMM pour Smouldering Multiple Myeloma), restant alors principalement intra-médullaire. Cet état de myélome indolent est différencié du stade MGUS par un pic sérique d’immunoglobuline monoclonale plus important (supérieur à 30 g/l de sérum) et/ou par une plasmocytose médullaire plus importante (supérieure ou égale à 10 %). Ce stade de myélome indolent a un risque d’évoluer en myélome multiple symptomatique de 10 % par an pendant les 5 années suivant le diagnostic. Passées ces 5 premières années, les risques d’évolution en myélome symptomatique redeviennent de 1 % par an pendant les dix années suivantes (Kyle et al., 2007).

4 - Myélome multiple symptomatique

Si évolution il y a, le diagnostic de myélome multiple se fait à partir des critères précédents (pic sérique d'immunoglobuline monoclonale et plasmocytose médullaire supérieure à 10 %) couplés à au moins une manifestation clinique (hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésion osseuse...). En d'autres termes, seules les manifestations cliniques distinguent le myélome multiple du myélome indolent. Aussi le traitement des patients au stade de myélome asymptomatique, basé en particulier sur la détection de biomarqueurs spécifiques des forts risques d'évolution, est une piste de recherche visant à une amélioration de la prise en charge de la maladie (Rajkumar et al., 2015). Au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, les anomalies secondaires vont s'accumuler et potentiellement influencer le pronostic et la réponse aux traitements (Fonseca et al., 2014).

5 - Stade ultime de la maladie et établissement de lignées

Depuis un développement intra-médullaire, les plasmocytes sont susceptibles d'envahir le sang, ainsi que d'autres compartiments (plèvre, liquide céphalo rachidien) et de transformer le myélome en leucémie à plasmocytes (ou PCL pour Plasma Cell Leukemia). Cette PCL peut présenter une plasmocytose sanguine supérieure à 20 %, ce qui correspond au stade le plus agressif de la maladie, qui n'est néanmoins atteint que par 2 à 4 % des cas de MM. Si la PCL est une évolution du MM préexistant, elle est qualifiée de secondaire, tandis que si elle concomitante au diagnostic de MM, elle est qualifiée de primaire. Dans les deux cas, ce stade est associé à une faible espérance de vie ainsi qu'à une forte résistance aux traitements (Gonsalves et al., 2014).

Principalement à partir de PCL, les laboratoires ont réussi à obtenir de façon reproductible des lignées de myélome multiple (ou HMCL pour Human Myeloma Cell Lines) (Zhang et al., 1994). L'étude du Gene Expression Profiling (ou GEP) des lignées de MM a montré que les lignées étaient représentatives, bien qu'imparfaitement, de la diversité génomique du MM (Moreaux et al., 2011). Imparfaitement car, par exemple, le sous-groupe hyperploïde n'est que peu représenté dans les lignées bien qu'au moins trois lignées hyperdiploïdes aient été établies (Våtsveen et al., 2009, 2016).

C - Anomalies génétiques du myélome multiple

1 - Anomalies primaires

Comme dit précédemment, les anomalies cytogénétiques primaires sont présentes dès le stade pré-malin. Plus la maladie évolue, plus les anomalies s'accumulent. Néanmoins, les anomalies cytogénétiques primaires sont acquises initialement, sont stables et se retrouvent jusqu'au stade de PCL. Toutes ces anomalies cytogénétiques n'ayant pas la même valeur pronostique, l'étude des anomalies est un enjeu en vue d'une prise en charge appropriée et prédictive. Depuis 2009, l'international Myeloma Working Group (IMWG) classe les patients atteints en deux catégories : Les hyperploïdes (h-MM), les non hyperploïdes (nh-MM)(Fonseca et al., 2009, 2014).

Le groupe des non-hyperploïdes s'articule principalement autour des translocations illégitimes « *IgH* » (Immunoglobulin Heavy locus). Celles-ci se classent en trois catégories principales : les translocations dites « cycline D », les translocations « *MMSET* » et les translocations « *MAF* ».

Quelle que soit la translocation, le MM se caractérise par une dérégulation – directe ou indirecte – des cyclines D1, D2 ou D3. Dans ces MM, le niveau d'ARNm d'au moins une de ces cyclines D des plasmocytes tumoraux est supérieur à celui des plasmocytes normaux (Bergsagel and Kuehl, 2003; Bergsagel et al., 2005; Hideshima et al., 2004). L'association de ces cyclines avec la Cyclin-Dependant Kinase 4 (CDK4) et la Cyclin-Dependant Kinase 6 (CDK6) va conduire à la phosphorylation de la protéine Rb, ce qui conduit à son inactivation. Cette inactivation permet la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, conduisant à une prolifération cellulaire.

a - Hyperploïdies

Les hyperploïdies (h-MM) concernent environ 45 % des patients atteints de MM et correspondent à un nombre de chromosome compris entre 48 et 75 chromosomes (Carrasco et al., 2006). Comme toutes les anomalies primaires, elles sont présentes dès le stade MGUS et identifiables par aCGH (array based Comparative Genomic Hybridization). Il s'agit de l'accumulation de multiples trisomies, concernant tout particulièrement les chromosomes impairs avec, par ordre décroissant de fréquence, des trisomies des chromosomes 15, 9, 5, 19, 3, 11, 7, 21. Toutes ces trisomies n'ont pas le même impact sur l'évolution de la maladie. Les trisomies des chromosomes 3 et 5 sont associées à un meilleur pronostic et, au contraire, les trisomies du chromosome 21 sont associées à une plus faible espérance de vie (Chretien et al., 2015). Dans l'ensemble, les hyperploïdies ne sont pas par elles-mêmes considérées comme un mauvais facteur pronostique.

Ces hyperploïdies présentent une très faible prévalence de translocations *IgH* et mènent à une dérégulation directe de la cycline D1 mais avec une plus faible expression qu'en cas de translocation.

b - Non-hyperploïdies

Les MM non hyperdiploïdes (nh-MM) correspondent le plus souvent à des translocations entre le locus du gène *IgH* – plus précisément au niveau de la région switch – situé sur le chromosome 14 (14q32) et l'un des six partenaires récurrents. Ceux-ci sont les chromosomes 4, 6, 11, 12, 16 et 20. Ces translocations sont associées à de plus grands risques de progression de la maladie : retrouvées dans 46 à 48 % des MGUS et SMM, elles sont détectées dans 55 à 73 % des MM intra-médullaires, 85 % des PCL pour enfin atteindre plus de 90 % des HMCLs (Fonseca et al., 2002; Kuehl and Bergsagel, 2002; Moreaux et al., 2011). Toutes sont identifiables par GEP ou Gene Expression Profiling.

Translocation « cycline D »

La translocation t(11;14)(q13;q32) représente 15 à 20 % de tous les MM et consiste en une recombinaison entre la zone switch du gène *IgH* et le gène de la cycline D1 sur le chromosome 11. La t(6;14)(p21;q32) consiste quant à elle en une recombinaison du gène *IgH* avec celui de la cycline D3 et représente 5 % de l'ensemble des MM (Sawyer, 2011; Stewart and Fonseca, 2005). Ces deux recombinaisons conduisent à une dérégulation directe de ces cyclines, responsable d'une prolifération cellulaire anormale.

Translocation MMSET :

Dans 15 % des MM est retrouvée la translocation t(4;14)(p16;q32) qui consiste en une recombinaison illégitime entre le gène *IgH* et l'extrémité télomérique du bras court du chromosome 4. Associée à un mauvais pronostic, cette translocation diffère des autres car deux gènes sont dérégulés : le gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) et le gène *MMSET* (pour Multiple Myeloma SET domain aussi nommé *WHSC1* pour Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 ou encore *NSD2* pour Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2). Le gène *NSD2* code pour une protéine de la famille des histone méthyl-transférases tandis que le gène *FGFR3* code pour le récepteur d'une tyrosine kinase.

Si ces deux gènes sont dérégulés, les deux ne semblent pas avoir le même rôle dans l'oncogénèse. Plusieurs études tendent à montrer que le gène *NSD2* est plus impliqué dans l'oncogénèse que le gène *FGFR3* (Min et al., 2013a; Mirabella et al., 2013). Ainsi, si la surexpression du gène *FGFR3* est perdue pour 30 % des patients t(4 ;14), celle de *NSD2* est présente chez tous et apparaît nécessaire à la prolifération, à l'inhibition de l'apoptose et à l'adhéRENCE cellulaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés, incluant un remodelage de la chromatine, une augmentation du niveau de c-MYC ou l'action d'un microARN (Martinez-Garcia et al., 2011; Min et al., 2013b).

Translocations MAF

La translocation t(14;16)(q32;q23) représente 5 à 10 % MM et mène à la dérégulation de *c-Maf* (pour musculoaponeurotic fibrosarcoma). La translocation t(14;20)(q32;q11) représente quant à elle moins de 5 % des MM et conduit à la dérégulation de *MAFB*. C-MAF et MAFB, les protéines respectivement codées par ces gènes, sont des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, l'adhérence aux cellules stromales et l'acquisition de la chimiorésistance (Hurt et al., 2004a). Dans le cadre du MM, ces translocations provoquent une dérégulation de la cycline D2 (Hurt et al., 2004b).

2 - Anomalies cytogénétiques secondaires

Les anomalies cytogénétiques primaires sont souvent mutuellement exclusives, stables au décours de la maladie (depuis le stade pré-malin jusqu'à la PCL), partagées par l'ensemble ou la grande majorité des cellules tumorales et insuffisantes pour conduire à un stade tumoral malin. Il en va autrement pour ce qui est des anomalies secondaires. En effet, celles-ci sont à l'origine de l'évolution vers le MM. Elles apparaissent progressivement, s'accumulent et ne sont pas nécessairement partagées par l'ensemble des cellules tumorales. Elles sont également plus nombreuses et plus diverses, pouvant correspondre à de nouvelles anomalies chromosomiques (délétions, amplifications, translocations) ou à des mutations ponctuelles. Elles peuvent également être des dérégulations épigénétiques incluant des modifications de la méthylation de l'ADN, de la compaction de la chromatine (Martinez-Garcia et al., 2011) - en particulier dans le cas de la translocation *NSD2* (Kuo et al., 2011) – ou encore à de l'expression de miRNA (Saki et al., 2014).

Ces anomalies vont apparaître progressivement dans certaines cellules tumorales. Elles sont susceptibles de fournir des avantages aux cellules en question, leur permettant – par exemple – de mieux résister aux traitements. Elles vont donc définir des clones tumoraux, sélectionnés par diverses pressions de sélection (incluant la concurrence des autres clones tumoraux) selon un modèle darwinien qui va conditionner l’aggravation de la maladie (Bahlis, 2012) (Figure 2).

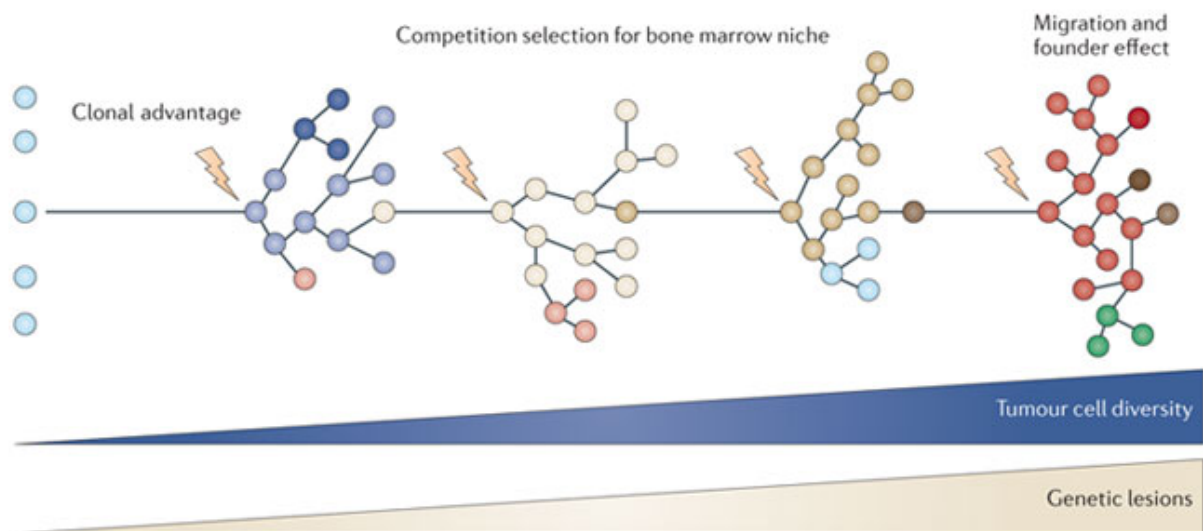


Figure 2 : Le développement du MM suit un modèle darwinien (Repris depuis Morgan et al., 2012).

Ces anomalies peuvent être identifiées en utilisant différentes approches, telles que l’analyse par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), aCGH, analyse de SNP...En d’autres termes, le développement des technologies de biologie moléculaire a été au cœur de la découverte des critères pronostiques du MM.

a - Monosomie ou délétion du chromosome 13

Il s'agit d'une monosomie du chromosome 13 dans 85 % des cas ou d'au moins une délétion partielle du bras court, généralement au niveau du locus 13q14. C'est une anomalie très fréquente, que l'on retrouve dans environ la moitié des MGUS (Fonseca et al., 2002).

Cette monosomie induit une perte d'hétérozygotie du gène *RB1* codant pour la protéine Rb qui régule l'entrée en phase S, cible du complexe Cycline D/Cyclin-Dependantes Kinases. Néanmoins, les effets de cette anomalie restent soumis à controverse (Van Dyke et al., 2010).

b - MYC, cible de dérégulations

MYC est un proto-oncogène et la protéine pour laquelle il code joue le rôle de facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Situé au niveau du locus 8q24 (bras long du chromosome 8) son gène est parfois impliqué dans des translocations. Ces translocations ont une faible prévalence lors du stade MGUS, d'environ 15 % au début du stade MM pour atteindre 90 % dans les HMCLs. Ces translocations, comme les translocations « primaires », impliquent souvent le locus *IgH* et se retrouvent davantage dans les h-MM. Cette translocation est impliquée dans la progression de la maladie ainsi que dans la résistances aux drogues, en particulier aux agents alkylants comme le melphalan (Affer et al., 2014; Chesi et al., 2008; Greco et al., 2006).

c - Mutations de *RAS*

Les deux protéines de la famille Ras, N-Ras et K-Ras sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, du cytosquelette ou encore de l'autophagie. Leurs gènes codants, *NRAS* et *KRAS* constituent des proto-oncogènes, mutés dans 40 à 55 % des MM sur les codons 12, 13, ou 61 (contre 5 % des MGUS). Ces mutations sont associées à la transformation des cellules de MGUS en MM (Rasmussen et al., 2005). Elles sont associées à une résistance à la chimiothérapie et à la diminution de la dépendance des cellules à l'interleukine 6 ainsi qu'à l'activation constitutive anormale de plusieurs voies de signalisation, comme ERK (Extracellular Regulated Kinase), Akt (Akt strain transforming), mTOR (mechanistic Target of rapamycin) et NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) (Billadeau et al., 1995, 1997; Hoang et al., 2006; Hu et al., 2003). Au niveau clinique, les mutations de *KRAS* en particulier étaient initialement associées à un mauvais pronostic. Des études récentes semblent indiquer que Ras induirait une dépendance à NF- κ B et les mutations de *RAS*, en particulier de *KRAS*, pourraient réduire la sensibilité au bortezomib (Mulligan et al., 2014; Smith et al., 2015).

d – NF-kB, voie sur-activée dans le MM

La voie NF-kB est retrouvée anormalement constitutivement active dans environ la moitié des cas de MM et est la conséquence de l'inactivation de répresseurs de la voie NF-kB provoquée par des délétions chromosomiques et des mutations dont celles de *TRAF3* (TNF Receptor Associated Factor 3) et de *CIAP1/2* (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein) ou la conséquence de l'hyperactivation d'acteurs de cette voie provoquées par des amplifications/translocations chromosomiques (touchant *NFkB1*, *NFkB2* et *NIK*, pour NF-kB inducing Kinase) (Annunziata et al., 2007; Demchenko et al., 2010; Keats et al., 2007). L'influence de ces altérations de la voie NF-kB sur le pronostic reste néanmoins à élucider.

e - Deletion du bras court du chromosome 17

La délétion du bras court du chromosome 17, del(17p), ou plus précisément du locus 17p13, constitue l'anomalie secondaire associée au pire facteur pronostique avec une multi-résistance aux traitements de chimiothérapie, et une survie significativement moindre des patients (Avet-Loiseau et al., 2012). Cette anomalie n'est peu ou pas retrouvée au stade MGUS et ne cesse de devenir de plus en plus fréquente à mesure que la maladie progresse (Hebraud et al., 2015). Plus grave encore : la délétion du locus 17p13 pourrait favoriser l'évolution vers des stades extra-médullaires de PCL (Fonseca et al., 2003; Thanendrarajan et al., 2017; Weinhold et al., 2016).

Ce locus porte le gène *TP53* codant pour la protéine p53 bien connue en cancérologie. Elle est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (Farnebo et al., 2010). *TP53* est le gène le plus fréquemment muté (50 % des cancers) et ses mutations sont associées à une plus faible espérance de vie, une résistance accrue aux traitements ainsi qu'à des formes plus agressives des tumeurs. Dans le MM, les mutations de *TP53* ne se retrouvent qu'en présence de la del(17p) (Lodé et al., 2010).

f - Les anomalies du chromosome 1, une anomalie secondaire fréquente

En plus d'être fréquemment impliqué dans les hyperploïdies, le chromosome 1 est touché par deux formes d'anomalies, toutes deux associées à une transition du stade MGUS au stade MM. Elles touchent environ 1/3 des patients et sont associées à un mauvais pronostic. Deux anomalies principales sont retrouvées :

Gain de plusieurs copies du bras long du chromosome 1 : ce gain part généralement de la région péricentrométrique (Hanamura et al., 2006; Le Baccon et al., 2001; Sawyer et al., 1998). Le mauvais pronostic pourrait être la conséquence d'une surexpression de *CKS1B* (Cyclin Kinase Subunit 1) impliqué dans la dégradation d'un inhibiteur du cycle cellulaire, *p27^{kip1}*. Mais par ailleurs, le bras long du chromosome 1 porte le gène codant pour *MCL-1* (Myeloid leukemia Cell différenciation protein), une protéine dont la surexpression est un facteur de mauvais pronostic, et *IL-6R*, ou Récepteur à l'interleukine 6 également présumé comme oncogène (De Veirman et al., 2015; Kim et al., 2011).

Perte du bras court du chromosome 1 : Cette délétion (del1p) est également associée à un mauvais pronostic ainsi qu'au passage du stade MGUS au SMM, ce qui est attribué à la perte de différents gènes (Chiecchio et al., 2009; Hebraud et al., 2014; Li et al., 2016).

g – mutations associées au MM

Si les translocations et anomalies du nombre de chromosomes sont considérées comme des critères de classification des MM, les mutations génétiques s'avèrent également avoir une importance cruciale dans l'oncogénèse et le pronostic du MM. Ainsi, en 2015, l'équipe de Brian A. Walker a réalisé une étude par séquençage d'exome entier sur des échantillons issus de 463 patients soumis à divers protocoles de traitement (Walker et al., 2015). La cohorte de ces patients couvrait l'ensemble des anomalies cytogénétiques décrites jusqu'ici (hyperdiploïdies, translocations...). Cette étude a permis d'identifier les gènes fréquemment mutés, la position de certaines mutations au sein de ces gènes, la valeur pronostique de ces anomalies ou encore les associations statistiques entre les diverses anomalies cytogénétiques et les gènes retrouvés mutés. Une quinzaine de gènes avait ainsi été retrouvée mutée.

La voie RAS/MAPK était, comme décrit précédemment, la principale voie touchée par des mutations. Ainsi, au moins un des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* était muté dans 43 % des cas, sans valeur pronostique mais avec un possible rôle dans l'évolution de la maladie. Ces mutations pourraient néanmoins offrir une possibilité de ciblage spécifique par le biais d'inhibiteurs de MEK (mitogen-activated protein kinase) pour contrer les mutations de *KRAS* et *NRAS* et du vemurafenib pour contrer les mutations de *BRAF* (le vemurafenib étant un inhibiteur de l'enzyme produite par le gène).

La voie Nf-kB était quant à elle retrouvée mutée dans 17%, ces mutations étant distribuées sur 27 gènes incluant *TRAF3*, *CYCLD* et *LTB*.

Des mutations dans les gènes de réponse aux dommages à l'ADN (*ATM*, *ATR*, *TP53*, *ZNFHX4*) sont apparues également fréquentes (18% en tout), associées à un mauvais pronostic, sans possibilité de ciblage spécifique décrite. A l'inverse, si les mutations du gène de la cycline D1 ont été associées avec un mauvais pronostic, elles apparaissent potentiellement contournables par l'utilisation de pablociclib, un inhibiteur des CDK4 et 6.

D'autres gènes ont encore été retrouvés mutés, impliqués dans l'oncogénèse - tels que *RB1* - ou impliqués dans la réponse aux drogues - tels que *IRF4* - avec des impacts divers sur le pronostic des patients.

De façon générale, l'identification des mutations et de leurs valeurs pronostiques pourrait constituer une nouvelle grille de classification des MM et favoriserait l'émergence de thérapies personnalisées.

3 - La méthylation de l'ADN, anomalie secondaire

a - Méthylation de l'ADN et cancers

La méthylation des CpG (Cytosine-phosphate Guanine) est mode de régulation génétique usuel dans les cellules eucaryotes. Cette méthylation est assurée par les DNA-Methyl-Transferases (DNMT) par ajout aux cytosines d'un groupement méthyl au niveau du carbone 5 (Edwards et al., 2017). Lorsqu'elle a lieu au niveau du promoteur de gènes, elle conduit à une répression de la transcription. Répression directe, par inhibition de la fixation de l'ARN-polymérase. Mais aussi indirecte par le recrutement de protéines reconnaissant une séquence méthylée. Ces protéines, les Methyl-CpG-binding Domain (ou protéines MDB) peuvent participer à la répression en empêchant la fixation d'ARN-polymérase ou de facteurs de transcription, mais les MDB sont également capables de recruter d'autres protéines responsables d'une compaction de la chromatine, en particulier des histones désacétylases. Cette répression est favorisée lorsque les CpG sont regroupés en îlots CpG, caractérisés par une forte densité de CpG dans l'ADN (Jin and Robertson, 2013; Klutstein et al., 2016).

Les 5-méthylcytosines sont des cibles très sensibles aux mutations. En effet, elles peuvent subir une déamination spontanée ce qui conduit au remplacement par une thymine. Chez l'homme, le taux de mutation est de 10 à 50 fois supérieur pour les 5-méthylcytosines que pour les autres bases de l'ADN. Ceci explique pourquoi les dinucléotides CpG sont sous-représentés dans le génome humain (Panchini et al 2016). Les régions où ils persistent sont de ce fait des régions de régulation, chaque cellule ayant un patron de méthylation qui détermine quels gènes sont inhibés.

La régulation par méthylation est un processus dynamique. Tandis que la DNMT1 assure le maintien de la méthylation par méthylation des CpG du brin néo-synthétisé après réplication de l'ADN, les DNMT3A et DNMT3B sont responsables de méthylation *de novo*, permettant la répression de nouveaux gènes (Edwards et al., 2017; Okano et al., 1999; Pradhan et al., 1999).

Comme beaucoup de processus cellulaires, la méthylation est impactée par le développement de cancer. Ainsi les gènes oncosuppresseurs peuvent se retrouver anormalement méthylés tandis que les oncogènes peuvent se retrouver anormalement déméthylés. En outre, les anomalies de la méthylation sont associées à des anomalies de compaction de la chromatine qui modifient l'expression de groupes de gènes (Klutstein et al., 2016).

b - Utilisation d'agents déméthylants

Ces processus pathologiques ont conduit aux développements de plusieurs inhibiteurs de la méthylation. Parmi ceux-ci, la décitabine (ou 5-aza-2'-deoxycytidine) agit comme un analogue de la cytidine et est intégrée à l'ADN comme une cytosine. Son intégration à l'ADN ne va pas empêcher la reconnaissance des « CpG » ou la cytosine est remplacée par la décitabine par les DNMT. Néanmoins, la DNMT se retrouve liée de façon covalente à l'ADN et est ainsi « piégée », puis éliminée par la cellule. La décitabine provoque donc une déplétion du stock de DNMT et, cycle après cycle, l'ADN se retrouve donc de moins en moins méthylé (Christman, 2002).

La décitabine est autorisée dans le traitement de divers cancers, dont la leucémie aigüe myéloïde et le syndrome myélodysplasique (Borthakur et al., 2008; Malik and Cashen,

2014) tandis qu'un autre analogue de la cytosine, l'azacitidine (ou 5-azacytidine, différant de la décitabine par sa capacité à être intégrée à l'ARN) est autorisée dans le traitement du syndrome myélodysplasique (Raj and Mufti, 2006).

c - Anomalies de la méthylation dans le MM

Plusieurs études (Benetatos et al., 2008; Galm et al., 2004; Hatzimichael et al., 2012), utilisant en particulier la méthode de PCR méthylation-spécifique ont permis de mettre en évidence que le myélome était régulièrement associé à la méthylation du promoteur d'un certain nombre de gènes, méthylation associée à leur répression. De fait, le traitement à la décitabine a été associé à une augmentation du niveau de transcrit d'un grand nombre de gènes onco-suppresseurs dans des lignées de myélome multiple (Heller et al., 2008) et est utilisée pour induire un arrêt du cycle, de l'apoptose dans les cellules de MM.

Plus précisément, la méthylation de plusieurs gènes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie (comme *TGFBI* – Transforming Growth Factor Beta 1), interaction avec le microenvironnement tumoral (*SPARC* - Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich), ou encore la réponse à un stress oxydatif (*GPX3* – Glutathione Peroxidase 3) est associée à un pronostic défavorable, indépendamment des autres anomalies primaires et secondaires (Kaiser et al., 2013).

Une étude réalisée à l'aide de puces à méthylation a examiné la méthylation plus de 27 000 CpG répartis sur l'ensemble de génome, de façon à analyser la méthylation globale de l'ADN des cellules lymphocytaires et plasmocytaires saines ainsi que celle des cellules de MM (Walker et al., 2011). Cette analyse a mis en évidence que le passage du stade du lymphocyte B au plasmocyte se traduit principalement par une diminution de la méthylation globale de l'ADN. Cette méthylation globale reste stable lors du passage au stade MGUS, mais le passage du stade MGUS se fait par une déméthylation massive et globale de l'ADN usuellement associée à une instabilité génomique (Eden et al., 2003; Gaudet et al., 2003).

En dépit de cette déméthylation, 77 gènes ont été identifiés pour subir une méthylation durant cette transition.

A l'inverse, le passage aux stades PCL puis HMCL se traduit par une hyperméthylation globale massive de l'ADN. Néanmoins, toutes les anomalies primaires ne sont pas égales vis à vis de ces modifications de la méthylation globale, et l'hyperméthylation est particulièrement marquée dans les lignées t(4;14). Les gènes concernés incluent *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *PAX1* (Paired Box 1), *SOSC2* (Supressor Of Cytokin Signaling 2) et *CDKN2* (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2).

L'équipe de Bernard Klein et de Jérôme Moreaux à Montpellier a identifié 47 gènes impliqués dans divers processus (inhibition de la prolifération, apoptose...) dont le taux de méthylation était proportionnel à l'apoptose induite en utilisant de la décitabine (Moreaux et al., 2012) comme de l'azacytidine (Moreaux et al., 2014). En outre, la méthylation de ces 47 gènes est associée à un mauvais pronostic, caractérisé en particulier par une durée de vie moindre des patients.

II - p53, au cœur de la cancérologie et du myélome multiple

Le bras court du chromosome 17, touché par la délétion 17p, porte le locus du gène de *TP53*. Celui-ci, situé plus précisément en position 17p13.1 est constitué de 11 exons, le premier n'étant pas codant, pour une taille totale de 5,8 kb. Le gène *TP53* code pour p53, une dont l'isoforme majoritairement décrite est longue de 393 acides aminés (pour une taille de 53 kDa).

A - Structure

Le gène *TP53* est évolutivement très conservé, et la structure de la protéine l'est également. On peut la diviser en 5 domaines fonctionnels, comme indiqué en **Figure 3** (Toledo and Wahl, 2006).

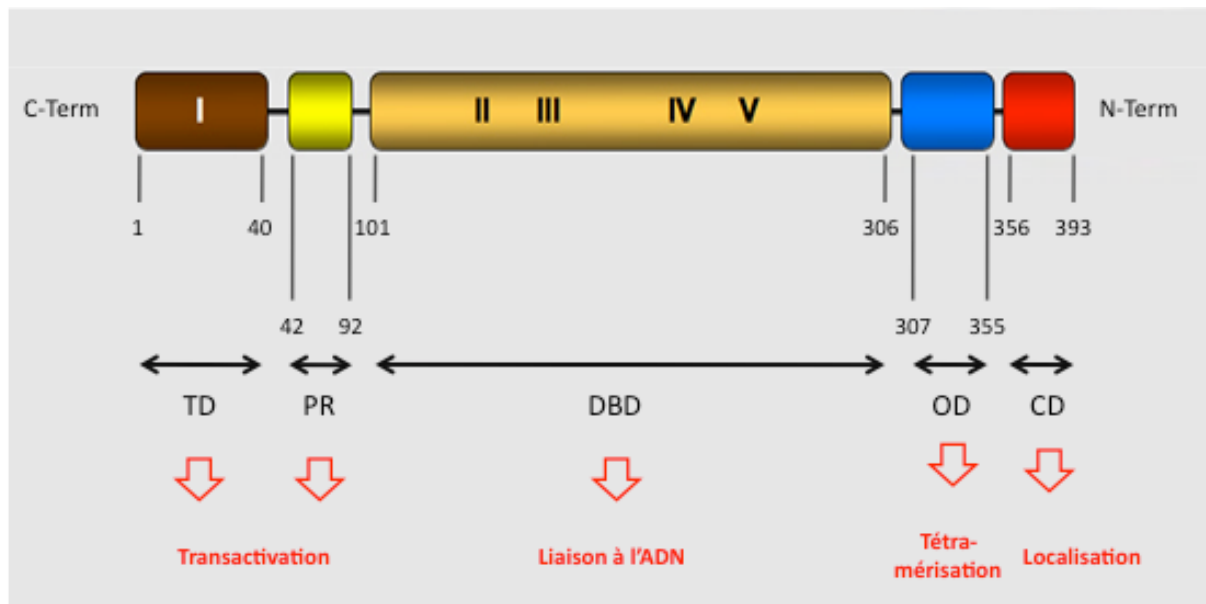


Figure 3 : structure de p53 (repris depuis <http://p53.free.fr/>).

Le premier domaine, en position N-Terminale, est un domaine de transactivation (ou Transactivation Domain I) et s'étend des acides aminés 1 à 40. Il contient les sites d'interactions avec de nombreuses protéines, telles que l'ubiquitine ligase MDM2 (Mouse Double Minute 2), des acétylases ou encore des protéines partenaires de transcription.

Allant vers l'extrémité C-terminale, on trouve ensuite un domaine riche en prolines contenant un second domaine de transactivation (nommé PR ou TDII) lui permettant également d'interagir avec différents partenaires protéiques, dont la protéine p300, impliquée dans l'acétylation de p53. Ce second domaine s'étend sur une cinquantaine d'acides aminés, des acides aminés 42 à 92.

La région centrale, définie des acides aminés 101 à 306 est le domaine de liaison à l'ADN (ou DNA-Binding Domain – DBD). Il s'agit d'un domaine tout particulièrement conservé au cours de l'évolution qui, comme son nom l'indique, est responsable de la reconnaissance et de la fixation à l'ADN (Joerger and Fersht, 2010).

Poursuivant sur environ 50 acides aminés (307 à 355), se retrouve un domaine constitué d'un feuillet bêta suivi par une hélice alpha. Ce domaine est le domaine d'oligomérisation/de tétramérisation (OD pour Oligomerisation Domain). Comme son nom l'indique, il permet l'association de la protéine en dimères, puis en dimères de dimères. En outre, ce domaine contient une séquence permettant l'export de la protéine au niveau du noyau. On parle du Nuclear Export Signal ou NES.

Enfin, la protéine est terminée par un domaine carboxy-terminal, allant des acides aminés 356 à 393. Cet ultime domaine contient 3 signaux de localisation nucléaire (ou Nuclear signal Localisation – NLS) ainsi qu'un domaine de liaison non spécifique à l'ADN, qui permet la liaison de p53 à l'ADN, indépendamment de ses sites de liaison. Enfin, ce dernier domaine est également responsable de l'import de p53 vers le noyau et de la régulation négative de son activité transcriptionnelle.

B - Régulation

1 - P53 est finement régulé par (dé)ubiquitylation

Dans les cellules saines, le niveau basal de p53 est faible, du fait d'une dégradation par le protéasome orchestrée par son interaction avec différents partenaires, dont JNK ou des ubiquitine-ligases telles que MULE (Mcl-1 Ubiquitin-Ligase E3), COP1 (Coat Protein 1), PIRH2 (p53-induced Ring H2) ou encore, l'une des plus décrites, MDM2 (Sane and Rezvani, 2017). L'expression de la plupart de ces ubiquitine-ligases est induite par l'activité transcriptionnelle de p53, formant ainsi une boucle de répression qui maintient p53 à un faible niveau (Toledo and Wahl, 2006).

MDM2 est généralement décrite comme la principale ubiquitine ligase de p53. Elle se lie au domaine de transactivation de p53 et peut catalyser la fixation d'ubiquitines sur les résidus lysines 370, 372, 373, 381, 382, et 386 de p53. Cette ubiquitylation est un processus graduel. En effet, une mono-ubiquitylation permet une exclusion de p53 hors du noyau cellulaire. Une mono-ubiquitylation conduit à une exclusion de p53 du noyau et une polyubiquitylation conduit à une dégradation par le protéasome.

L'exclusion nucléaire après mono-ubiquitylation permet à p53 de remplir des fonctions pro-apoptotiques et pro-autophagie et n'est pas irréversible. Car si des enzymes sont capables d'ubiquityler p53, d'autres sont capables de la déubiquityler. Ces deubiquitinases catalysent l'élimination des ubiquitines fixées aux résidus lysines et plusieurs ont déjà été décrites pour p53 telles que USP7 (Ubiquitin-Specific-processing Protease 7, aussi nommée HAUSP, pour Herpes-Virus Associated Ubiquitin-Specific Protease), et USP10. A noter que la régulation des ubiquitines-ligases est, pour certaines, également dépendante d'une dégradation protéasomique dépendante de leur ubiquitylation, ce qui fait de la régulation de p53 un processus complexe, dépendant de balances de niveaux entre un grand nombre d'acteurs (Lavin and Gueven, 2006).

2 - Des modifications post-traductionnelles au secours de p53

En parallèle de ses phosphorylations, p53 est susceptible de subir des acétylations, en particulier par des histones acétyl transférases, par ailleurs responsables de l'acétylation des histones. Ces acétylations sont indispensables à l'activation de p53 et, parmi les protéines responsables de ces acétylations, citons PCAF (p300/CBP Associated Factor), hMOF (human Males absent On the First), TIP60 (Tat interacting protein 60) et, une des plus décrites, p300/CBP (p-300/Creb Binding Protein). Sous l'action de signaux de stress, ces acétylases vont induire une acétylation au niveau de certains résidus lysines, incluant les lysines 305, 372. Certains de ces résidus – en particulier les lysines 372, 373, 381 et 382 - sont également impliqués dans la répression par ubiquitylation de la protéine (**figure 4**).

Il y a compétition entre les deux processus, la conséquence étant que l'acétylation de p53 induit sa stabilisation et son activation (Lee and Gu, 2010). Cette acétylation est réversible par des Histones Désacétylases, telles que HDAC1 ou SIRT1 (Juan et al., 2000; Vaziri et al., 2001).

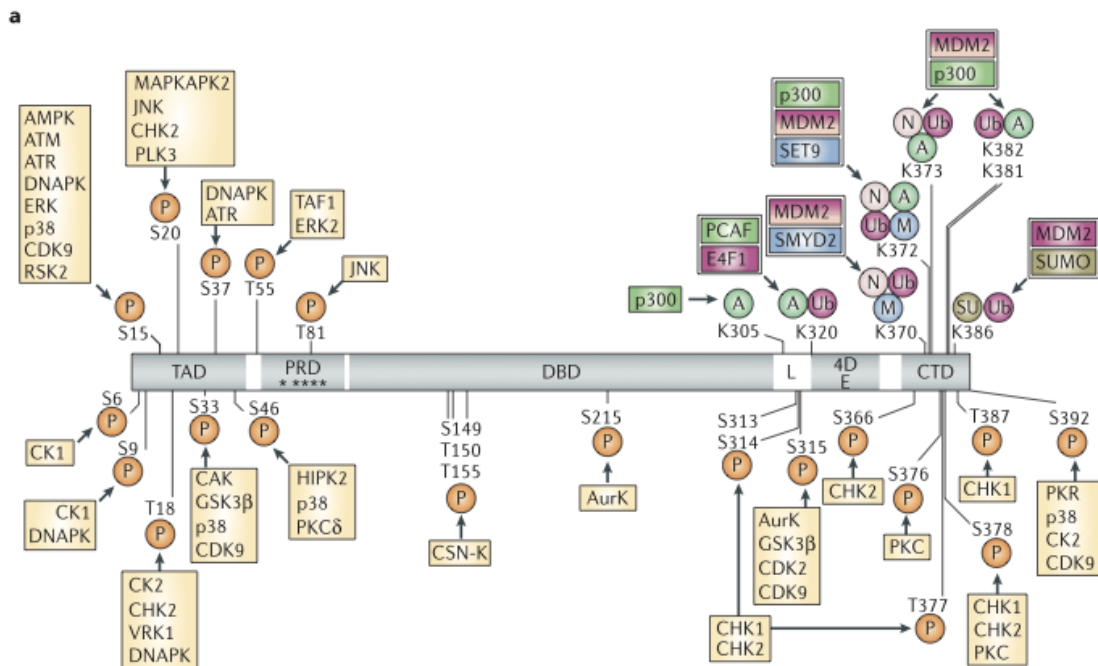


Figure 4 : sites de régulations post-traductionnelles de p53 (Repris depuis Toledo and Wahl, 2006).

C - P53, micro-processeur cellulaire

La protéine p53 est souvent considérée comme le « gardien du génome ». En effet, des stress génotoxiques (fruits d'erreurs enzymatiques, d'agents génotoxiques, d'UV....) sont capables d'induire une stabilisation de p53 préalable à son activité. Cette conception mésestime néanmoins le rôle de p53. En effet, p53 est capable d'être activée par un très grand nombre de stress incluant l'hypoxie, des stress mécaniques, l'activation de certains oncogènes, des chocs thermiques, un stress oxydatif ou une forte prolifération cellulaire.

Ces stress vont conduire à l'activation de certaines protéines telles que ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) qui vont inhiber l'interaction entre p53 et ses ubiquitines ligases.

Diverses modifications post-traductionnelles vont conduire à son accumulation, en particulier nucléaire ainsi qu'à son activation. Les différents types de stress vont induire différentes modifications post traductionnelles, de façon spécifique, le tout conduisant à une activité spécifique de la protéine p53 (Beckerman and Prives, 2010; Horn and Vousden, 2007).

1 - P53, facteur de transcription

Par le biais de son domaine d'oligomérisation, p53 va former des dimères. Ces dimères vont à leur tour se dimériser et le tétramère ainsi formé va se fixer sur l'ADN au niveau des éléments de réponse à p53 (P53RE – pour p53 Response Element), séquences de l'ADN reconnues par la protéine. Sur l'ADN, p53 va interagir avec divers partenaires pour former des complexes d'initiation de la transcription dont la nature va changer en fonction du type de stress, conduisant à une réponse transcriptionnelle spécifique à chaque stress. Ainsi, p53 va induire la transcription de gènes responsables de la réparation de l'ADN - comme *BRCA1* (Breast Cancer 1) ou *MGMT* (O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase); de l'arrêt du cycle cellulaire comme *CDKN1A*, *14-3-3 α* ou encore *GADD45a* (Growth Arrest DNA-Damage inducible), de l'apoptose comme *PUMA* (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), *NOXA*, *BAX* (Bcl-2 Associated X), *TNFRSF10B* (TNF Receptor Superfamily 10B), *APAF-1* (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), *DIABLO* (diablo IAP-binding mitochondrial protein) (**Figure 5**).

En parallèle de cette induction transcriptionnelle, la protéine p53 est capable de réprimer l'expression de certains gènes, en particulier des anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (Wu et al., 2001), que la survivine (Nakano et al., 2005) et d'autres gènes (Wang et al., 2010) et ce bien que la possibilité d'une inhibition indirecte soit sujette à débat (Fischer et al., 2014).

Cette activité anti-proliférative et pro-apoptotique en réponse aux stress, en particulier génotoxiques est au cœur d'une fonction anti-tumorale de p53, ce qui en fait une cible de choix des stratégies thérapeutiques utilisées en cancérologie.

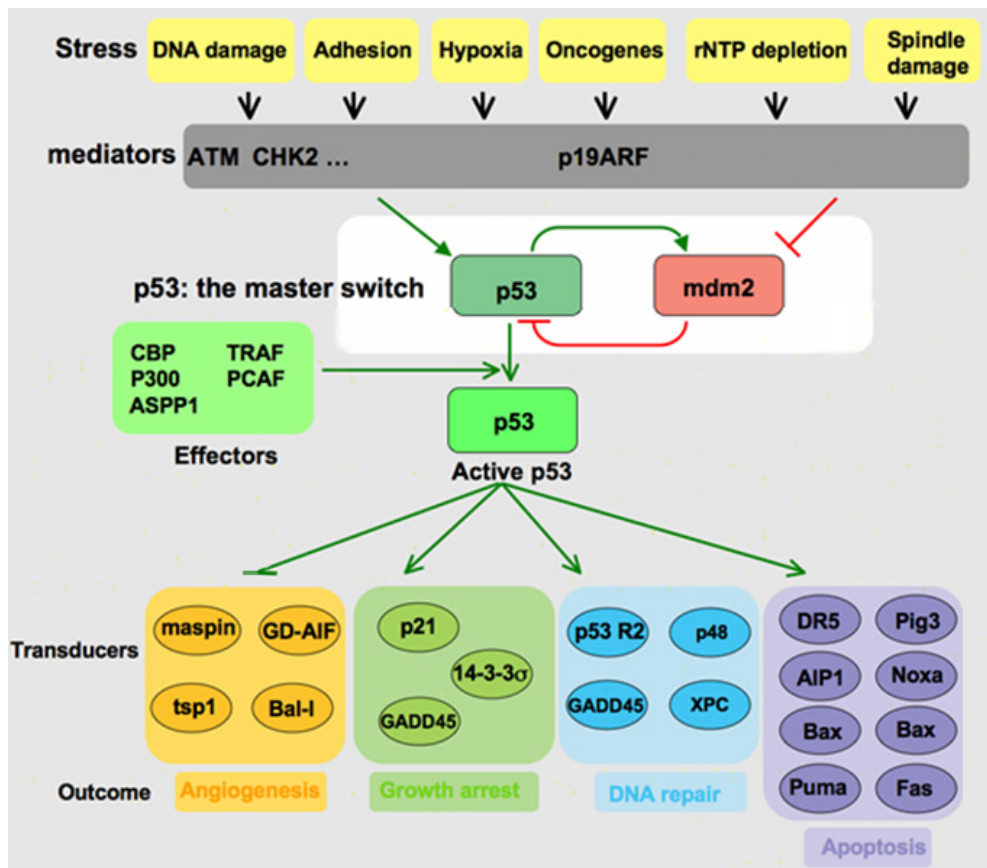


Figure 5 : p53, facteur de transcription intégrateur des stress cellulaires. En jaune, les cibles favorisant l'angiogénèse, en vert, les cibles favorisant l'arrêt du cycle cellulaire, en bleu, les cibles induisant des réparations de l'ADN et en violet, les cibles pro-apoptotiques (repris depuis <http://p53.free.fr/>).

2 - P53, acteur cytoplasmique

L'activité de p53 ne se limite pas à celle d'un facteur de transcription. En effet, sous l'effet de stress, une partie des protéines p53 présentes dans le cytoplasme va être transloquée à la mitochondrie, aidée pour cela d'une protéine de la famille de MDM2 dépourvue d'activité ubiquitine-ligase, Mdm4 (aussi nommée MdmX). Comme dit précédemment, le maintien de p53 dans le cytoplasme va être favorisé par des mono-ubiquitylations qui faciliteraient la translocation mitochondriale (Marchenko et al., 2007). La translocation de p53 à la mitochondrie va lui permettre d'interagir, via son domaine de liaison à l'ADN, avec les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), qu'il va séquestrer, libérant ainsi les protéines pro-apoptotiques (Mancini et al., 2009; Moll et al., 2005).

D - Anomalies de p53 et cancers

Par essence, la cellule tumorale va non seulement être soumise à différents stress, mais aussi les accumuler : instabilité génomique, hypoxie, prolifération anarchique... Toutefois, dans la cellule tumorale, les processus apoptotiques sont au moins partiellement réprimés. Cette contradiction se cristallise autour de la voie de p53, intégrateur des stress et décideuse du destin cellulaire ; voie qui doit nécessairement être contournée ou réprimée par la cellule. En effet, du fait de son rôle antiprolifératif, pro-apoptotique, p53 et sa voie de signalisation sont réprimés. La répression des voies de p53 peut être directe et toucher la protéine/le gène ou indirecte et concerner ses partenaires.

1 - Délétion du bras du chromosome 17

La délétion du bras court du chromosome 17 est un événement retrouvé principalement dans les tumeurs hématologiques. Elle est systématiquement associée à un mauvais pronostic et est associée ou non à une mutation de l'allèle restant.

2 - Mutations de *TP53*

On estime que le gène *TP53* lui-même est muté dans 50 % des cancers en moyenne. Néanmoins, ce taux de mutation varie de 10 % dans certains types de tumeurs hématologiques à 96 % pour certains cancers ovariens. En dépit de cette disparité, beaucoup de ces mutations sont des mutations faux-sens, ayant pour beaucoup la conséquence de stabiliser de façon anormale la protéine, le caractère oncogénique résidant dans une moindre activité transcriptionnelle vis à vis de ses cibles pro-apoptotiques ou anti-prolifératives. La majorité des mutations de *TP53* se retrouve au niveau du site de liaison à l'ADN. Ces mutations vont empêcher la protéine de se fixer à son élément de réponse et, agissant par tétramère, une protéine mutée va empêcher l'ensemble du tétramère de jouer son rôle de facteur de transcription. Ces mutations transforment donc la forme mutée en dominant-négatif. Cela conduit à une diminution drastique de l'activité transcriptionnelle de p53 tout en empêchant p53 d'agir au niveau cytoplasmique, l'interaction avec les protéines anti-apoptotiques (Bax, Bcl2...) étant également dépendante de son DBD (Muller and Vousden, 2013).

3 - Hyperméthylation du promoteur du gène

Le gène peut être également réprimé directement par méthylation d'un îlot CpG présent dans son promoteur. Cette répression par méthylation a en particulier été retrouvée dans des gliomes et des glioblastomes et est associée à un mauvais pronostic, mais celui-ci est réversible grâce à l'utilisation d'agents déméthylants (Amatya et al., 2005).

E - p53 dans le myélome multiple

Dans le myélome multiple, les mutations de *TP53* ne sont retrouvées que lorsqu'il y a délétion du bras court du chromosome 17, correspondant à une perte du second allèle. Ces délétions évoluent depuis 10-20 % au diagnostic vers une incidence supérieure à 70 % au stade PCL (Albarracin and Fonseca, 2011). Les mutations sont quand à elles présentes chez 30 à 50 % des patients del(17p)+ au diagnostic (Lodé et al., 2010) et leur prévalence ne cesse d'augmenter (Boyd et al., 2011). L'incidence des mutations sur le pronostic semble prouver qu'elles ont un impact négatif en réduisant l'espérance de vie des patients.

Dans le cas d'une absence de mutation de l'allèle restant, des études semblent suggérer que l'îlot 36 CpG présent dans le promoteur du gène *TP53* serait potentiellement méthylé dans une partie des MM (Hurt et al., 2006; Teoh et al., 2014).

Outre ces répressions directes, la voie de p53 est également touchée par des répressions indirectes incluant des pertes de fonctions d'ATM et de p14^{ARF}, des gains de fonctions/augmentations de MDM2, Myc et Ras (**figure 6**), mais ces anomalies ne sont que peu présentes dans le MM (Tessoulin et al., 2017).

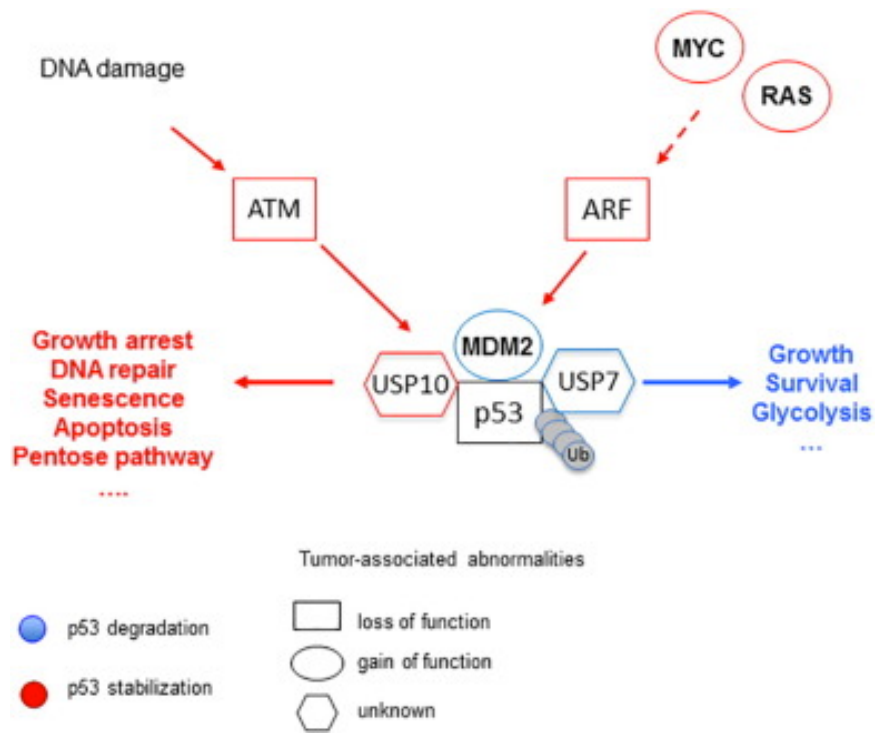


Figure 6 : dérégulations cancéreuses de p53 (Tessoulin et al., 2017).

III - Le gène *TP73* et la protéine p73

A - *TP53*, une affaire de famille

Le gène *TP53* appartient à une famille qui inclut également deux autres gènes *TP63* et *TP73*, ainsi nommés en raison de la taille apparente en kDa des protéines produites par ces gènes, respectivement p63 et p73. Les gènes *TP63* et *TP73* sont également très conservés et sont situés respectivement au niveau des locus 3q27-28 et 1p36.

Chez la souris, si le knockout homozygote de *TP53* conduit à une mort de près d'un quart des femelles par exencéphalie et une très forte incidence de tumeurs diverses, celui de *TP63* conduit à des défauts de développement des membres, de la face et du crâne et des épithelia, conduisant à l'absence de peau.

Le Knock-out homozygote de *TP73*, contrairement à celui de *TP53*, ne provoque pas le développement anormalement fréquent de tumeurs mais à diverses anomalies incluant des hydrocéphalies, des problèmes de développement du système nerveux central ou encore des problèmes d'infections chroniques. Chez l'Homme, aucune mutation somatique, ni de *TP63*, ni de *TP73* n'a pu être reliée à la survenue de cancers.

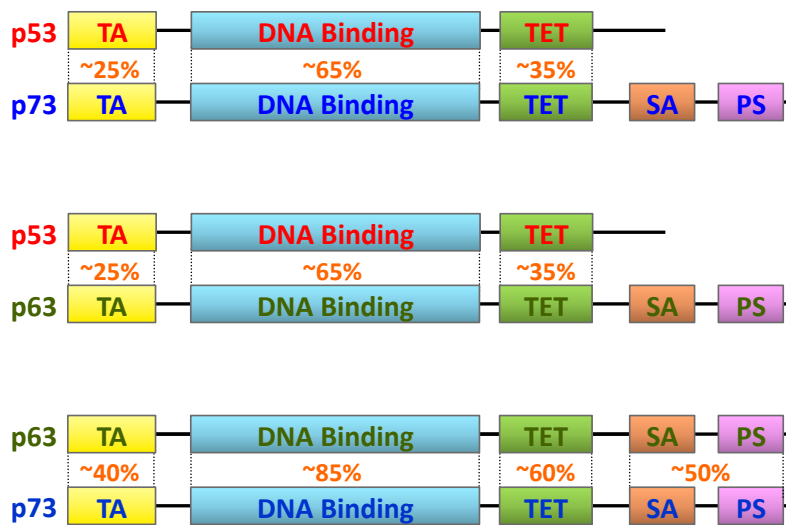


Figure 7 : Homologie entre les gènes de la famille de *TP53* (Repris depuis Courtois et al., 2004).

B - Structure de *TP73* et de *p73*

p63 et p73 présentent une forte homologie de structure et possèdent les trois domaines de transactivation, de liaison à l'ADN et domaine d'oligomérisation.

Ces domaines possèdent des rôles similaires à ceux observés dans la protéine p53, le domaine de transactivation permettant – entre autres – l'interaction avec des protéines partenaires, le domaine de liaison à l'ADN permettant la reconnaissance et la fixation à des séquences spécifiques à la protéine une fois celle-ci rassemblée en dimères de dimères par le biais de son domaine d'oligomérisation (Zawacka-Pankau et al., 2010).

Néanmoins, si les gènes présentent une forte homologie, p63 et p73 sont plus longues que p53. Cela est en particulier dû à la présence en extrémité C-terminale d'un domaine « SAM » ou Sterile Alpha Motif. Selon les auteurs, ce domaine inclut ou est parfois divisé en position C-Terminale d'un « Transcription Inhibitory Domain » (TID).

Le domaine SAM est principalement défini par sa composition - une séquence de 5 hélices alpha – et une fonction décrite est l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p73 (Liu and Chen, 2005; Wang et al., 2001). Ce type de domaine est connu pour être impliqué dans l'interaction protéine-protéine.

C - Le niveau de transcrit de *TP73* est également sous régulation protéique

La transcription de *TP73* va être induite par divers facteurs de transcription parmi lesquels E2F1. Cette protéine est activée par phosphorylation, en particulier par la kinase chk1 (checkpoint kinase 1) ou chk2. Cette phosphorylation va lui permettre de se stabiliser et d'induire la transcription de *TP73*. L'activité de ces kinases est elle-même favorisée par leur phosphorylation par la protéine ATM, par ailleurs capable de stabiliser p53 par phosphorylation. L'implication de cette protéine permet une induction de la transcription de *TP73* sous l'effet de stress génotoxiques (Conforti et al., 2012a).

D - Régulations et modifications post-traductionnelles

Tout comme p53, la protéine p73 est maintenue à un faible niveau dans les cellules saines. Si les mécanismes conduisant à la régulation de son niveau sont moins connus que ceux concernant p53, certains sont connus.

Ainsi, MDM2 est capable de se fixer au TD de p73 et provoquer l'ubiquitinylation de plusieurs lysines (lysines 11, 29 et 63). Néanmoins, si cette ubiquitinylation inhibe l'action de p73, elle ne permet pas à elle seule à la dégradation de la protéine par le protéasome, mais semble au contraire conduire à une stabilisation de la protéine, en association avec MdmX (Wu and Leng, 2015).

L'ubiquitine ligase MDM2 est en revanche nécessaire à la collaboration avec une autre E3-Ligase, Itch (Itchy homolog) qui a montré en modèle de cellules HeLa co-transfectées (par p73 et Itch) sa capacité à induire la dégradation protéasome-dépendante de p73 (Kubo et al., 2010a; Rossi et al., 2005). Outre cette E3 ligase, p73 voit son niveau régulé par l'E3-Ligase Pirh2 de façon dépendante du protéasome également (Wu et al., 2011).

De même que pour p53, diverses modifications post-traductionnelles vont être capables de stabiliser la protéine p73. L'une des plus décrites est la phosphorylation de la tyrosine 99 par c-Abl (Abelson Tyrosine Kinase), une kinase elle-même sous la dépendance d'ATM, renforçant l'activation de p73 sous l'effet de stress génotoxiques. La kinase c-abl va également phosphoryler la protéine Yes-Associated Protein 1 (YAP1) qui va non seulement co-activer p73, mais encore en moduler l'activité transcriptionnelle (Strano et al., 2005) **(figure 8)**.

Autre partenaire important, p300 qui va induire, de même que pour p53, l'acétylation de p73. Cette acétylation nécessite l'activité de kinase de c-Abl (Costanzo et al., 2002) qui va phosphoryler la tyrosine 99 de p73 et permettre l'acétylation de ses lysines.

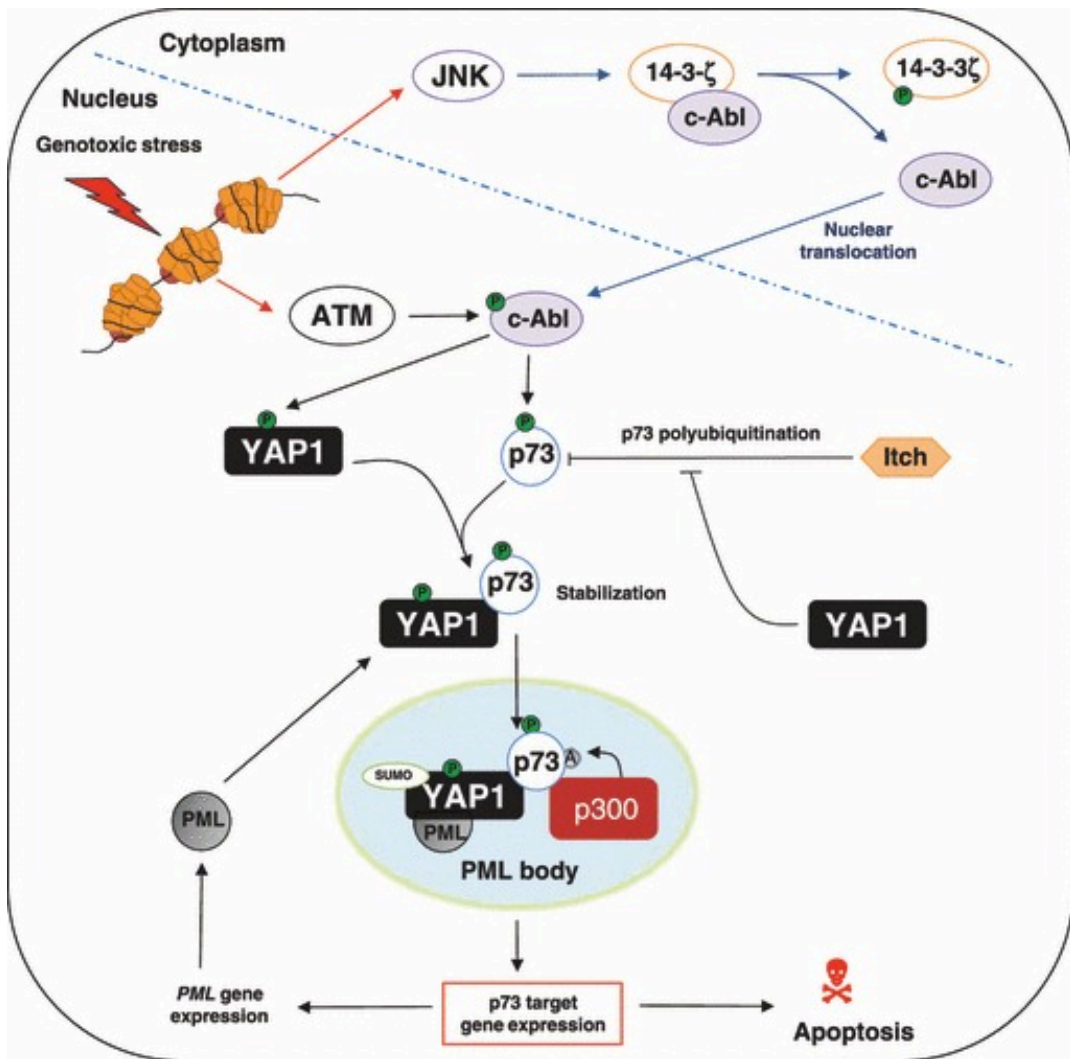


Figure 8 : p73 au cœur de régulations protéiques. (Bitomsky and Hofmann, 2009).

E - p73, facteur de transcription

Lorsque stabilisée, localisée dans le noyau, activée et tétramérisée, p73 va pouvoir induire la transcription de différents gènes sur un modèle similaire à celui de p53. Une partie de ces gènes est commun à p53, incluant en particulier des gènes pro-apoptotiques (*PUMA*, *NOXA*, *BAX*) ou de répression du cycle cellulaire (*CDKN1A*, *14-3-3α*). Ces activités de facteur de transcription conduisent à une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose.

F - Isoformes de p73

Jusqu'ici, lorsque la nomenclature « p73 » a été utilisée, il était question de la protéine de 636 acides aminés, possédant tous les domaines préalablement décrits. Néanmoins, tout comme p53, p73 possède un certain nombre d'isoformes (**Figure 9**). Celles-ci proviennent d'épissages alternatifs en extrémité C-Terminale, les isoformes alpha étant dotées de tous les domaines. Contrairement aux isoformes beta, lambda, delta et gamma, amputées d'une part variable de l'extrémité C-terminale de la protéine (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Mais la variabilité des isoformes de p73 provient également de variants au niveau N-terminal. En effet, des épissages alternatifs conduisent à l'obtention de diverses isoformes manquant de leur exon 2 (ex2p73) et parfois des exons 2 et 3 (Ex2/3p73). Par ailleurs, en plus du promoteur extrinsèque commandant l'expression des formes TAp73 possédant le domaine de transactivation complet en extrémité N-Terminale, le gène *TP73* présente un second promoteur, intrinsèque celui-ci, situé entre les exons 2 et 3. La transcription induite par ce promoteur va donc conduire à l'obtention de formes tronquées en extrémité N-Terminale, qui commenceront à partir d'un exon « 3' ». Ces formes sont dépourvues du domaine de transactivation. Il s'agit des isoformes DeltaNp73 ou DNp73.

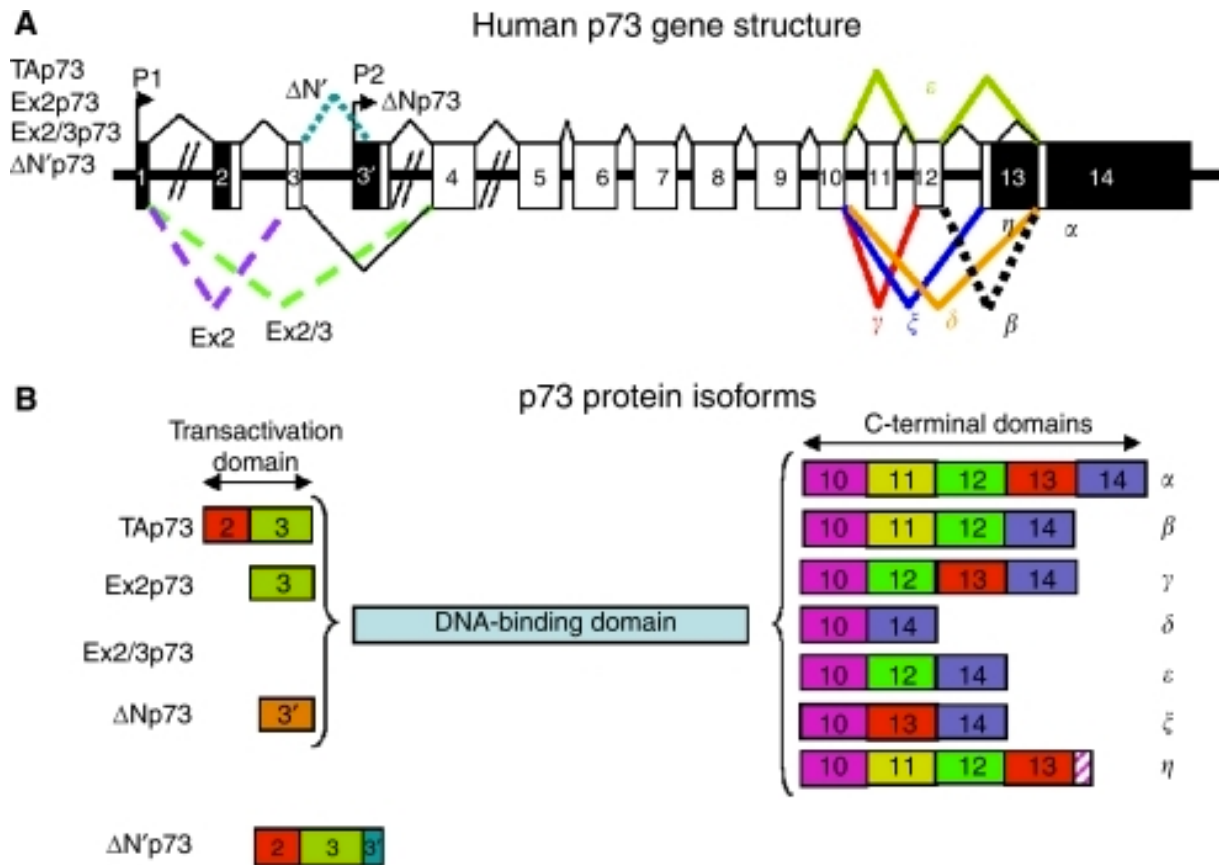


Figure 9 : Différentes isoformes de p73 (Bourdon, 2007).

Ces isoformes DNp73 ne possédant pas de domaine de transactivation, elles ne sont pas capables d'induire la transcription des gènes normalement transcrits par p73 (entendons par là TAp73). Elles conservent néanmoins la capacité de former des hétérotétramères TAp73/DNp73. Les protéines DNp73 agissent donc en dominants négatifs inhibiteurs de la transcription p73-dépendante. Il est à noter que le Knock-out différentiel des isoformes de p73 chez la souris conduit à des résultats opposés ; les souris déficientes en TAp73 étant d'avantage susceptibles de développer des cancers divers (Rufini et al., 2011).

Il a été démontré que, par fixation au promoteur intrinsèque P2 de DNp73, p53 comme p73 était capable d'en induire la transcription, entraînant un rétrocontrôle négatif de p73.

G - P73 dans les cancers

Du fait de la répression fréquente de p53 dans les cancers, le recours aux voies de p73 est une piste d'intérêt majeur dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques contournant les défauts de la voie de p53.

Si le gène *TP73* n'est que rarement muté dans les cancers, l'activité pro-apoptotique de p73 est tout de même la cible de répression. Cette répression s'appuie sur plusieurs mécanismes.

En premier lieu, le second promoteur P2, intrinsèque et présidant à l'expression des formes DNp73 présente également un îlot CpG. Celui-ci tend à être anormalement déméthylé dans les cancers, provoquant une expression anormalement haute des formes DNp73 (Gomez et al., 2017). Celles-ci vont être susceptibles d'agir en tant que dominants négatifs pour former des hétérodimères avec les formes TAp73 et ainsi inhiber l'induction de la transcription de gènes pro-apoptotiques et antiprolifératifs.

En second lieu, le gène peut subir une délétion dans le cadre d'une délétion du bras court du chromosome 1. C'est en particulier le cas dans les lymphomes non-Hodgkiniens (Stoffel et al., 2004).

Par ailleurs, le promoteur P1 (extrinsèque) des formes TAp73 inclut plusieurs îlots CpG, dont un comprenant plus de 300 CpG. Cet îlot est retrouvé anormalement méthylé dans divers cancers. Parmi ceux-ci, citons des cancers solides comme les cancers gastriques associés au virus Epstein-Barr ou encore certains cancers cervicaux (Jha et al., 2012; Lomas et al., 2004; Ushiku et al., 2007).

Mais cette répression par hyperméthylation a particulièrement été étudiée – et retrouvée – dans des tumeurs hématologiques telles que la leucémie aigüe myéloïde et les lymphomes non-Hodgkiniens (Garcia-Manero et al., 2002; Martínez-Baños et al., 2017; Zhao et al., 2013).

De façon plus indirecte, MDM2 étant capable de se lier aux isoformes TAp73 et d'en inhiber l'activité, une surexpression de cette ubiquitine ligase peut également réprimer l'activité transcriptionnelle de p73 et certaines formes mutées de p53 sont capables de se lier à TAp73 et d'inhiber son activité transcriptionnelle. (Stindt et al., 2015).

Comme dans la plupart des cancers, p73 est bien moins étudiée que p53 dans le myélome multiple. Néanmoins, *TP73* pourrait constituer une cible thérapeutique car la délétion du bras court du chromosome 1, où est localisé *TP73*, est un critère de mauvais pronostic. La méthylation du promoteur P1 de *TP73* est soumise à controverse, celui-ci étant parfois retrouvé méthylé (Galm et al., 2004), parfois retrouvé au contraire déméthylé (Chim et al., 2004).

H - Projet de thèse : étude de la répression et du déverrouillage de *TP73*

Les anomalies de *TP53* sont irréversibles dans le MM car elles sont des délétions chromosomiques et des mutations somatiques. En raison de leur gravité, elles constituent un axe de recherche crucial. Depuis une dizaine d'années, des stratégies de réactivation de la protéine p53 mutante ont été développées afin de redonner une conformation active aux protéines porteuses d'un seul acide aminé anormal. En effet, quelques acides aminés sont considérés comme des « points chauds » qui concentrent une part importante des mutations « miss-sens » ; substitution d'un seul acide aminé. Ces mutations, qui concernent en particulier des Arginines (dans plus de 20% des cas), sont décrites pour induire une instabilité de la conformation de la protéine dans des conditions physiologiques, rendant impossible la liaison à l'ADN. Néanmoins, cette instabilité ne serait pas irréversible, les protéines mutées étant pour certaines capables de se lier à l'ADN à faible température (Selivanova and Wiman, 2007).

Malgré l'engouement pour certaines molécules qualifiées de réactivatrices de p53 mutée (RITA et PRIMA-1Met), les données du laboratoire ont démontré l'absence de spécificité de ces molécules vis-à-vis de p53 (Surget et al., 2014a; Tessoulin et al., 2014). Par ailleurs, une étude a identifié p73 comme cible potentielle de la molécule PRIMA-1 (Saha et al., 2013). Plus précisément, une autre étude plus récente (Teoh et al., 2016) suggère que cette induction de la protéine pourrait correspondre à une levée de la méthylation du promoteur de *TP73*, méthylation qui était observée dans une lignée *TP53^{KO}* et associée à une répression (partielle) de l'expression protéique.

Ces données appuyent l'idée de cibler p73 comme alternative aux anomalies de TP53. . Au travers de ce projet de thèse, nous avons donc étudié la régulation de l'expression de la protéine p73, en particulier par méthylation de son promoteur. Et nous avons confronté ces données relatives à la régulation de p73 au statut du gène *TP53* des lignées qui nous ont servi de modèle.

Pour réaliser cette étude, nous avons procédé suivant trois axes :

- 1 - L'étude de la méthylation du promoteur du gène *TP73***
- 2 - L'étude de l'inhibition de la méthylation couplée à l'expression génique**
- 3 - L'étude de la régulation de l'expression de la protéine**

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - Lignées cellulaires

Les lignées BCN, MDN, NAN8, NAN9, NAN11, XG5, XG6 et XG11 ont été établies au laboratoire à partir d'échantillons de patients atteints de MM en phase terminale de la maladie (Maïga et al., 2015; Moreaux et al., 2011). Elles sont cultivées en milieu RPMI-1640 supplémenté de 4 % de sérum de veau fœtal et de 3 ng/mL d'interleukine-6. Les autres lignées de MM ont été obtenues auprès de DSMZ (Allemagne), elles sont cultivées sans ajout d'IL6. Le **tableau I** regroupe leurs caractéristiques d'intérêt.

Lignée	Statut <i>TP53</i>	Translocation
NAN9	Wt/Wt	t(4,14)
BCN	Wt/Wt	t(14,16)
XG6	Wt/Wt	t(14,16)
AMO1	Wt/Wt	t(12,14)
MM1S	Wt/Wt	t(14,16)
MDN	Wt/Wt	t(11,14)
KMS11	KO	t(4,14)
NAN8	KO	t(4,14)
JJN3	KO	t(14,16)
LP1	del/mE286K	t(4,14)
OPM2	del/mR175H	t(4,14)
L363	del/tron	t(20,22)
JIM3	del/mR273S	t(4,14)
XG5	del/mR282W	t(11,14)
KMS12PE	del/mR337L	t(11,14)
XG11	del/mC135Y	t(11,14)

Tableau I : caractéristiques des lignées de myélome multiple utilisées.

II - Traitement des cellules par des drogues

Tous les traitements ont été réalisés sur des cellules diluées à 100 000 cellules par millilitre 24 h avant traitement de façon à ce qu'elles soient en phase de croissance. Après les traitements, les cellules ont été lavées avec du PBS puis les culots secs ont été stockés à -80 °C pendant au moins trois heures avant l'extraction d'ADN, d'ARN ou de protéines.

III - Traitement des cellules avec un agent déméthylant

Les cellules à la concentration de 10^5 cellules/mL ont été traitées avec du 5-Aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich, A3656-5MG). Le traitement a été effectué à différentes doses et sur différentes durées qui seront précisées à chaque fois. Le nombre des cellules utilisées a varié en fonction de la destination des culots secs (extraction d'ADN, d'ARN, de protéines...).

IV - Traitements avec des agents alkylants

Les lignées ont été traitées à une dose correspondant à leur DL50 (Dose Létale 50) déterminée par cytométrie en flux (Cytocell, SFR Bonamy, Nantes) à 48 h après marquage des cellules par l'anticorps anti-Apo2.7-PE, marqueur de l'apoptose (Surget et al., 2014b).

La DL50 des lignées au cisplatine a été déterminée selon le même mode opératoire (500 000 cellules/mL, gamme de doses du cisplatine, 48 h).

300 000 cellules/mL des lignées JIM3, KMS12PE et XG5 ont été traitées pendant 72 h avec 5 μ M de décitabine avant d'être traitées pendant 16 h avec du Melphalan ou du Cisplatine à la concentration de DL50 pendant 48 h.

Les DL50 ainsi obtenues sont regroupées dans le **tableau II**.

Utilisant ces DL50, les lignées NAN11, MM1S, MDN et JN3 ont été traitées durant 16 h avec cisplatine ou melphalan, à la concentration cellulaire de 300 000 cellules/mL.

Les cellules lignées JIM3, KMS12PE et XG5 (100 000 cellules/mL) ont été traitées pendant 72 h avec 5 μ M de décitabine avant d'être à nouveau diluées à concentration de 300 000 cellules/mL et traitées pendant 16 h avec du melphalan ou du cisplatine à la concentration de leur DL50.

lignée	DL50 Cisplatine (en μ M)	DL50 Melphalan (en μ M)
NAN11	6	4
MM1S	15	7
MDN	0,9	2
JN3	19	30
JIM3	45	55
XG5	7	30
KMS12PE	45	80

Tableau II : DL50 des lignées pour le cisplatine et le melphalan obtenues en 48 h.

V - Traitement avec le MG132, un inhibiteur du protéasome et la nutlin-3a, antagoniste de MDM2

Les cellules, ont été traitées pendant 6 h avec 1 μ M de MG132 (Calbiochem) après avoir été diluée à la concentration de 500 000 cellules/mL.

La nutlin-3a a été utilisée pour traiter pendant 24 h les cellules à la concentration de 500 000 cellules/mL.

VI - Extraction ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de culots secs de 3 millions de cellules en utilisant le Kit « NucleosSpin Tissue » de Macherey-Nagel. L'ADN génomique a été dosé en utilisant un appareil Nanodrop One.

VII - Conversion au bisulfite de Sodium

L'ADN a été converti à l'aide du kit « Bisulfite Conversion Kit » d'Active Motif. Conformément aux recommandations du fournisseur, 2 µg d'ADN ont été convertis.

VIII - PCR

Les PCR sur ADN converti au bisulfite ont été réalisées en utilisant deux enzymes selon les réactions : les GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase de Promega et Platinum d'Invitrogen selon les protocoles proposés par les fournisseurs.

Les valeurs des températures d'hybridation ont été calculées pour chaque PCR à l'aide des logiciels de calculs proposés sur les sites des fournisseurs des enzymes. Après conversion au bisulfite, l'ADN est très enrichi en Uracile. Les PCR réalisées à partir de cet ADN utilisent donc d'avantage de Thymine et d'Adénosine. Aussi, la concentration de ces deux nucléotides a été doublée dans les mix des PCR réalisées sur ADN converti, par rapport aux recommandations des fournisseurs des enzymes.

IX - PCR Methylation-Specifiques (MS-PCR)

Pour tester la spécificité des amplifications vis à vis de la méthylation, nous avons utilisé des ADN témoins commerciaux (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen), chimiquement totalement méthyles ou totalement déméthylés puis convertis. Ils sont notés respectivement « M » et « U » dans la liste des échantillons.

X - MS-PCR nichées

Dans le cadre des PCR Méthylation-spécifique et des pyroséquençages, des PCR « nichées » ont été réalisées. Une première PCR Large (ou L) est réalisée. Les produits de cette première PCR sont purifiés à l'aide du Kit de Macherey-Nagel, « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » et élués dans le même volume que le mélange initial. Cette purification permet entre autres l'élimination des amorces de la première PCR afin qu'elles ne soient pas utilisées lors des PCR nichées. 2 μ L d'ADN issus de cette première PCR sont utilisés comme matrice pour la PCR nichée. Les amorces des MS-PCR nichées sont **rassemblées dans le tableau III.**

PCR	Taille de l'amplicon	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Tm de l'amorce
Met	109 pb	Met-For	GGGGT <i>TATTA</i> TGGG TAGAGGA <i>TATC</i>	62 °C
		Met-Rev	ACATACTAAAC <i>GAATTCCGAACG</i> ACTC	66 °C
UnMet	112 pb	UnMet-For	GGGTTA <i>TTA</i> TGGG TAGAGGA <i>TATT</i>	60 °C
		UnMet-Rev	ACATACTAAAC <i>AAATTCCAAACA</i> ACTCTC	62 °C
L	874 pb	L-For	G <i>TTTT</i> TGGGTT <i>TTGGG</i> GAG <i>TTG</i> GAGAG	65 °C
		L-Rev	ACCACCCACTTCTCCTATAAAAACC	65 °C
Q	285 pb	Q-For	TAAA TAGTGGGTGAG <i>TTATGA</i> AGATGT	60 °C
		Q-Rev	TACACCAAACCCTAACTAAAAAACC	62 °C

Tableau III : liste des amorces de MS-PCR et de MS-PCR nichées. La température d'hybridation (ou Tm) des amorces a été obtenue à l'aide du calculateur de Tm de Sigma-Aldrich. Dans les amorces « sens » ou « For », les C hors CpG convertis en T et, dans les amorces « antisens » ou « Rev », les A complémentaires aux T ainsi obtenus sont en italique. En gras figurent les C/T des CpG (amorces For) ou leur complémentaire (G/A).

Toutes ces PCR ont été réalisées à l'aide de l'enzyme GoTaq Flexi de Promega dans les conditions décrites dans le **tableau IV**.

PCR	MS-PCR directes		MS-PCR Nichées	
	Nombre de cycles	Température d'hybridation	Nombre de cycles	Température d'hybridation
L			25	58 °C
Met	40	60 °C	17	56 °C
UnMet	40	58 °C	20	56 °C
Q			19	54 °C

Tableau IV : conditions des MS-PCR.

XI- PCR Pré-pyroséquençage

Afin de réaliser les réactions de pyroséquençage, des PCR d'amplification pré-pyroséquençage ont été réalisées en utilisant les amorces et les conditions rassemblées dans le **tableau V**. Ces amplifications ont été réalisées à l'aide de l'enzyme Platinum d'Invitrogen.

PCR	Taille de l'amplicon	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Tm de l'amorce	Tm de la PCR
L1	839 pb	L1-For	<i>GTGGTT TTATAGGAGAAGTGGGT</i>	61 °C	52 °C
		L1-Rev	<i>AACCCAAATACCTACCCAAC</i>	59 °C	
Q1a	297 pb	Q1a-For	<i>GGGTGG TAAG TTTTG TTTGG</i>	61 °C	53 °C
		Q1a-Rev	<i>AAACCAAATCTCCTCCC</i>	58 °C	
Q1b	484 pb	Q1b-For	<i>GGGAGGAGATTTTGGTTT</i>	58 °C	53 °C
		Q1b-Rev	<i>ACCCTAACCTCCTACCTACAAC</i>	60 °C	
L2	523 pb	L2-For	<i>GTTGTAGG TAGGAGG TTTAGGGT</i>	60 °C	55 °C
		L2-Rev	<i>CCAAATCCTTCTCCTATCC</i>	61 °C	
Q2	450 pb	Q2-For	<i>GTTGGGTAGGTATTTGGGTT</i>	59 °C	52 °C
		Q2-Rev	<i>CTAACTCCTCAAAAAAACTAAAACC</i>	60 °C	

Tableau V : Récapitulatif des amorces d'amplification pré-pyroséquençage. Les T/A en italique correspondent aux T/A issus de la conversion de cytosines hors CpG.

XII - Pyroséquençage

Deux kits de pyroséquençage ont été utilisés en fonction de la taille de la séquence ciblée : les séquences de 50 paires de bases ou moins ont été analysées à l'aide du kit PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen), les séquences plus longues ont nécessité l'utilisation du kit PyroMark Q24 Advanced Reagents (Qiagen). Les réactions de pyroséquençage ont été réalisées selon les instructions du fabricant à l'aide de l'appareil Pyromark Q24 de Qiagen. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Pyromark Q24 software. Les amorces de pyroséquençage et conditions d'hybridation utilisées figurent dans le **tableau VI**.

PCR	Amorce Biotinylée	Nom de l'amorce de pyroséquençage	Séquence de l'amorce de pyroséquençage	Tm de l'amorce
Q	Q-For	PS1-Rev	CTACTTATAATCTAATACTTATAAAAACC	52 °C
		PS2-Rev	TACACCAAACCCTAACTAAAAAACC	52 °C
Q1a	Q1a-For	Q1aPSM1-Rev	CAAAACC T AAACAAATCC	52 °C
		Q1aPSM2-Rev	CTCC T CCTCTCCA ACTAACC	59 °C
	Q1a-Rev	Q1aPS1-For	GG <i>TTA TATTTTTTTG TTTTTT</i> GGA	58 °C
		Q1aPS2-For	GT <i>TTGGGGGA TAGTAGGGAG</i>	61 °C
Q1b	Q1b-For	Q1bPSM-Rev	AAAAAACAAAAC T AACTACCC	59 °C
		Q1b-Rev	ACCCTAAACCTCCTACCTACAAC	60 °C
	Q1b-Rev	Q1b-For	GGGAGGAGAT <i>TTTTGGTTT</i>	58 °C
		Q1bPSM-For	G <i>TTTATATAA TT</i> A <i>GTTTAGGGG T</i>	53 °C
Q2	Q2-For	Q2PS1-Rev	TCCCCTCACCTCCCAACTT	66 °C
		Q2PS2-Rev	AACAACAAAAAAAACCCTCC	62 °C
		Q2-Rev	CTAACTCCTCAAAAAAACTAAAACC	60 °C
	Q2-Rev	Q2-For	GTTGGGTAGGTATTTGGGTT	59 °C
		Q2PS1-For	AAG <i>TTGGGAGGTGAGGGGA</i>	66 °C
		Q2PS2-For	GGAGGG <i>TTTT TTTTTTGTGT T</i>	62 °C

Tableau VI : Liste des amorces de pyroséquençage. En marron les amorces servant aussi d'amorces d'amplification. En italique les T/A issus de C convertis, en rouge les mismatch : En forward, un A remplace le C/T, en Reverse, un T remplace le G/A.

XIII - Extraction ARN

A partir de culots secs de 3 millions de cellules, les ARN messagers ont été extraits à l'aide du Kit Macherey-Nagel « NucleoSpin RNA Plus ». Les ARNm ainsi obtenus ont été dosés et leur pureté contrôlée à l'aide de l'appareil Nanodrop One.

XIV - Reverse transcription

2 µg d'ARN ont été rétrotranscrits en ADN à l'aide du kit Maxima First Strand ADNc Synthesis (Thermo Scientific). Les ADNc ainsi obtenus ont été dilués à 20 ng/µL. L'efficacité de la réaction a été testée en réalisant une PCR dirigée contre l'ADNc de l'actine.

XV - PCR Quantitative :

Les PCR Quantitatives ont été effectuées en utilisant le kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Appliedbiosystems). Le gène *RPL37a*, codant pour une protéine de la grande sous-unité du ribosome a été utilisé comme gène de ménage (sonde HS01102345_m1). Pour cibler *TP73*, la sonde Hs01056230_m1 a été utilisée. Les Q-PCR ont été réalisées selon le programme présenté dans le **tableau VII**.

Activation initiale		40 cycles	
2 min à 50 °C	10 min à 95 °C	30 s à 95 °C	1 min à 60 °C

Tableau VII : programme de PCR-Quantitative.

L'appareil donne un résultat sous forme de « CT » ou « Cycle Threshold », cycle seuil, correspondant au nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un signal fluorescent supérieur à un certain seuil. Cette valeur est utilisée pour quantifier l'ADNc.

Pour tester la validité de cette amplification, on réalise une gamme de dilutions croissante d'un échantillon d'ADNc d'une lignée, dilutions utilisées pour procéder à l'analyse d'une gamme standard à partir de laquelle l'appareil calcul l'efficacité de la PCR. La lignée MDN en condition contrôle a été choisie car c'est elle qui exprime le plus haut niveau de *TP73*.

Le niveau d'expression relative du gène dans les différents échantillons a été calculé en utilisant l'équation de Pfaffl (Pfaffl, 2001) :

$$\text{ratio} = (E_{\text{cible}})^{\Delta CT_{\text{cible}}(\text{calibrateur}-x)} / ((E_{\text{housekeeping}})^{\Delta CT_{\text{housekeeping}}(\text{calibrateur}-x)})$$

XVI - PCR sur ADNc

Afin de discriminer de façon semi-quantitative les différentes formes d'ARNm de *TP73*, des RT-PCR ont été réalisées. Les PCR et leurs amorces correspondantes sont rassemblées dans le **tableau VIII**. Pour les lignées JIM3, KMS12PE et XG5, 35 cycles ont été réalisés (à partir de 10 ng pour la PCR actine et 40 ng pour les autres PCR). Pour les lignées JIN3, MDN, MM1S, NAN11, 20 cycles de **PCR ont été réalisés**.

PCR	Taille de l'amplicon	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Tm de l'amorce	Tm de la PCR
<i>TP73</i> , Exon2-6	630 pb	Ex2-For	CACCACGTTTGAGCACCTCT	65 °C	65 °C
		Ex6-Rev	AGATTATTGCCTTCCACGCG	66 °C	
<i>TP73</i> , Exon7-10	389 pb	Ex7-For	GACGGAATTCACCACCATCCT	67 °C	65 °C
		Ex10-Rev	CCAGGCTCTCTTTCAGCTTC	63 °C	
<i>DNp73</i> , Exon3'-6	519 pb	Δ Ex3'-For	CCATGCTGTACGTCGGTGAC	60 °C	65 °C
		Ex6-Rev	CCTAATCCTTCTCCCTATCC	61 °C	
Actine	130 pb	CHO15	GGCATCGTGATGGACTCC	64 °C	65 °C
		CHO16	GCTGGAAGGTGGACAGCG	67 °C	

Tableau VIII : liste des PCR discriminantes des formes de *TP73*.

XVII - Extraction et dosage des protéines

Pour procéder à des études protéiques par Western-Blot, des culots secs de 3 millions de cellules ont été lysés à l'aide de 45 µL de tampon de lyse dont la composition figure dans le **tableau IX** ci-dessous. Le tampon a été ajouté au culot, avant vortex réguliers et incubation sur glace pendant 40 minutes avant centrifugation à 4 °C et 10 000 rotations par minute pendant 30 minutes. Enfin, le surnageant contenant les protéines a été récupéré.

TRIS HCL, pH 7,6	10 mM
NaCl	150 mM
tergitol-type NP-40 (Sigma-Aldrich)	0,5%
Péfablox (Sigma-Aldrich)	50 µg/ml
Apoprotine	2 µg/ml
NaVO ₄	2 mM
NaF	1 mM
Leupeptine (Sigma-Aldrich)	1 µg/ml

Tableau IX : composition du tampon de lyse protéique.

Les protéines ont été dosées par l'acide bicinchoninique (Uptima) suivant les instructions du fournisseur (lecture de l'absorbance à 560 nm) en utilisant comme référence une gamme d'Albumine sérique de bœuf.

XVIII - Western-blots

Les Western-blots ont été réalisés à partir de 80 µg de protéines dénaturées thermiquement avant migration sur gel d'acrylamide à 10 % en tampon Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad). Les protéines ont été par la suite transférées à 4 °C à l'aide d'un tampon Tris/Glycine (Bio-Rad) à 20 % d'éthanol sur membrane de nitrocellulose (Merck-Millipore).

Ce transfert a été suivi d'un blocage de la membrane avec du lait à 5 % dans du TBS, Tween à 0,1 % durant une heure. Après le blocage, une incubation avec les anticorps primaires a été réalisée durant la nuit à 4 °C.

Les lavages ont été effectués avec du TBS à 0,1 % de Tween avant incubation pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire. Le **tableau X** ci-dessous liste les anticorps utilisés, leurs dilutions et caractéristiques.

Protéine	Anticorps primaire				Anticorps secondaire	
	Distributeur	Référence	Type	Dilution	Type	Dilution
p73	Bethyl	A300-126A	Polyclonal de lapin	1 µg/ml	Chèvre anti-lapin	200 ng/ml
P53	Oncogene	Ab-6	Monoclonal de souris	10 ng/ml	Chèvre anti-souris	80 ng/ml
MDM2	R&D Systems	AF1244	Polyclonal de lapin	1 µg/ml	Chèvre anti-lapin	400 ng/ml
Actine	Millipore	MAB1501	Monoclonal de souris	1/20000	Chèvre anti-souris	20 ng/ml

Tableau X : caractéristiques des anticorps de Western-Blot utilisés.

Cette incubation é été à nouveau suivie de lavages avec du TBS à 0,1 % de Tween. Les protéines ont été révélées à l'aide du produit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), à l'exception de p73, révélée à l'aide du kit Illuminata Forte Western HRP Substrate (Merck-Millipore). La lecture a été réalisée sur lecteur Bio-Rad Universal Hood III.

XIX - Extinction de p53

Des cellules MM1S ont été transfectées en utilisant la Lipofectamine™ RNAiMAX (Transfection Reagent, ThermoFisher) dans les conditions proposées par le Kit. 10 millions de cellules MM1S ont été transfectées avec le On-Target-plus Control pool Non-targeting pool (Dharmacon, Cat.#D-001810-10-20) en tant que siRNA contrôle et 10 millions ont été transfectées avec le On-Target-plus smart pool human *TP53* (Dharmacon, Cat.# L-003329-00), siRNA dirigé contre *TP53*. Après l'étape de transfection, les cellules ont été incubées pendant 48 h avant traitement avec 2 μ M de Melphalan pendant 16 h.

RESULTATS

I - Expression constitutive de *TP73* dans les lignées de MM

A partir de culots secs de lignées de MM, nous avons étudié l'expression constitutive p73 par western blots et par Q-PCR dans 16 lignées présentant différents statuts *TP53*. Les caractéristiques et statuts *TP53* des lignées (**Tableau X**) ont été définis par séquençage de l'ADNc et confirmés récemment par whole-exon sequencing (Surget et al., 2012; Tessoulin et al., en préparation) .

HMCL	Translocation	<i>TP53</i>	<i>TP73</i>
AMO1	(12;14)	wt	wt
MDN	(11;14)	wt	wt
MM1S	(14;16)	wt	wt
NAN9	(4;14)	wt	wt
NAN11	(14;16)	wt	wt
XG6	(16;22)	wt	wt
XG7	(4;14)	wt	wt
JJN3	(14;16)	deletion	wt
KMS11	(4;14)	deletion	wt
NAN8	(4;14)	deletion	wt
JIM3	(4;14)	R273C	wt
Karpas620	(11;14)	C135Y	wt
KMM1	(6;14)	C135F/S241P	A211S
KMS12PE	(11;14)	R337L	wt
LP1	(4;14)	E286K	wt
L363	(20;22)	S261T (splice)	wt
NAN1	(14;16)	E180*	wt
NAN6	(14;16)	indel	wt
NAN7	(11;14)	indel	wt
OPM2	(4;14)	R175H	wt
SKMM2	(11;14)	K132N	wt
XG11	(11;14)	C135Y	I626V
XG1	(11;14)	Y126N	wt
XG2	unknown	C176Y	wt
XG5	(11;14)	R282W	wt

Tableau X : Caractéristiques des lignées.

Pour trois des six lignées $TP53^{wt}$, NAN11, MDN et MM1S, la protéine p73 est détectable en condition basale, mais le niveau d'expression est néanmoins faible (**figure 10**). La protéine p73 n'a été détectée que pour une seule lignée n'exprimant pas de p53 de façon détectable $TP53^{del}$. Enfin, seule une lignée $TP53^{mut}$ parmi 7, XG11, exprime la protéine p73 de façon détectable et cette expression est très forte. La faible expression constitutive de $TP73$ est ainsi restreinte à quelques lignées et principalement retrouvée dans les lignées $TP53^{wt}$. Quant à XG11, la très forte expression de p73 est probablement liée à la présence d'une mutation (Ile626Val, Tessoulin en préparation).

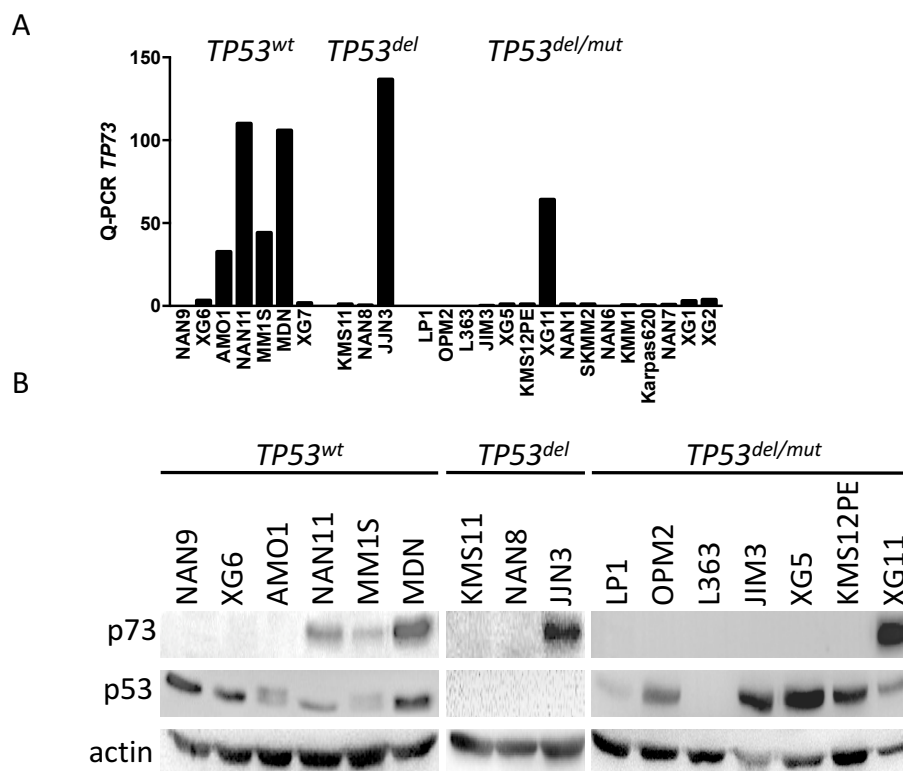


Figure 10 : Expression constitutive de p73 mesurée par western blot (A) et PCR quantitative (B).

Pour la q-PCR, une sonde ciblant toutes les isoformes $TP73$ a été utilisée. Pour les Western-Blot, 80 μ g de protéines ont été déposés systématiquement. A noter qu'afin de ne pas saturer l'appareil, l'exposition de MDM2 a été minorée dans les lignées $TP53^{WT}$, de même que celle de p53 dans les lignées $TP53^{del/mut}$.

II - Méthylation de l'îlot 302 CpG dans le promoteur de *TP73*

A - Position de l'îlot 302 CpG et obtention de la séquence

Afin d'étudier la régulation de *TP73* par la méthylation de son promoteur, nous avons ciblé l'îlot « CpG :302 », répertorié sur le site UCSC (University California Santa Cruz), un îlot de 321 CpG couvrant 3292 pb dans le promoteur du gène. La méthylation de cet îlot CpG est associée à une répression de l'expression du gène (Maas et al., 2013). Par ailleurs, cet îlot situé dans le promoteur des isoformes TAp73 est différent de celui des isoformes Np73 (Pluta et al., 2006). Il contient dans son dernier tiers le premier nucléotide transcrit des formes TAp73. Ces éléments en font un très bon candidat par rapport à d'autres îlots situés dans cette même région comme l'îlot CpG 113. Sa séquence est disponible sur le site UCSC genome browser, (génomme humain de décembre 2013, référence **GRCh38/hg38**), tel qu'indiqué en **figure 11**.

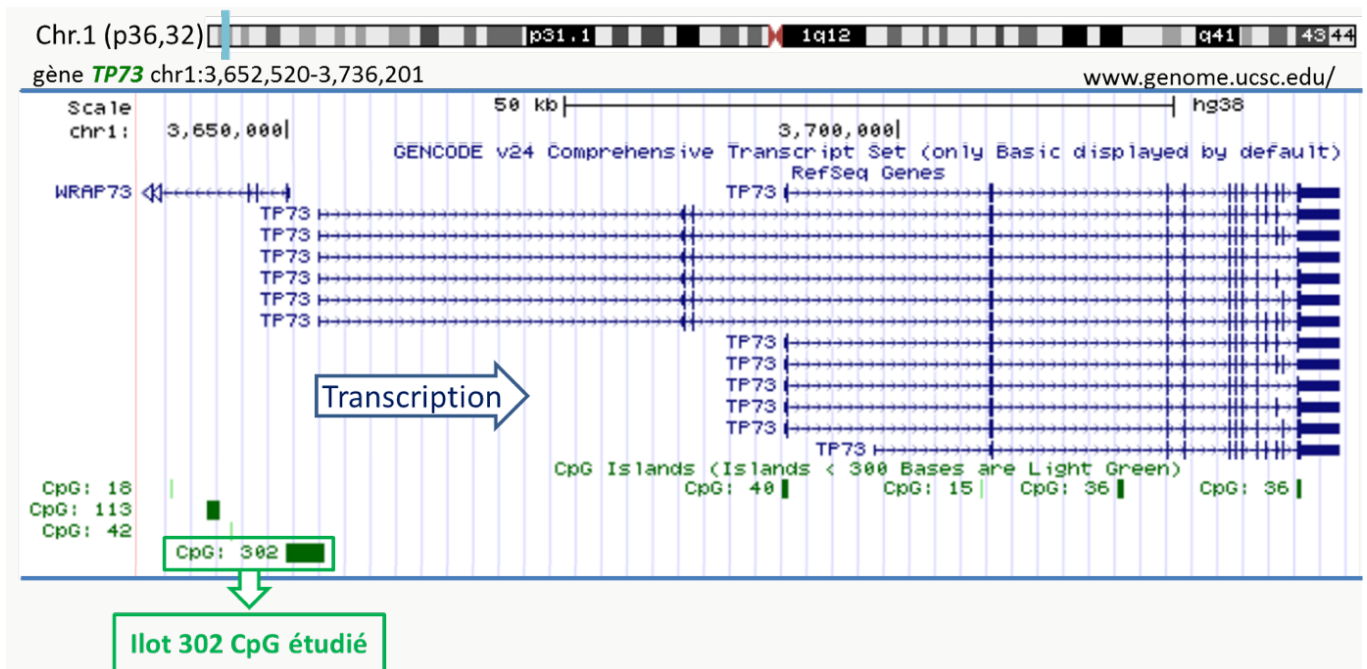


Figure 11 : Séquence de l'îlot « CpG : 302 », site UCSC.

B - La conversion au bisulfite permet le ciblage de la méthylation par PCR

Pour étudier la régulation par méthylation de *TP73*, l'ADN est converti au bisulfite de sodium. Il s'agit d'un traitement chimique qui va convertir les cytosines non méthylées en uraciles. Cette conversion va donc transformer la séquence de façon différente en fonction du statut de méthylation des C, tel qu'illustré en **figure 12**.



Figure 12 : Conversion au bisulfite et modification de la séquence.

Les différences de méthylation étant transformées en différences de séquences, il est donc possible d'étudier la méthylation de l'îlot par des techniques d'analyse de séquence.

Pour étudier la méthylation d'un îlot, une approche consiste à réaliser des PCR qui sont spécifique de l'état de méthylation des régions servant à l'ancrage des amorces de PCR. On parle de PCR Méthylation-Spécifiques (MS-PCR). Nous avons utilisé le logiciel MethPrimer pour rechercher des primers pour MS-PCR spécifique de l'ADN méthylé ou déméthylé.

Pour cela, le logiciel désigne des couples d'amorces couvrant des CpG, ne produisant un amplicon que si les C des CpG en question étaient méthylées et résistantes à la conversion (PCR « Met »); ou des UpG, ne produisant un amplicon que si les C des CpG n'étaient pas méthylées et donc converties (PCR « UnMet »).

Le logiciel nous a proposé un certain nombre de paires d'amorces mais, les essais n'ayant pas permis d'amplification satisfaisante, nous avons désigné par nous-même la majeure partie des amorces présentées ici – à partir de déclinaisons des amorces proposées par le logiciel.

Notre choix s'est porté sur des amorces se terminant en 3' par un C appartenant à un CpG (amorces sens), couvrant si possible d'autres CpG, ainsi que des « C » hors CpG – donc convertis en U. Ces U étaient importants pour s'assurer d'une amplification dépendante de la conversion au bisulfite et de s'affranchir ainsi de l'efficacité de la conversion.

Du fait d'un fort enrichissement en U des séquences cibles, la Tm de ces amorces est usuellement basse et, dans le but de s'assurer d'une bonne sélectivité, nous nous sommes appliqués à utiliser les amorces avec la Tm la plus haute possible. C'est encore plus vrai pour les amorces UnMet ce qui a conduit à les allonger pour augmenter la Tm.

Nous en avons choisi deux au milieu de l'îlot, environ 1300 bases en amont du premier nucléotide transcrit. Ces deux couples d'amorces recouvrent les mêmes CpG. Par ailleurs, afin de n'amplifier que des ADN convertis, une attention particulière a également été apportée à intégrer un maximum de « T » issues de la conversion de « C » hors CpG dans les amorces.

La séquence convertie à l'aide de MethPrimer ainsi que la position des amorces des différentes MS-PCR réalisées sont reportées à la **figure 13**. La séquence des amorces est indiquée dans le **tableau III** du matériel et méthodes.

```

1      CGGGTACCTGCCCGGGCCCCGCACCTGTCCGGGCACCGCACCTGCAGGATCCCCAAGCTG
  ++|||:|:|:|:|++||:|:|++:|:|:|:|++||:|:|++:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
1      CGGGTATTTGTTCCGGGTTTCGTATTTGTTCCGGTATCGTATTTGTAGGATTTTAAAGTTG
  1      2      3      4      5
61     CCTCCACCCACGCGGCCGCCCGGCCCTGCCCGCCGGGGACGCTGGCACCCGAGGATGTC
  :|:|:|:|:|:|++++|:++:|:|:|++:|:|:|:|:|++:++|||++:|:|:|:|:|++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|
61     TTTTTATTTACGCGGTCGTTTTCCGGTTTTGTTCCGTCCGGGACGTTGGTATCGAGGATGTT
  6 7 8 9 10 11 12 13
121    CTGCCCGTGGCCAGGTCCCCGCGCTCACCAGGTACTTGCCCGTCCGGGGAGAACTTGC
  :|:|:|++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
121    TTGTTCCGTGGTTTAGGTTTTTCGTTCGTTTATTAGGTATTTGTCGTTCCGGGAGAAATTTGTA
  14 15 16 17 18
181    GAGTAAGCTGGAGAGCTTGAATACCTCGGAGAAGTTCATGGCCCGCCCTGCCGCGGGCG
  |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++
181    GAGTAAGTTGGAGAGTTTGAATATTTCCGGAAGTTTATGGTTCGTTCGTTTGTTCGCGGGCG
  19 20 21 22 23 24
241    CCACCCTGCGCCGAAAACCCGCGGGACCCCTGGGCGCGCAGCAGGCTGCAACAGCCGAC
  :|:|:|:|++:++|||:|:|++++||:|:|:|:|+++:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++|+
241    TTATTTTGCCTTCGAAAATTCGCGGGATTTTTGGGCGCGTAGTAGGTTGTAATAGTCGAC
  25 26 27 28 29 30 31
301    GCCGCGCTCCGAGGCCGGAAGTCAGAAGGCCGAAGTGAAGTGCAGCCTATCAGCGCCGCC
  ++:++||:|:|++||:|:|++|||:|:|++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++:++:++
301    GTCGGTTTTTCGAGGTCGGAAGTTAGAAGGCCGAAGTGAATTGTAGTTTATTAGCGTTCGTC
  32 33 34 35 36 37 38
361    GGCTTCCGCGCGGCATTGTGGGGCTTGTAGTTCTTGTGCCGCAGGGCTTTAAAGGAAACG
  +|:|:|:|+++++||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++
361    GGTTTTTCCGCGCGGTATTGTGGGGTTTGTAGTTTTTGTGTCGTTAGGGTTTAAAGGAAACG
  39 40 41 42 43 44
421    CCCACGTTTCTTCCGACCAGGGATTTCCGACCAGGAACTTACCTCAAAGGCCGGGAGG
  :|:|++||:|:|:|++||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
421    TTTACGTTTTTTTTCGATTAGGGATTTTCGATTTCGAGAATTTTATTTTAAAGGTCGGGAGG
  45 46 47 48 49
481    CCTTTGAGCACCTCCAGCTAGGGCTGCTGATAAAAATGTAGAAAGCACAGTAAAATTTGA
  :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
481    TTTTTGAGTATTTTAGTTAGGGTGTGATAAAAATGTAGAAAGTATAGTAAAATTTGA

541    ATTTACAGATTACACAACAAATCTAGTTATAAGTATGTTCCCAAATATTGCACGGGACATGC
  |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
541    ATTTTAGATTTATAATAAATTTAGTTATAAGTATGTTTTTAAATATTGTACGGGATATGT
  50
601    TAATACGGAAAAATTACTCGCTAGTCTGAAATTCAAATTTAATTGAGCGACCTGTGTGTC
  |||++|||:|:|++:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:
601    TAATACGGAAAAATTATTCGTTAGTTTGAATTTAAATTTAATTGAGCGATTGTGTGTT
  51 52 53
661    TCGGTGTGTGTACACATGCATATATATATATTTATATTTATATGTAAATGTATGTTTACA
  |++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
661    TCGGTGTGTGTATATATGTATATATATATATTTATATTTATATGTAAATGTATGTTTATA
  54
721    TGTAATATATGTTTACCTACAAATATATCTTTAATAAGTAATACGGTGTCTGTCGCACA
  |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
721    TGTAATATATGTTTATTTATAAATATATTTTTAATAAGTAATACGGTGTGTTGTCGTATA
  55 56

```

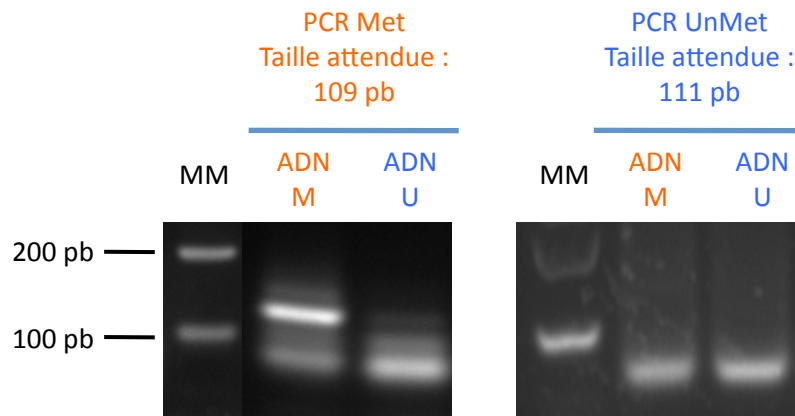



Figure 14 : Test des MS-PCR directes sur des ADN témoins commerciaux méthylés (ADN M) ou déméthylés (ADN U) puis convertis. Les deux PCR ont été réalisées sur 20 ng d'ADN en 40 cycles.

La PCR Met a fourni un amplicon à la taille attendue uniquement pour l'ADN Met. En revanche, en dépit de la multiplication des tentatives (modifications des températures d'hybridation, changement de l'enzyme, variation des amorces testées...), il a été impossible d'obtenir un amplicon spécifique de la PCR UnMet. Il a donc été nécessaire de procéder par PCR nichées.

D - MS-PCR nichées

1 - Mises au point sur ADN témoins et lignée XG5

Après conversion au bisulfite une première PCR est réalisée en utilisant des amorces amplifiant sans distinction ADN méthyle et non méthylé (ne couvrant donc pas de CpG). Le produit de cette première PCR, que l'on appellera par la suite PCR L, est purifié et sert de matrice aux MS-PCR nichées.

Trois PCR nichées sont réalisées : une PCR Met, une PCR UnMet et une PCR de quantification ou PCR Q. Les amorces de cette dernière PCR ne couvrent pas de CpG et l'efficacité de la PCR Q ne dépend donc pas du statut de méthylation de l'ADN. Cette PCR permet de s'assurer que les variations d'intensité qui sont observées dans les PCR Met et UnMet entre les différents échantillons ne sont pas liées à une différence de quantité d'ADN amplifiée par la première PCR. Ce processus est illustré en **figure 15**.

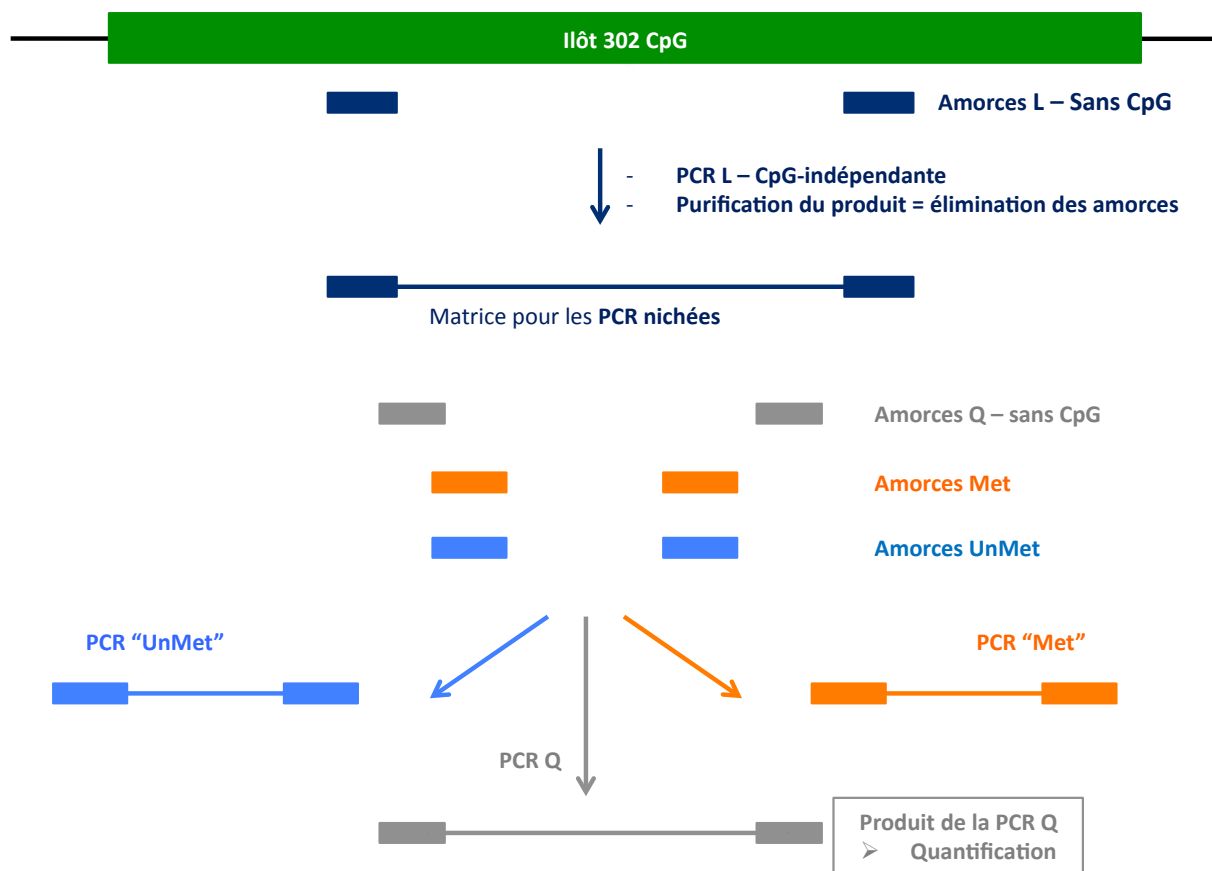


Figure 15 : Stratégie d'amplification par MS-PCR nichées.

Les amorces des quatre PCR sont positionnées dans la **figure 13** et leurs séquences sont indiquées dans le **tableau III** du matériels et méthodes. Les PCR nichées ont ainsi été réalisées suivant les spécifications présentées dans le **tableau IV**.

Nous avons commencé par tester cette méthode sur les ADN témoins commerciaux, puis sur une première lignée, XG5. Les résultats obtenus sont en **figure 16**.

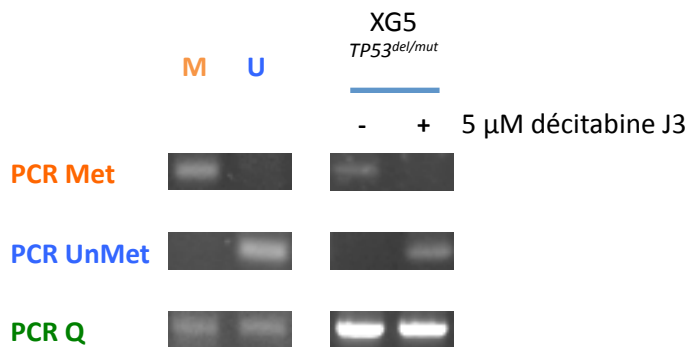


Figure 16 : test des PCR nichées sur ADN commerciaux et ADN XG5. Analyse de la méthylation par MS-PCR nichées dans les lignées. La PCR L a été réalisée en 25 cycles sur 60 ng d'ADN converti pour les lignées et 20 ng pour les témoins commerciaux. La PCR Met a été réalisée en 17 cycles, la PCR UnMet a été réalisée en 20 cycles et la PCR Q en 19 cycles.

Contrairement aux PCR directes, les PCR M, U nichées permettent de produire un amplicon spécifiquement dans les témoins M et U. La PCR Q fonctionne quant à elle de façon similaire pour les deux témoins commerciaux (**figure 16**, partie gauche).

Les résultats obtenus avec la lignée XG5 (**figure 16**, partie droite) semblent indiquer une méthylation du promoteur en condition contrôle (obtention d'un amplicon par la PCR Met uniquement) et une déméthylation consécutive au traitement à 5 μM de décitabine pendant trois jours (disparition de l'amplicon UnMet obtenu et obtention d'un amplicon UnMet). L'amplicon de quantification est quant à lui comparable dans la condition contrôle et dans la condition traitée.

Afin de nous assurer de la spécificité des amplicons, nous avons procédé au séquençage selon la méthode de Sanger d'incorporation de nucléotides di-desoxy. Les amplicons ont été séquençés en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour l'amplification. Les résultats obtenus sont sous forme de chromatogramme et sont présentés en **figure 17**.

Séquence non-convertie G C C C C A T A A G C A T T A G A C C A T A A G C A G C G C C G C C A C T G A G A G T C G C T C G G A A C T C G C C C A
 Séquence méthylée convertie G T T T T A T A A G T A T T A G A T T A T A A G T A G C G T C G T T A T T G A G A G T C G T T C G G A A T T C G T T T A
 (obtenue)

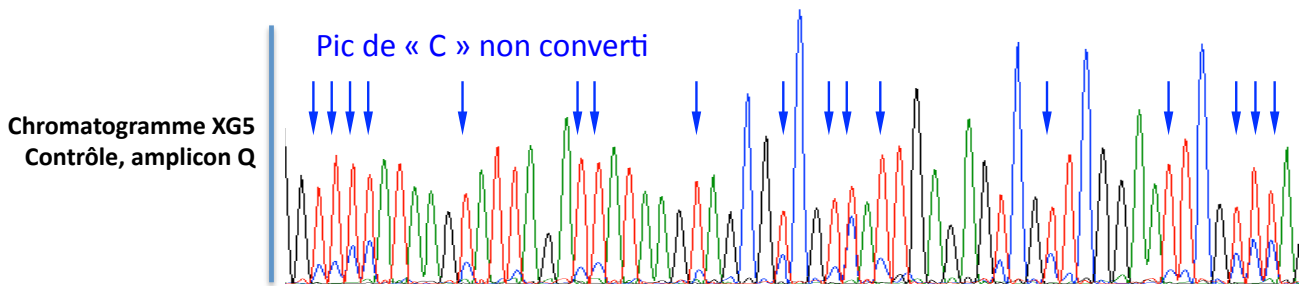


Figure 17 : Spécificité de la séquence amplifiée et efficacité de la conversion au bisulfite.
 « Contrôle » signifie ici qu'il s'agit de la lignée non traitée.

Des pics de cytosines rémanentes, en dehors des CpG ont été obtenus dans le cadre de ces séquençages, témoignant d'une conversion au bisulfite imparfaite. Aussi avons-nous cherché à améliorer l'efficacité de cette conversion car la fiabilité des techniques d'études de la méthylation de l'ADN basées sur la conversion au bisulfite dépend de l'efficacité de ladite conversion au bisulfite. En effet, une conversion imparfaite des cytosines non méthylées rend difficile de distinguer si la cytosine restante d'un CpG correspond à une méthylation ou à un artefact.

2 - Amélioration de la conversion au bisulfite.

Nous avons tenté d'améliorer l'efficacité de la conversion au bisulfite. Les étapes principales de la conversion au bisulfite sont représentées en **figure 18**.

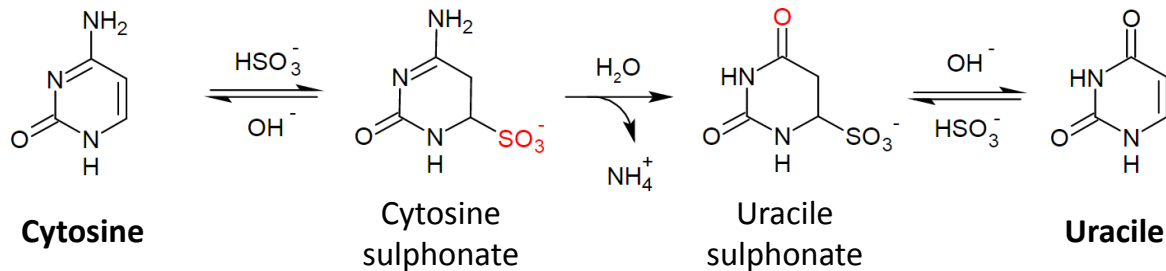


Figure 18 : la conversion au bisulfite et ses principales étapes.

L'étape de sulfonation (transformation de la cytosine en cytosine sulphonate) est critique et parfois peu efficace. En marge du premier protocole – conforme aux instructions du fabricant – un second a été utilisé (Izzi et al., 2014). (Tableau XI).

Mode de conversion 1		Mode de conversion 2	
20 s à 95 °C		10 s à 95 °C	
6 x	10 s à 95 °C	16 x	30 s à 95 °C
	20 min à 58 °C		60 min à 50 °C

Tableau XI : différents cycles de température utilisés pendant la sulfonation.

2 μg des mêmes ADN de lignées ont été convertis en utilisant les deux protocoles. Après conversion, des PCR ont été réalisées (le nombre de cycle a été augmenté pour les MS-PCR pour permettre, le cas échéant, un séquençage).

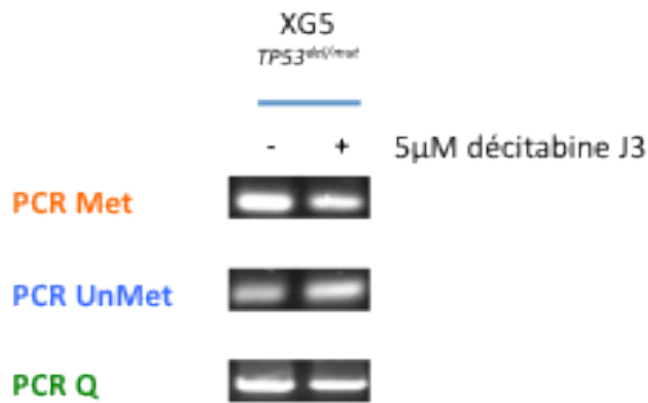


Figure 19 : Amplification pré-séquençage sur ADN XG5. La PCR L a été réalisée en 25 cycles sur 60 ng d'ADN converti, la PCR Met en 19 cycles, la PCR UnMet en 22 cycles et la PCR Q en 19 cycles.

A partir de ces amplifications, les produits de la PCR Q ont été séquencés. Les résultats obtenus sous forme de chromatogrammes (**figure 20**) permettent de comparer les deux modes de conversion, tout en s'assurant que l'amplicon obtenu correspond bien à la séquence d'intérêt.

Séquence non-convertie G C C C C A T A A G C A T T A G A C C A T A A G C A G C G C C G C C A C T G A G A G T C G C T C G G A A C T C G C C C A
 Séquence méthylée convertie G T T T T A T A A G T A T T A G A T T A T A A G T A G C G T C G T T A T T G A G A G T C G T T C G G A A T T C G T T T A
 (obtenue)

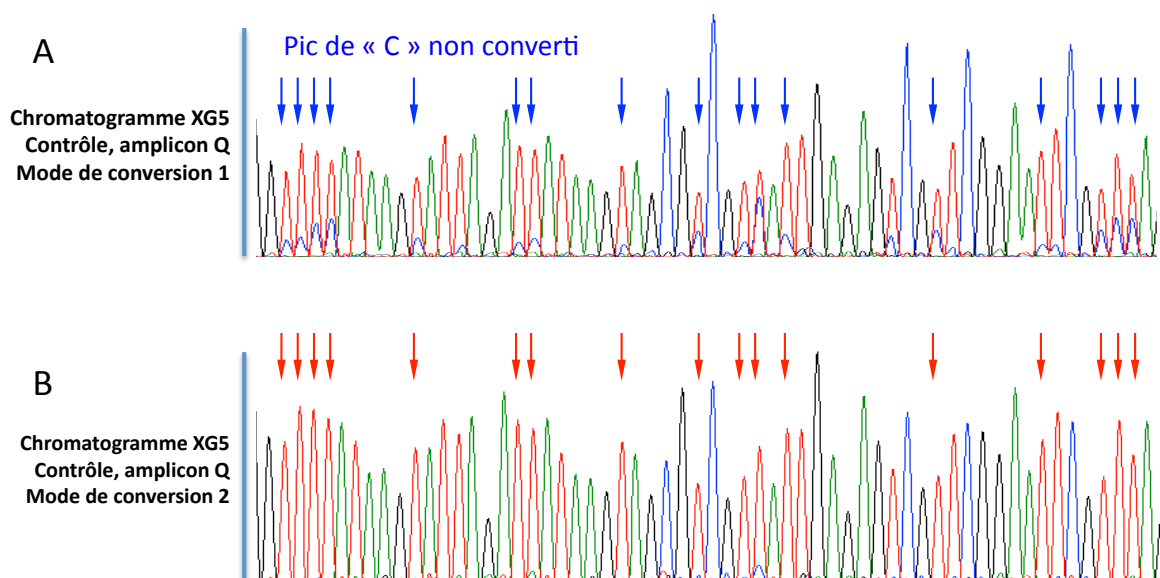


Figure 20 : Comparaison de deux modes de conversion au bisulfite à l'aide du Kit d'Active motif. A – Chromatogramme obtenu à l'aide du mode de conversion proposé par le Kit. B – Chromatogramme obtenu à l'aide du mode de conversion repris depuis Izzi et al., 2014.. « contrôle » signifie ici qu'il s'agit de la lignée non traitée.

Les chromatogrammes obtenus montrent que ce second mode de conversion est plus efficace : les pics de cytosines rémanents (flèches bleues) ont disparu. Ce dernier mode de conversion a été adopté.

3 - Résultats des MS-PCR nichées sur les lignées

Afin d'établir le niveau de méthylation aux positions explorées en condition basale, des cellules des lignées BCN, JJN3, JIM3, KMS12PE, LP1, XG5 et XG6 ont été traitées ou non pendant 3 jours avec 5 μ M de décitabine. Les résultats sont présentés en **figure 21**.

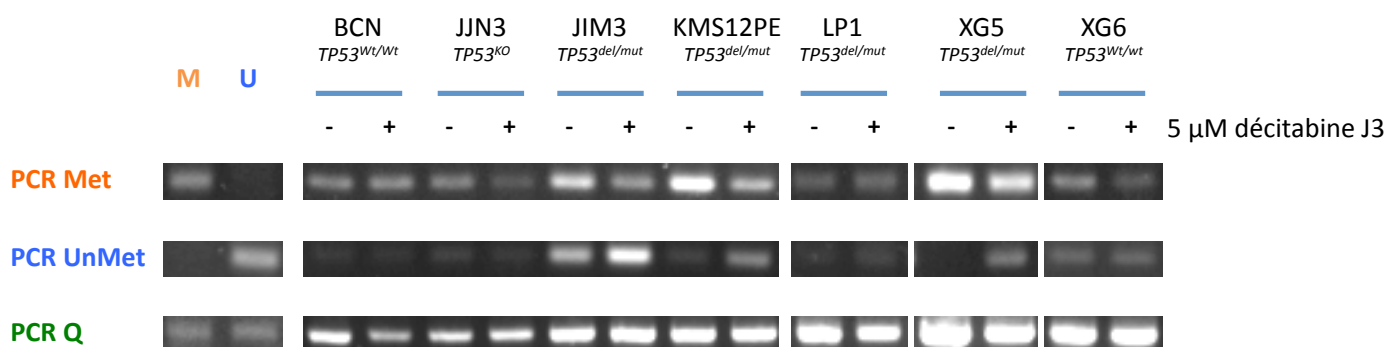


Figure 21 : Analyse de la méthylation par MS-PCR nichées dans les lignées. La PCR L a été réalisée sur 60 ng d'ADN converti pour les lignées. La PCR Met a été réalisée en 17 cycles, la PCR UnMet a été réalisée en 20 cycles et la PCR Q en 19 cycles.

Le nombre de cycles a été optimisé pour chaque PCR afin de pouvoir faire une analyse semi-quantitative. Dans toutes les lignées, la quantité d'ADN amplifiée par PCR-M est nettement plus importante que pour la PCR U pour laquelle on ne détecte qu'une très faible bande Unmet. Ceci suggère une méthylation de la séquence.

Le traitement par 5 μ M de d citolabine pendant 72 h a quant à lui conduit à une diminution de l'intensité de la bande obtenue par PCR Met dans les lignées JJN3, XG6, mais surtout dans les lignées JIM3, KMS12PE et XG5. En parallèle, le traitement a induit une augmentation de l'intensité de la bande UnMet de ces trois lignées.

Ces résultats semblent indiquer que le traitement à la d citolabine a conduit à une déméthylation des CpG couverts par les amorces Met et UnMet de ces trois lignées

Par ailleurs pour s'assurer de la bonne spécificité des réactions de PCR les produits de PCR obtenus avec la lignée XG5 ont été séquencés.

Le produit des PCR Met séquencé en condition contrôle montre une sélectivité à l'encontre de la séquence méthylée. De même, le produit des PCR UnMet en condition traitée montre une sélectivité à l'encontre de la séquence d m thyl e. Le séquençage de la PCR Q montre quant à elle que la séquence contrôle est majoritairement méthylée tandis que le traitement pendant 3 jours à concentration de 5 μ M conduit à une déméthylation au moins partielle de la séquence. Ces séquençages tendent à valider les résultats obtenus par MS-PCR.

ε - Pyroséquençage de la zone ciblée par les MS-PCR

1 - Principe de la technique

Comme les MS-PCR ne sont que le reflet de l'état de méthylation de quelques CpG ciblés par les amorces et comme la quantification des PCR Met et Unmet reste approximative, nous avons entrepris le pyroséquençage de la région. Le pyroséquençage va permettre d'obtenir une donnée quantitative de l'état de méthylation de chacun des CpG de la région séquencée.

De même que précédemment, les PCR préalables aux pyroséquençages sont des PCR nichées avec des amorces ne recouvrant pas de CpG. Lors de la PCR nichée une des deux amorces est marquée avec de la biotine à son extrémité 5'. En utilisant des billes de sépharose couvertes de streptavidine, le produit biotinylé est purifié, puis dénaturé avant hybridation du brin biotinylé avec des amorces de pyroséquençage (**Figure 22**).

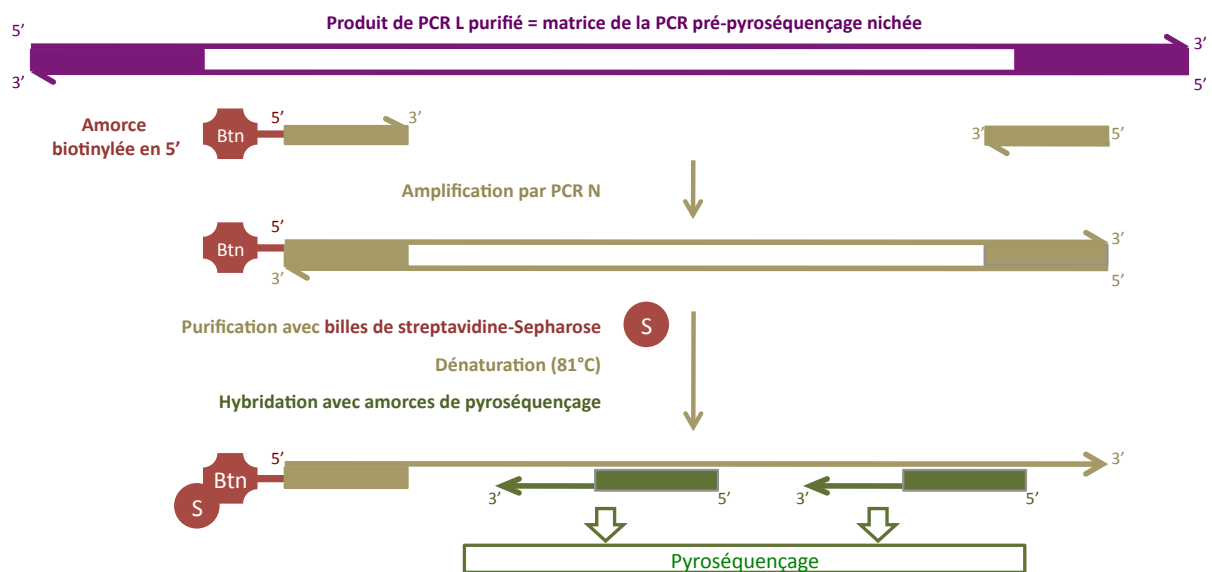


Figure 22 : Préparation des échantillons pour le pyroséquençage.

Lors du pyroséquençage, les nucléotides sont ajoutés un à un selon la séquence à analyser. Si la DNA polymérase intègre le nucléotide à la synthèse du brin, il va y avoir libération de pyrophosphate. Ce pyrophosphate va être utilisé pour la catalyse d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) à partir d'Adénosine 5' phosphosulfate (APS) par une ATP sulfurilase. L'ATP ainsi obtenu va être utilisé par la luciférase, provoquant l'émission d'un signal lumineux (**Figure 23**). Ce signal va être détecté et, dans le cas d'un mélange C/T (ou G/A pour le brin complémentaire), l'intensité du signal indique le niveau de méthylation.

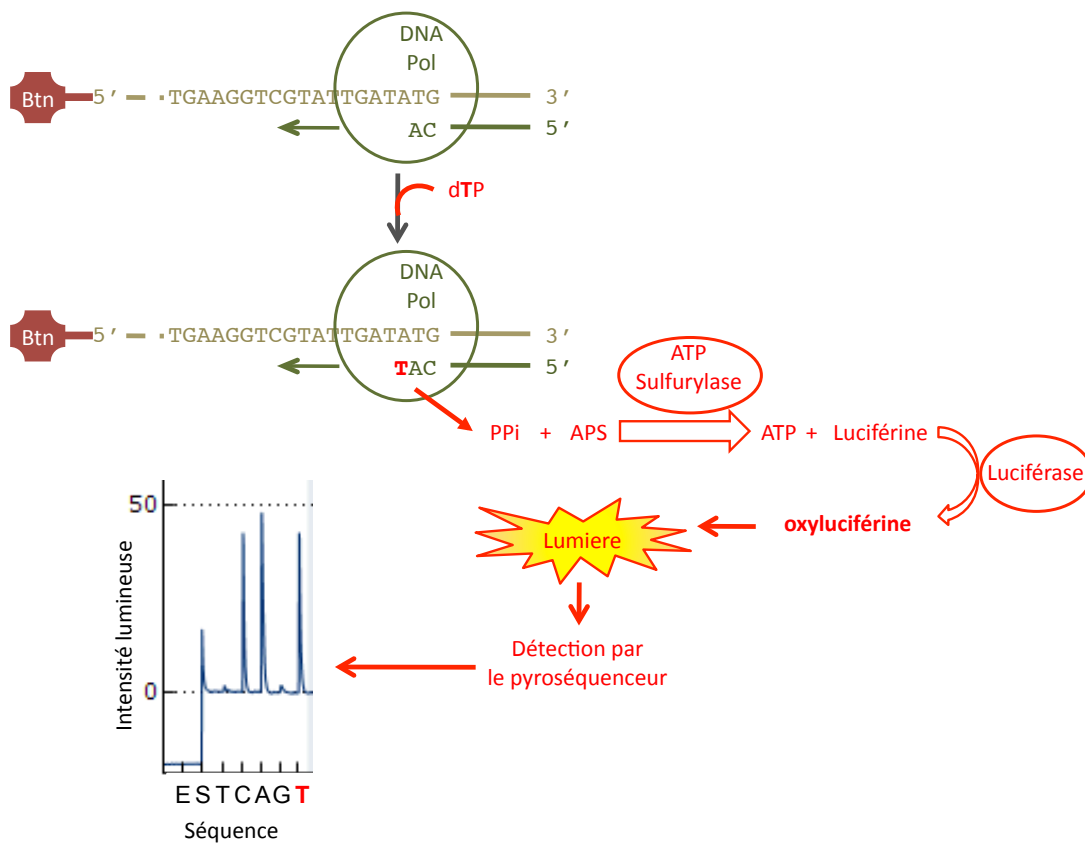


Figure 23 : principe de la réaction de pyroséquençage

Le logiciel donne le pourcentage de C (de G dans la séquence reverse) correspondant donc au taux de méthylation. En outre, l'appareil analyse la validité de la mesure et donne trois niveaux de certitude :

- Bleu : la mesure est sûre
- Jaune : la mesure est douteuse
- Rouge : la mesure n'est pas fiable.

La fiabilité de la mesure dépend de la hauteur des pics vis à vis du bruit de fond et du taux de conversion de l'ADN (mesuré par l'évaluation de la proportion de C dans un T issu de conversion).

Ces chiffres ont été retraités en acceptant un seuil de conversion de l'ordre de 95 %. En dessous de ce seuil, les valeurs sont considérées comme douteuses ou pas fiables.

Conservant le même code couleur que proposé par le logiciel (couleur bleu : résultats fiables, jaune : résultats douteux, rouge : résultats non fiables) de l'interface, les résultats obtenus à l'issue de ces premiers pyroséquençages figurent dans le **tableau XII**.

Numéro des CpG		131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
Amorce de pyroséquençage		PS1-Rev								PS2-Rev					
ÉCHANTILLON	JJN3 Ctrl	52	15	20	47	41	88	98	39	34	65	55	90	40	69
	JJN3 5µM déci J4		41	34	51	48	6	21	18	30	29	56	65	50	66
	KMS12PE Ctrl	53	62	60	52	72	82	95	91	67	84	94	97	94	90
	KMS12PE 5µM déci J3	54	66	68	65	72	75	99	90	74	92	88	98	91	99
	L363 Ctrl		54	71	55	68	76	99	96	63	88	90	85	89	99
	L363 5µM déci J4	56	48	42	39	53	60	74	70	32	43	60	72	46	59
	MDN Ctrl		67	63	76	72	91	100	98	41	45	60	78	48	42
	MDN 5µM déci J4	69	74	65	73	68	89	100	90	50	60	70	94	60	60

Tableau XII: résultats des pyroséquençages ciblant la séquences des MS-PCR. En bleu figurent les résultats fiables, en jaune les résultats douteux, en rouges les résultats non fiables. Pyroséquençages réalisées à partir du Kit Pyromark Gold de Qiagen.

Ces résultats sont dans l'ensemble non fiables ou douteux. A ce titre, il n'a pas été possible d'interpréter les données obtenues par ces pyroséquençages.

2461 CCTGCGTGGGCGGCTCGCCGGGCTCTGCAGGAGCGACGCGGCCAAAAGGCGGCGGGAA
 : : | ++ | | | ++ : : ++ : ++ | : : | : | | | ++ +++++ : : | | | | ++ ++ | | |
 2461 **TTT**GCGTGGGCGGTTTCGTGCGGGTTTGTAGGAGCGACGCGGTTAAAAAGGCGGCGGGAA
 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223

2521 GGAGGCGGGGAGAGCGCGCCCGGACCCGACTTGGACGCGGCCAGCTGGAGAGGCGGA
 | | | | ++ | | : | | | +++++ : ++ | | : : ++ : | | | | +++++ | : : | : | | | | | ++ |
 2521 GGAGGCGGGGTAGAGCGGTTTCGGGATTTGATTTGGACGCGGTTAGTTGGAGAGGCGGA
 224 225 226 227 228 229 230 231

Q1PSM2-Rev



2581 GCGCCGGGAGGAGACCTTGGCCCCGCGGACTCGGTTGGCCCGGCTGCCTTCCCGCGCG
 | ++ : ++ | | | | | : : | | | : : ++ : +++++ | : ++ | | | : : +++++ : | : : | : : +++++
 2581 GCGT**CGG**AGGAGATTTTGGTTTCGTGCGGATTCGGTGGTTCGCGTTGTTTTTTCGCGCG
 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242

Q1a-Rev



Q1b-For



2641 CCGGGCTAAAAGGCGTAACGCCCGCGGCGCCTACTCCCCGCGGCGCCTCCCTCCCC
 : ++ | : | | | | | ++ : | ++ : +++++ | : ++ : | : : : +++++ ++ : | : : : | : : +
 2641 TCGGGTAAAAGGCGTTAACGTTTCGCGGTCGTTTATTTTTCGCGGCGTTTTTTTTTTTC
 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252

2701 GCGCCATATAACCCGCTAGGGCCGGGACGCCCGCCCGCCTCCCGCGCACC
 + + + : : : | | | | | : : ++ : | | | | : ++ | : | : : ++ : : | : : : + + + : : : +
 2701 GCGTTTATATAATTCGTTTAGGGTTCGGGTAGTTTCGTTTGGTTTTTTCGTTTCGCGTATTC
 253 254 255 256 +1 257 258 259 260

Q1bPSM-For

Q1bPSM-Rev



2761 GCCCGGAGGCTCGCGCGCCCGGAAGGGGACGCAGCGAAACCGGGGCCCGCGCCAGGCCA
 + : : ++ | | | : +++++ : +++++ | | | | | ++ : | ++ | | : ++ | | : : +++++ : : | : : |
 2761 GTTCGGAGGTTTCGCGGTTTCGCGAAGGGGACGTAGCGAAATCGGGGTTTCGCGTTAGGTTA
 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271

2821 GCCGGGACGGACGCCGATGCCCGGGGCTGCGACGGCTGCAGGTAGGAGGCCAGGGCCGG
 | : ++ | | ++ | ++ : ++ | | : ++ | | : ++ ++ : | : : | | | | : : : | | | : ++ |
 2821 GTCGGGACGGACGTCGATGTTTCGGGGTTGCGACGGTTGTAGGTAGGAGGTTAGGGTTCGG
 272 273 274 275 276 277 278 279

L2-For



Q1b-Rev



2881 GGGGCGGTTTCGGCTCCGCGGGCGGGGCTGGAGCGCAGCGCTGGGCAGGCACCTGGGCTC
 | | | ++ | | ++ : : +++++ | ++ | | | : | | | ++ : ++ : | | | : : | | | : | +
 2881 GGGGCGGTTTCGGTTTCGCGGGCGGGGTTGGAGCGTAGCGTTGGGTAGGTATTTGGGTTTC
 280 281 282 283 284 285 286 287

L1-Rev



Q2-For



Des amorces de pyroséquençage ont été désignées pour couvrir la plus grande séquence possible avec le minimum d'amorces. Cette démarche était liée à la difficulté de placer des amorces ne couvrant pas de CpG (de façon à ne pas rendre l'amplification dépendante de leur statut de méthylation) dans une zone par ailleurs très riche en CpG. De fait, cela n'a pas toujours été possible et certaines amorces ont été désignées en couvrant des CpG, des mismatches ont alors été intégrés dans la séquence de l'amorce afin de rendre l'hybridation indépendante au statut de méthylation. Pour cela, lorsque l'amorce est en sens, le C/T a été remplacé par un A et lorsqu'elle est en anti-sens, le G/A a été remplacé par un T. Que l'ADN soit méthylé ou non il n'y a pas hybridation sur cette position (qui doit être plutôt centrale dans l'amorce). Nous avons réalisé des PCR Q1a, Q1b et Q2 à partir d'ADN converti de la lignée KMS12PE en condition contrôle comme après 4 jours de traitement à 5 μ M de décitabine. Ces PCR ont également été réalisées à partir des ADN témoins commerciaux.

Tableau XIII (page précédente) : Résultats des pyroséquences de la fin de l'ilot 302 CpG. En bleu figurent les résultats fiables, en jaune les résultats douteux, en rouges les résultats non fiables. Pyroséquences réalisées à partir du Kit Pyromark Gold de Qiagen pour les ADN témoins commerciaux Méthylé (M) ou déméthylé (U), Kit Pyromark Advanced pour KMS12PE non traité (Ctrl) et Traité à 5 μ M Décitabine J4 (Déci).

Les résultats sont présentés en **tableau XIII**. La forte proportion de résultats non-fiables (en rouge) ou douteux (en jaune) montre les difficultés à procéder au pyroséquençage dans cette nouvelle région. Mais en outre dans l'amplicon Q2 avec l'amorce Q2-Rev biotinylée, le séquençage du témoin commercial méthylé par l'amorce Q2PS1-For donne des résultats considérés comme fiables par l'appareil, alors que les CpG apparaissent totalement déméthylés. Cet artefact peut aussi bien provenir de la technique elle-même, mais peut également être le fruit de l'important nombre de cycles nécessaires pour obtenir un amplicon destiné au pyroséquençage (35 cycles pour la PCR L et 35 cycles pour les Q nichées). En effet, le grand nombre de cycle a pu conduire à une amplification non-représentative de séquences minoritaires voire ultra-minoritaires. Ces résultats ne peuvent donc être considérés comme fiables

En conclusion : Au moins une partie du promoteur est méthylée dans trois lignées *TP53*^{del/mut}. Cette méthylation est réversible par l'utilisation d'un inhibiteur de la méthylation, la décitabine.

Néanmoins, il n'a pas été possible d'évaluer la méthylation de l'ensemble de l'ilot par pyroséquençage. Potentiellement du fait d'une forte densité en CpG. Nous avons poursuivi notre étude en mesurant l'efficacité de la décitabine non plus sur la méthylation des CpG, mais directement sur l'expression de *TP73* et par Western-Blot.

F - La décitabine induit la transcription de *TP73* dans les lignées au promoteur méthylé

Les lignées ont été traitées pendant 4 jours avec une dose de 5 μ M de décitabine, et l'expression de *TP73* a été mesurée par Q-PCR (**Figure 27**).

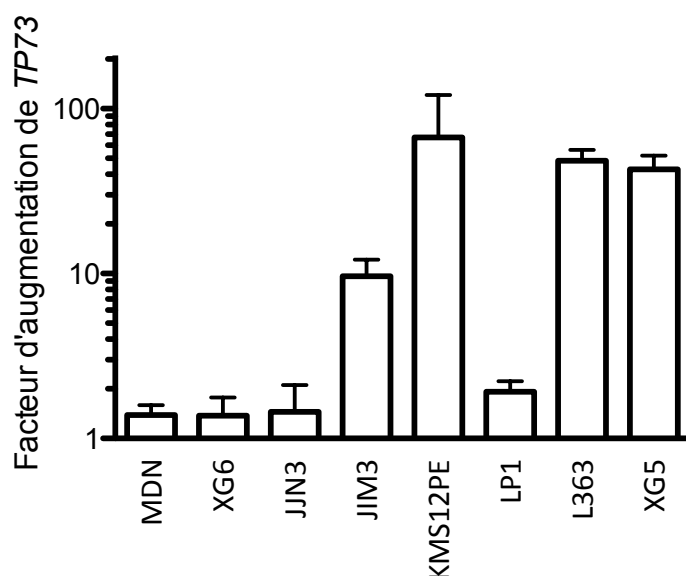


Figure 27: Induction de l'expression de *TP73* par un traitement de 96 h à 5 μ M de décitabine. Les histogrammes représentent la moyenne \pm écart moyen de trois expériences (duplicates biologiques). Les Q-PCR ont été réalisées à partir de 10 ng d'ADNc initiaux.

Dans les lignées MDN, XG6 et JJN3, qui ont une expression basale significative (cf. **Figure 10**), aucune augmentation de l'expression n'a été induite par le traitement. Dans toutes les autres lignées, qui ont un niveau d'expression constitutive faible voire négative, une augmentation significative du niveau de transcrit a été obtenue, d'un facteur 2, 10, 67, 48 et 43 respectivement dans les lignées LP1, JIM3, KM12PE, L363 et XG5. Ces cinq lignées sont toutes des lignées *TP53^{mut}*. On remarque que les forts et faible niveaux d'induction dans les lignées JIM3, KMS12PE, XG5 et LP1 est en bon accord avec le niveau de méthylation révélé en MS-PCR dans la **Figure 21**.

G - Nature des transcrits induits par la décitabine

La sonde de Q-PCR ciblant de façon indistincte les transcrits codants pour les différentes isoformes (TAp73 et Δ Np73 aussi nommée DNp73), nous avons recherché par RT-PCR quelles isoformes (**Figure 28**) étaient induites par le traitement à la décitabine.

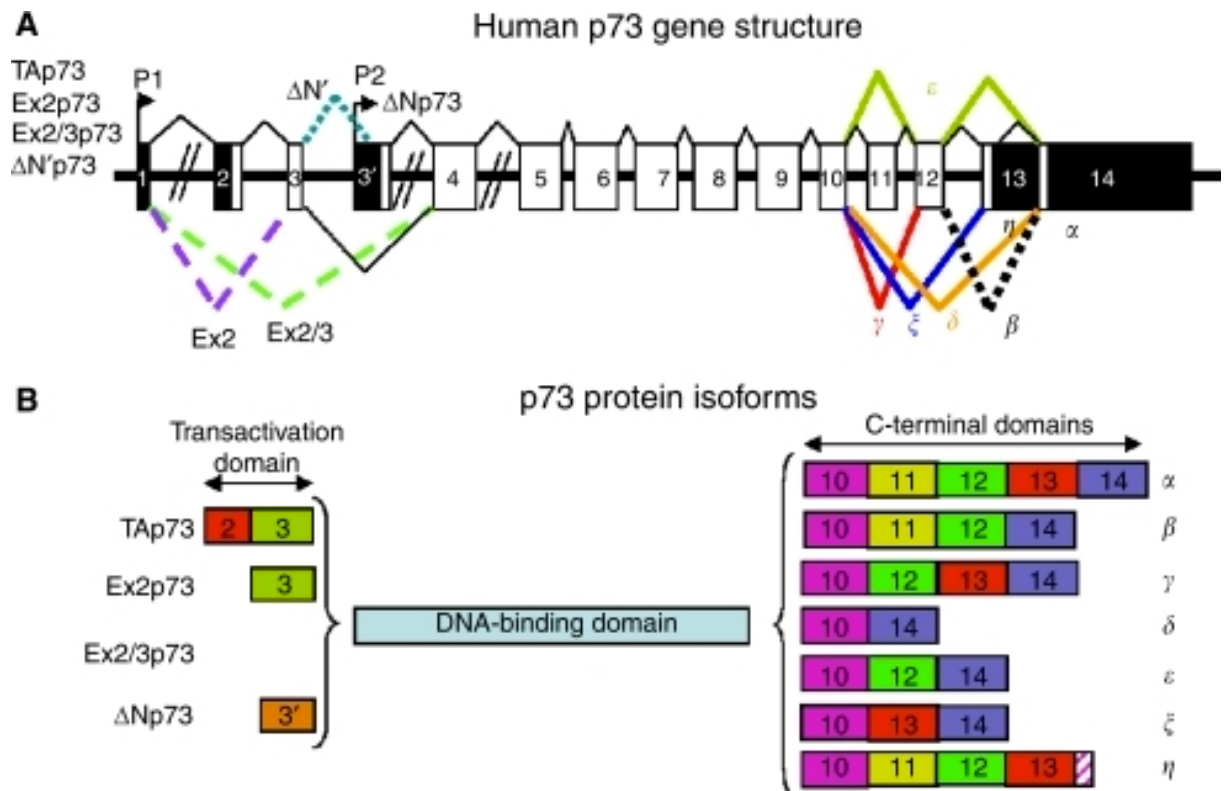


Figure 28: Différentes isoformes de p73 (Bourdon, 2007).

Ces différentes PCR ont été réalisées en plaçant une amorce dans un exon spécifique à chaque transcrite. Ainsi, ces PCR visent à produire un amplicon spécifique des formes TAp73 (exon 2-6), DNp73 (3'-6) ou non discriminant (exons 7-10). La **Figure 29** représente les résultats obtenus.

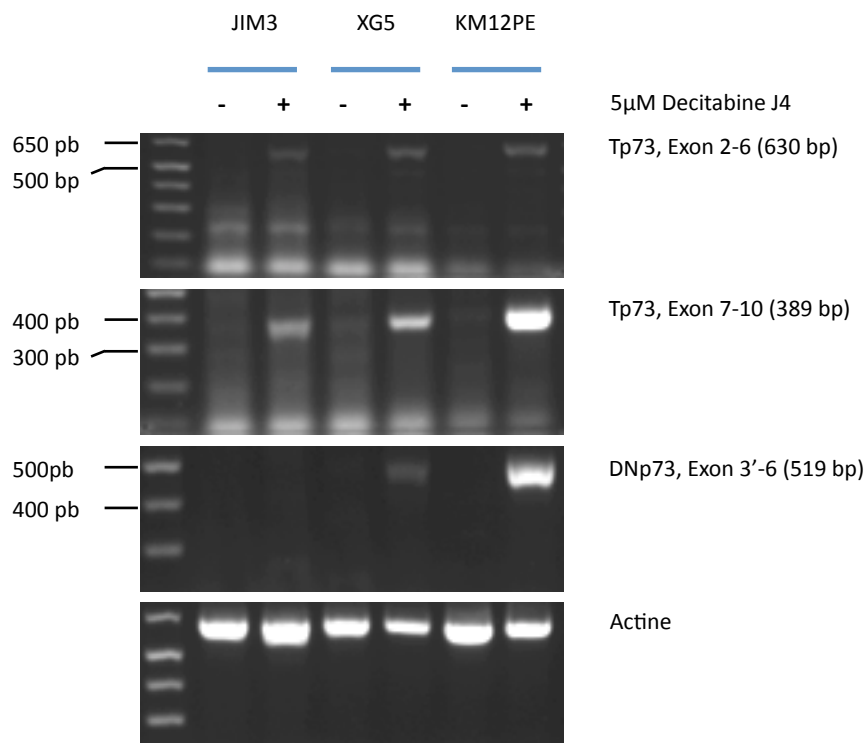


Figure 29 : Induction de l'expression de différents variants de *TP73* par un traitement de 96 h à 5 µM de décitabine. Les PCR ont été réalisées en 35 cycles à partir d'une quantité initiale d'ADNc de 40 ng pour les PCR de *TP73*, et de 10 ng pour la PCR actine.

Dans ces trois lignées, l'amplicon non discriminant (exon 7-10) a augmenté de façon nette, en particulier pour la lignée KMS12PE dont l'augmentation d'intensité sous l'effet du traitement fait écho à l'augmentation d'un facteur 67 par Q-PCR. Cette PCR, de même que les sondes de Q-PCR, cible indistinctement tous les transcrits.

L'augmentation de l'expression, bien que détectable, est moindre pour l'isoforme TAp73 dans les 3 lignées mais très forte pour DNp73, en particulier pour la lignée KMS12PE.

Ces résultats confirment l'augmentation du niveau d'ARNm, mais semblent indiquer qu'elle est principalement due à une augmentation des formes Δ Np73 dans la lignées KMS12PE. Cette augmentation ne pourra être détectée, au niveau protéique, par l'anticorps utilisé dans le cadre de nos Western-Blots, celui-ci ciblant spécifiquement les formes TAp73.

H - Bilan sur la méthylation

Bien que difficiles à interpréter, les résultats obtenus par MS-PCR et pyroséquençage suggèrent que l'îlot CpG est méthylé dans la plupart des lignées, en particulier pour trois lignées, JIM3, KMS12PE et XG5, toutes trois *TP53^{del/mut}*. Le traitement à la décitabine de ces lignées conduit, d'après les MS-PCR, à une déméthylation des positions explorées sur l'îlot 302 CpG. Cette déméthylation est accompagnée d'une augmentation du niveau de transcrits de *TP73* mais pas toujours du transcrit correspondant à la forme TAp73. La déméthylation peut donc être une dé-répression, mais une stimulation supplémentaire serait nécessaire pour augmenter le niveau de *TP73* et de p73 dans ces trois lignées.

III - Induction et stabilisation de p73

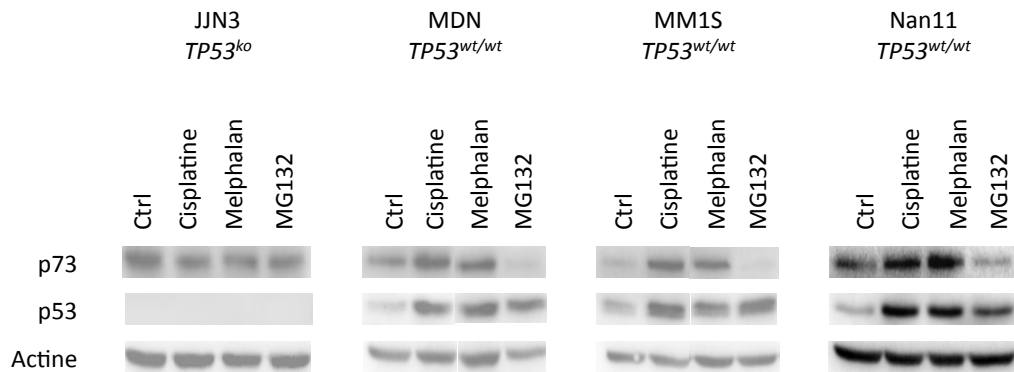
A - Agents alkylants et inhibiteur du protéasome

En parallèle à l'étude épigénétique de *TP73*, nous avons exploré ses régulations protéiques dans les lignées présentant une expression constitutive. Pour cela, nous avons utilisé des agents alkylants (melphalan, cisplatine) et un inhibiteur du protéasome (MG132).

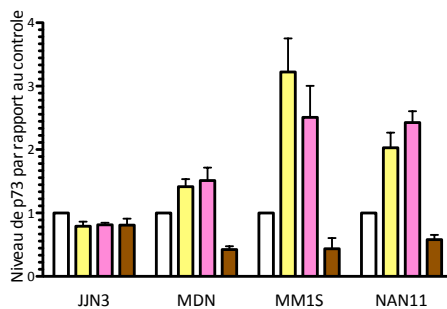
Nous avons traité les lignées MDN, MM1S, NAN11 et JN3 pendant 16 h avec du cisplatine ou du melphalan, deux agents chimio thérapeutiques connus pour infliger des dommages à l'ADN, avant de faire une analyse simultanée de l'expression des transcrits et de la protéine. En parallèle, les cellules ont été traitées avec 1 μ M de MG132, inhibiteur du protéasome décrit pour stabiliser la protéine p53 (Surget et al., 2012). Les résultats de ces WB et des Q-PCR associées sont présentés en **figure 30**.

Le traitement par le cisplatine a conduit à une augmentation du niveau de p73 dans les trois lignées *TP53^{wl/wt}* MDN, MM1S, NAN11, respectivement d'un facteur 1,6, 3,5 et 2,5. Le niveau de la protéine a également été augmenté par le traitement au melphalan, respectivement d'un facteur 1,7, 2,6 et 2,5. En revanche, ni le cisplatine, ni le melphalan n'ont induit de variations significatives dans la lignée JN3. En parallèle, le niveau de p53 a été augmenté pour ces trois lignées, tant par le cisplatine (respectivement 2,6, 2,6 et 2,8) que par le melphalan (respectivement 2,6, 1,6 et 3,3). Néanmoins, dans ces trois lignées, si le traitement au MG132 a bien augmenté le niveau d'expression de p53 (respectivement 2,6, 2,2 et 3) ce traitement a conduit à une nette diminution de p73 dans MDN, MM1S et NAN11, mais pas dans JN3.

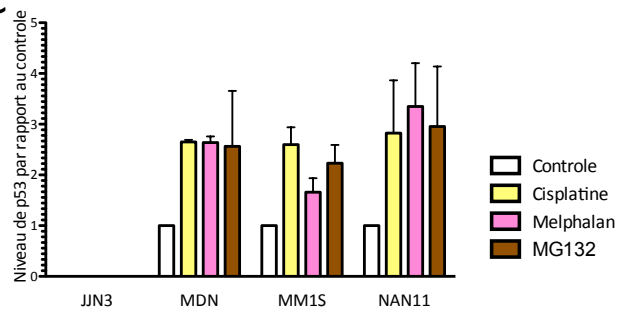
A



B



C



D

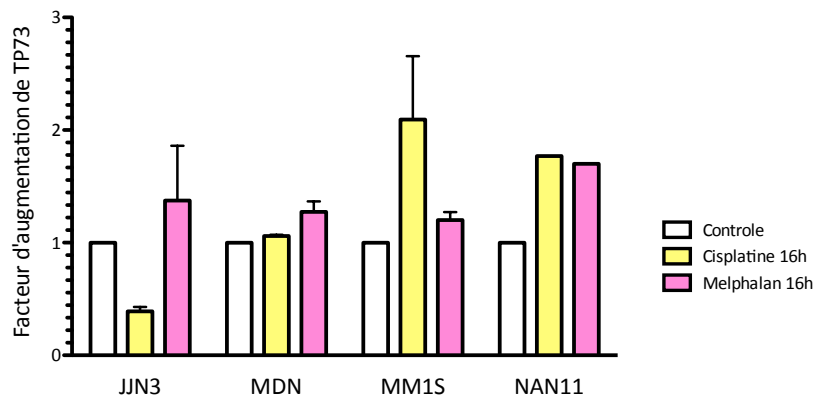


Figure 30 : Modulation de l'expression de *TP73* par des agents alkylants et un inhibiteur du protéasome

A – Western-Blot de l'expression de p73 et de p53. Les résultats sont représentatifs de plusieurs expériences indépendantes. 80 µg de protéine ont été déposés.

B, C – quantification de l'expression de p73 et de p53. Les histogrammes représentent la moyenne ± écart moyen de l'expression de p73 normalisée par celle de l'actine de 2 à 3 WB

D – quantification de l'expression de *TP73* par Q-PCR. Les histogrammes représentent, après normalisation par l'expression de *RPL37A* la moyenne ± écart moyen du facteur d'augmentation par le traitement. Résultats de 1 à 2 expériences mesurées en triplicatas.

L'absence de régulation de l'expression de p73 dans la lignée *TP53^{KO}* JN3, suggère une potentielle dépendance à p53 pour la régulation de p73 par les agents alkylants ou l'inhibiteur du protéasome.

Le cisplatine a induit une augmentation de *TP73* d'un facteur 1,2 et 2 dans les lignées MM1S et NAN11 et n'a pas induit d'augmentation dans MDN. Le melphalan a quant à lui induit une augmentation de *TP73* d'un facteur 1,4 dans la lignée MDN, 1,3 dans la lignée NAN11, et n'a pas induit d'augmentation dans MM1S. Ces modulations sont assez faibles au niveau des transcrits mais globalement cohérentes avec les augmentations protéiques.

Concernant JN3, l'expression de *TP73* a diminué sous l'effet du cisplatine et légèrement augmenté sous l'effet du melphalan.

Pour étudier quelle(s) isoforme(s) étai(en)t induite(s) par les alkylants, nous avons réalisé les RT-PCR décrites précédemment. Conformément aux résultats de Q-PCR, la PCR 7-10 montre une augmentation de l'ensemble des transcrits pour la lignée MM1S traitée au cisplatine et de la lignée NAN11 traitée tant au cisplatine qu'au melphalan. La PCR 2-6 montre quant à elle que ces augmentations correspondent bien à une augmentation des formes TAp73 pour ces deux lignées (**Figure 31**).

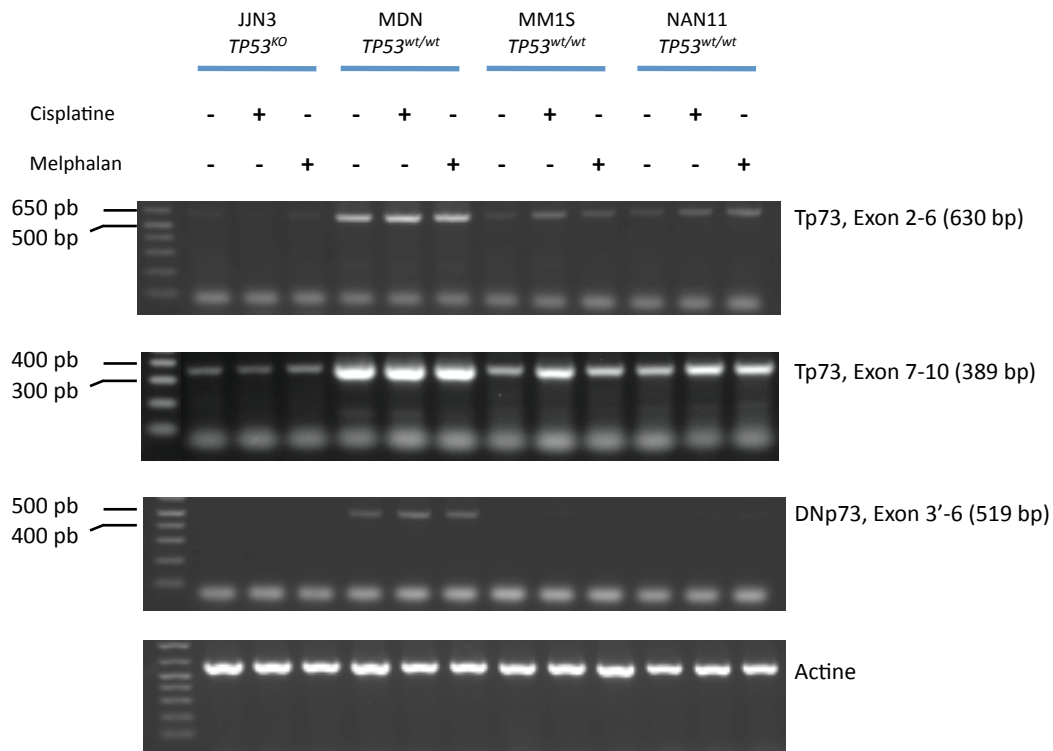


Figure 31 : Expression des différents variants de TP73 par RT-PCR.

Les cellules ont été traitées 16 h avec des agents alkylants. Ces PCR ont été réalisées en 20 cycles.

La PCR 3'-6 (DNp73) ne montre aucune variation significative quels que soient la lignée, le traitement et l'expression constitutive.

En bon accord avec résultats de Q-PCR, l'expression de *TP73* a augmenté globalement dans MM1S et NAN11, avec une augmentation des transcrits TAp73.

B - Rôle de p53 dans la réponse au melphalan

Afin d'étudier le rôle de p53 dans la régulation de p73, nous avons réalisé une transfection de siRNA dirigé contre *TP53* dans la lignée *TP53^{wt/wt}* MM1S. Puis, après 48 h, les cellules ont été traitées pendant 16 h par du melphalan. L'expression de p73 a été mesurée par western-Blot (**Figure 32**).

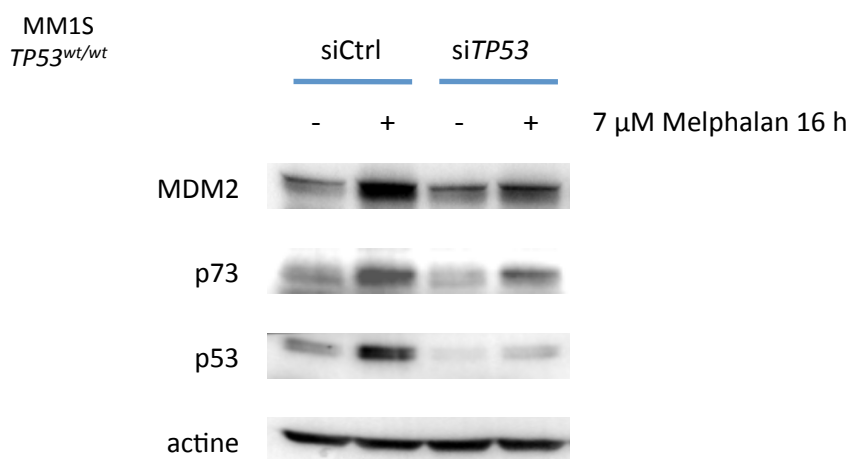


Figure 32 : L'extinction de p53 inhibe la régulation de p73 par le melphalan. 80 μg de protéines ont été déposés.

En premier lieu, on constate qu'en condition contrôle comme après traitement au melphalan, le siRNA *TP53* a conduit à une extinction d'environ 75 % du niveau de p53. L'efficacité fonctionnelle de cette inhibition de p53 est illustrée par la diminution de l'augmentation de l'expression de MDM2. L'extinction ainsi provoquée de p53 a conduit à une forte diminution de l'augmentation de l'expression de p73 par le melphalan.

Ces résultats montrent que p53 régule l'augmentation de p73 par le melphalan, expliquant ainsi pourquoi cette régulation de p73 n'existe que dans les lignées *TP53^{wt}*. Cette observation doit être reproduite dans les autres lignées *TP53^{wt}*.

C - Effet de la nutlin-3a sur la protéine p73

Afin d'étudier la régulation de p73, nous avons traité des cellules MM1S, MDN, JJN3 L363 et OPM2 avec un inhibiteur de MDM2 qui prévient l'ubiquinylation et la dégradation de p53 en prévenant les interactions p53-MDM2. Les cellules ainsi traitées pendant 24 h, les résultats des WB sont présentés en **figure 33**.

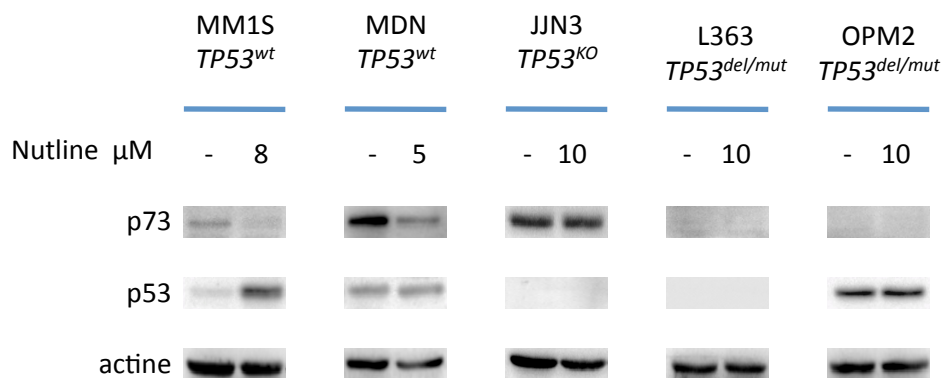


Figure 33 : La nutlin-3a diminue le niveau d'expression de p73 dans différentes lignées *TP53^{wt}*. Les cellules ont été traitées durant 24 h par la nutlin-3a aux concentrations indiquées. L'expression de p73 et p53 a été mesurée par WB, 50 μ g de protéines ont été déposés.

Si le traitement par la nutlin-3a conduit bien à une augmentation du niveau de p53 dans les lignées MM1S et MDN, il conduit en revanche à une diminution du niveau de p73 dans ces deux lignées. Le niveau de p73 n'a en revanche pas été impacté par le traitement ni dans la lignée JJN3 *TP53^{KO}* et p73 positive ni dans les L363 et OPM2 *TP53^{mut}* qui demeurent p73 négatives.

Ces résultats montrent une régulation de p73 par la nutlin-3a uniquement dans les lignées *TP53^{wt}*. Etant donnée la spécificité de la nutlin-3a pour le complexe MDM2-p53, ces données suggèrent un rôle de MDM2 ou p53, direct ou indirect, dans la régulation de p73.

D - Combinaison de déméthylation et de dommage à l'ADN

Les résultats ci-dessus montrent que la stabilisation de p73 n'est possible que dans des lignées *TP53^{wt}*, car elles sont les seules à exprimer p73 et la répression de p53 dans l'une d'elle réduit fortement la régulation par le melphalan. Afin de confirmer ces données, trois lignées *TP53^{mut}* JIM3, KMS12PE et XG5 ont été traitées avec 5 µM de décitabine pendant 3 jours avant un traitement de 16 h par du cisplatine ou du melphalan (aux concentrations indiquées dans le **Tableau II** du Matériels et Méthodes). Ces 3 lignées ont été choisies pour leur forte augmentation de l'expression de *TP73* après traitement par la décitabine. Nous avons mesuré l'expression de p73 par WB (**Figure 34**).

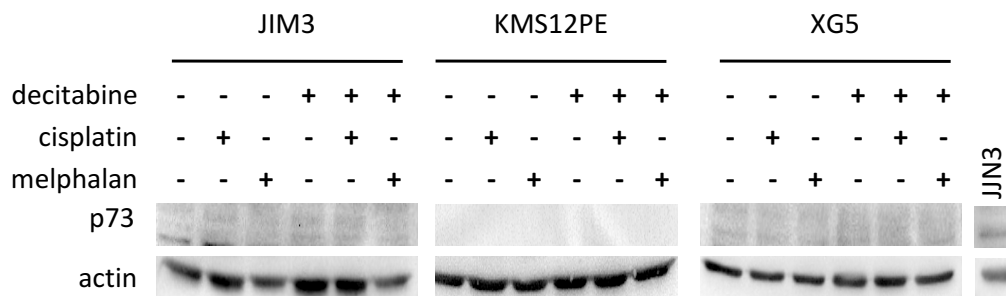


Figure 34 : La combinaison de décitabine et d'agents alkylants n'induit pas l'expression de p73. Expression de p73 mesurée par Western-Blot dans les lignées JIM3, KMS12PE et XG5. La lignée JIN3 est utilisée comme témoin positif pour la protéine p73. 80 µg de protéines ont été déposés.

Ces résultats montrent que la combinaison entre décitabine et agent alkylant n'a pas permis d'induire l'expression de la protéine p73 dans les trois lignées étudiées.

E - Bilan sur la régulation protéique de p73 par les agents alkylants

Il apparaît clairement que, pour trois lignées $TP53^{Wt/Wt}$, MDN MM1S et NAN11, le cisplatine et le melphalan conduisent à une augmentation du niveau de p73. Cette augmentation peut s'expliquer au moins partiellement par une augmentation du niveau de transcrite. Néanmoins, les résultats obtenus par l'extinction de p53 et l'absence d'augmentation du niveau de p73 dans la lignée JN3, $TP53^{KO}$ sous l'effet de ces traitements semblent indiquer une dépendance à p53 de cette induction. Néanmoins, une augmentation de p53 en elle-même n'est pas suffisante pour induire une augmentation de p73 comme le démontrent les résultats obtenus avec l'inhibiteur du protéasome MG132 et la nutlin-3a, ces deux traitements conduisant à une diminution du niveau de p73 dans les lignées $TP53^{Wt/Wt}$. Toutefois, les MG132 et la nutlin-3a sont sans effet dans JN3 qui n'exprime ni p53 ni MDM2.

DISCUSSION/CONCLUSION

Ce travail a mis en évidence que la transcription de *TP73* est réprimée par méthylation dans une partie des lignées de Myélome Multiple *TP53^{del/mut}* et que cette répression est réversible par utilisation d'un inhibiteur de la méthylation, la décitabine. Dans le myélome multiple, la méthylation du promoteur P1 avait déjà été retrouvée en 2004 (Galm et al., 2004). Cette étude portait sur 56 patients aux divers stades de la maladie ainsi que sur 5 lignées, toutes *TP53^{mut}*. La méthylation du promoteur était étudiée par MS-PCR, les amorces ciblant une série de CpG situés après le premier nucléotide transcrit.

Dans 12,5 % des échantillons de patients testés, le promoteur était retrouvé hyperméthylé. Dans les lignées, le promoteur était méthylé dans U266 et XG1 mais déméthylé dans OPM2, RPMI8226 et LP1. Les CpG ciblés par les amorces de cette étude sont situés une centaine de bases en aval du premier nucléotide transcrit (soit plus de 1000 paires de bases après nos propres amorces), mais la déméthylation de LP1 est cohérente avec nos résultats.

Plus récemment, l'équipe de Fonseca a également étudié par MS-PCR la méthylation du promoteur P1 dans une lignée (Teoh et al., 2016). Il s'agissait de la lignée JN3 dont le promoteur était retrouvé hyperméthylé alors que nous ne l'avons trouvé que peu méthylé. Cette méthylation était détectée par MS-PCR utilisant des amorces situées dans la même zone en aval du premier nucléotide transcrit que dans l'étude de Galm. Par ailleurs, cette méthylation n'empêchait pas la transcription constitutive de *TP73* et l'expression constitutive de la protéine, comme nous l'avons nous-même obtenu.

De fait, à l'exception d'une lignée (KMS11), les résultats d'expression constitutive étaient comparables dans leur étude et la nôtre. Les résultats obtenus par l'équipe de Fonseca sur la lignée JN3 ne semblent pas montrer un rôle de répression de la méthylation de cette partie du promoteur P1 et la confrontation avec nos résultats suggère que la méthylation de l'îlot CpG n'est pas homogène.

Soulignons que dans le cadre de l'étude en question, la déméthylation du promoteur était induite par un traitement avec PRIMA-1 qui conduisait à une déplétion de DNMT1. Cette déplétion de DNMT1 était associée à une augmentation de l'expression de la protéine, toujours dans la lignée JN3. Nous n'avons pas observé d'augmentation de *TP73* dans JN3 après un traitement à la décitabine et pas de modification de la méthylation : il apparaît difficile de concilier leurs résultats et les nôtres. Une autre étude a mis en avant le rôle de p73 dans la réponse à PRIMA-1 en utilisant la lignées p53^{wt} MM1S (Saha et al., 2013): nous n'avons pas non plus observé d'augmentation de l'expression de p73 dans la lignée MM1S traitée par PRIMA-1 et, étant donné le niveau d'expression constitutive de p73 dans cette lignée, il semble improbable que PRIMA-1 agisse en déméthylant le promoteur et en augmentant l'expression.

L'étude de Teoh pose la question du mode de répression par méthylation : Il pourrait s'agir d'une répression par méthylation globale de l'îlot. Une telle répression empêcherait une fixation de la RNA polymérase ou modifierait la condensation locale de la chromatine. A l'inverse, il pourrait s'agir d'une méthylation de CpG particuliers qui seraient responsables de cette répression, empêchant la fixation d'un ou de plusieurs facteur(s) de transcription précis ou, à l'inverse, recrutant des protéines reconnaissant les méthyl-CpG. Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'étudier la méthylation de l'ensemble des CpG.

C'est dans cette optique que nous avons cherché à procéder à des pyroséquençages de l'ensemble de l'îlot. Tentatives qui se sont révélées sans succès en dépit de la multiplication des amorces d'amplification pré-pyroséquençage, des enzymes utilisées dans le cadre de ces PCR, des amorces de pyroséquençage et enfin des kits de pyroséquençage. Pour autant, la méthylation de cet îlot peut être étudiée par pyroséquençage.

L'îlot CpG a été pyroséqué précédemment dans le cadre d'autres études dans des lignées de neuroblastome (Kiss et al., 2012) – retrouvé déméthylé - phéochromocytome et paragangliome (Geli et al., 2008) – retrouvé déméthylé – ou encore dans du placenta, ciblant la même séquence que nous avons étudié avec succès par MS-PCR (Grigoriu et al., 2011). On peut donc supposer que le pyroséquençage de cet îlot est possible quand la méthylation n'est pas importante.

Ciblant une zone annexe à celle examinée par l'étude de l'équipe de Fonseca, une étude réalisée à partir des échantillons issus de 43 patients a montré que cette zone en aval du premier nucléotide transcrit était retrouvée méthylée pour environ 35 % des patients au diagnostic et que la proportion de méthylation diminuait après la rechute (Martínez-Baños et al., 2017).

Le point commun de l'ensemble des pyroséquençages réussis de l'îlot 302 CpG semble être une faible taille des amplifications pré-pyroséquençage (généralement de l'ordre d'une centaine de bases). La forte proportion en CpG pourrait expliquer l'impossibilité rencontrée de pyroséquencer de grandes séquences. Aussi pourrions nous subdiviser l'îlots en plus petits amplicons à pyroséquencer.

Une autre solution existe par ailleurs : il serait possible de réaliser des amplifications non méthylation-dépendantes d'ADN bisulfite des cellules traitées ou non à la décitabine comme nous en avons réalisé plusieurs fois dans le cadre de nos travaux. A partir de ces amplifications, nous pourrions amplifier la séquence bisulfitee avant de la cloner et de réaliser un séquençage de l'ensemble de l'îlot. La proportion de clones retrouvés méthylés pour chaque position sera le reflet de la proportion initiale de méthylation de chacun de ces CpG (Zhang et al., 2009). Ce séquençage permettrait d'identifier d'éventuels CpG dont la méthylation est décisive dans la répression de la transcription, si de tels CpG existent.

Notre étude a également mis en évidence que le traitement par des agents alkylants - cisplatine et melphalan – induit une augmentation du niveau de p73 dans trois lignées *TP53^{wt}* dans lesquels le promoteur P1 est peu méthylé. L'augmentation de p73 en réponse au cisplatine est décrite dans plusieurs cancers comme le cancer de l'ovaire (Al-Bahlani et al., 2011), le neuroblastome (Million et al., 2006) ou encore la leucémie lymphoïde chronique (Tonino et al., 2015).

L'induction de p73 en réponse au melphalan est également décrite dans des cellules transformées par l'EBV par le biais d'activation de la voie de p38 MAPK (Park et al., 2013).

De façon plus générale, les dommages à l'ADN, en particulier induits par ces agents alkylants, est responsable de l'activation de diverses voies de signalisation anti-proliférative, pro-réparation de l'ADN et pro-apoptotique. En particulier, les dommages à l'ADN vont induire l'activation de la protéine ATM qui va phosphoryler chk2 ainsi que c-Abl.

Ces voies vont induire la transcription de *TP73*, via la phosphorylation en sérine 364 de la protéine E2F1, un facteur de transcription de *TP73* (Stevens et al., 2003) et l'acétylation des lysines 117, 120 et 125 de E2F1 par p300/CBP (Galbiati et al., 2005). Ces modifications post-traductionnelles vont conduire à stabiliser E2F1 et ainsi la transcription du gène *TP73*. Par ailleurs, ces mêmes voies vont induire la stabilisation de p73 par la phosphorylation de la tyrosine 99 par c-Abl (Gong et al., 1999) et l'acétylation de ses lysines 321 et 327, également par p300/CBP.

Par ailleurs, ces voies sont aussi responsables d'une stabilisation de p53 par le biais de sa phosphorylation et de son acétylation. Mais aussi, via la phosphorylation de MDM2 en divers sites dont la tyrosine 294 par c-Abl et la sérine 295 par ATM (Meek and Knippschild, 2003). Ces phosphorylations vont inhiber l'activité de MDM2 et ainsi participer à la stabilisation de p53.

Etant donné que les agents alkylants n'induisent l'expression de p73 que dans les lignées p53^{wt}, et pas dans la lignée p53^{ko} ni dans les lignées p53^{mut} préalablement traitées par la décitabine, il semble que cette induction puisse être sous la dépendance de p53. Nos données préliminaires d'extinction de p53 par siRNA suggèrent que l'augmentation de p73 est bien dépendante de p53. Le mécanisme n'est toutefois pas décrit : est-ce par une augmentation de l'expression génique ? ou par une augmentation de la stabilité protéique ? Nos données actuelles n'ont pas permis de répondre à cette question.

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence que le traitement à la nutlin-3a et à un inhibiteur du protéasome induisait une diminution du niveau de p73 dans les trois lignées *TP53^{wt}* mais pas dans la lignée *p53^{ko}* JN3. La nutlin-3a se fixe au niveau de la poche hydrophobe de MDM2 (Lau et al., 2008) et inhibe l'interaction avec ses protéines partenaires, en particulier p53 dont l'ubiquitinylation est réduite et ainsi sa dégradation. MDM2 est également décrite pour interagir avec p73, en se fixant de la même façon à la protéine. Cependant, si MDM2 se lie à p73 et conduit à une diminution de son activité transcriptionnelle, elle n'est pas responsable d'une dégradation directe de p73. L'ubiquitinylation des lysines 11, 29 et 63 par MDM2 n'est pas décrite pour induire la dégradation de p73 par le protéasome, mais servirait à recruter une autre ubiquitine-ligase, Itch. Cette ubiquitine-ligase est décrite pour induire la dégradation protéasome-dépendante de p73 (Kubo et al., 2010; Wu and Leng, 2015). Cette dégradation, observée dans des modèles de co-transfection en cellules HEK293 est cependant décrite comme étant inhibée par le MG132. Cette interaction entre ubiquitine-ligase pourrait expliquer que le MG132 est décrit pour induire une augmentation du niveau de p73 exprimé (Toh et al., 2004).

Aussi les résultats que nous avons obtenus ne vont pas dans le sens usuellement décrit, mais semblent au contraire indiquer une stabilisation dépendante tant de MDM2 que du protéasome.

Des expériences de co-précipitations de MDM2, p73 dans les cellules traitées ou non avec la nutlin-3a permettraient de définir si des complexes p73-MDM2, p73-Itch et MDM2-Itch existent. Le rôle de MDM2 devra également être confirmé par une extinction de MDM2.

Les résultats obtenus par l'utilisation de MG132 et de nutlin-3a peuvent peut-être être rapprochés et suggèrent une dégradation de p73 indépendante du protéasome ou un clivage de p73 que nous n'aurions pas détecté. En effet, il a été rapporté que la protéase HtrA2 clive p73 en C-terminal et cette forme tronquée est capable de transactiver *BAX* mais pas *CDKN1A* (Marabese et al., 2008). Néanmoins, comme la régulation de p73 par la nutlin-3a ou le MG132 n'est observée que dans les lignées p53 sauvage, il paraît difficile d'étudier la transcription de *BAX* et *CDKN1A* qui est fortement activée par p53 en réponse à la nutlin-3a.

Aussi pourra t'on étudier HtrA2 dans les lignées, son activation par phosphorylation, ses modalités de liaison à p73. Pour éventuellement mettre en évidence une compétition entre cette protéase et les ubiquitine-ligases associées à p73, en particulier MDM2 en utilisant, là encore, une extinction de MDM2 par siRNA.

Un point critique de nos travaux a été la difficulté à détecter par Western-Blot la protéine p73. Plusieurs anticorps ont été testés. L'anticorps utilisé reconnaît un épitope situé au niveau des 62 premiers acides aminés (formes TAp73). Mais, en raison de difficultés techniques, il n'a pas été possible de distinguer l'expression d'autres isoformes variant dans leur extrémité C-terminales (isoformes beta, gamma, lambda...) de bandes aspécifiques inhérentes à l'anticorps. Seule la bande obtenue aux environ de 73 kDa a pu être authentifiée comme étant la bande TAp73 par extinction en utilisant un siRNA dirigé contre *TP73*. Et les isoformes « c-terminales » restent grandement méconnues et, à ce titre, leur rôle pro-apoptotique et anti-prolifératif peut être sous-estimé (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Les études jusqu'à présent menées semblent néanmoins montrer un rôle pro-apoptotique et anti-prolifératif proche de (ou même identique à) celui des formes alpha (Logotheti et al., 2013). Ouvrir la détection aux autres isoformes TAp73 pourrait permettre de détecter des mécanismes pro-apoptotiques dépendants de p73 sans que la forme TAp73 soit impliquée.

En parallèle de ces isoformes C-Terminales, l'étude isoformes DNp73 constituent la suite logique de ce projet. En effet, en dépit des propriétés anti-apoptotiques de la protéine de 73 kDA (forme TAp73), nous avons retrouvé plusieurs lignée exprimant cette isoforme de façon constitutive sans que les cellules en question ne soient empêchées de poursuivre leur cycle de multiplication ou n'entrent en apoptose. exprimant la protéine. Il y a donc une répression de l'activité pro-apoptotique et anti-proliférative de p73. Les isoformes DNp73 possèdent un effet « dominant négatif » par la formation d'hétéro-tétramères TAp73-DNp73 (Conforti et al., 2012b) et pourraient donc permettre à la cellule de survivre en dépit de leur expression de p73. En ciblant spécifiquement l'exon 2 ou 3', il sera également possible de procéder à l'extinction spécifique des formes TAp73 ou des formes DNp73 par siRNA et d'ainsi réussir à distinguer les effets potentiellement concurrents, en particulier sur la survie cellulaire, la réponse aux agents alkylants et aux inhibiteurs de la méthylation, tout particulièrement en termes de transcription des cibles de p73 telles que *CDKN1A*, *PUMA*, *NOXA*....

D'autant plus que, comme p53, les formes TAp73 sont également capables d'induire la transcription des formes DNp73, en boucles de rétrocontrôle négatif (Kartasheva et al., 2002; Nakagawa et al., 2003). La méthylation du promoteur P2 pourrait alors constituer un verrouillage de la transcription de DNp73.

Nos données montrent que la décitabine peut induire non seulement la transcription des formes TAp73 par déméthylation du promoteur P1, mais aussi des formes DNp73, sans doute par déméthylation du promoteur intrinsèque P2. En fonction des possibilités (MS-PCR, pyroséquençage) nous pourrions étudier la méthylation de l'îlot CpG présent dans ce promoteur intrinsèque et tenter d'évaluer le lien avec le niveau de transcrite des formes DNp73.

Nous avons enfin mis en évidence que la lignée *TP53*^{mut} XG11 exprime fortement la protéine p73 bien que l'expression génique soit identique à celle des lignées *p53*^{wt} exprimant de façon constitutive la protéine p73. Nous avons montré que *TP73* est mutée dans la lignée XG11 sur le codon 626 (l'isoleucine est changée en valine). Cette mutation est prédite délétère mais n'a pas fait l'objet de validation biologique. Il est possible que la forte expression de la protéine soit liée à la présence de la mutation.

En conclusion, si le travail mené nous a confirmé le rôle de la méthylation de l'îlot 302 CpG du promoteur extrinsèque P1 dans la répression transcriptionnelle de *TP73*, nous n'avons pu obtenir un niveau détectable d'expression de la protéine p73 dans les lignées *TP53^{del/mut}*, y compris en combinant un inhibiteur de la méthylation avec des agents alkylants.

Ces agents alkylants ont néanmoins permis d'induire l'expression ou la stabilisation de p73 dans des lignées *TP53^{wt}* uniquement. La dépendance de cette induction à p53 et ses modalités constituent une piste de recherche susceptible de nous éclairer sur les liens étroits qu'entretiennent p53 et p73 dans le grand et complexe maillage de la régulation du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose. Cette connexion sera aussi étudiée en ajoutant plusieurs partenaires, à commencer par MDM2 dont les rôles seraient moins monolithiques que ce qui était considéré jusqu'à présent. De même, ce rôle complexe de MDM2 nous conduit à nous interroger sur la complexité de la régulation protéasomale de p73.

En l'état actuel de nos connaissances, la protéine p73 n'apparaît donc pas comme une alternative aux délétions et mutations de TP53 dans les cellules de myélome.

**ANNEXE - ARTICLE : Decitabine and melphalan fail to reactivate p73
in p53 deficient myeloma cells**

P-S Gillardin et al

Decitabine and melphalan fail to reactivate p73 in p53 deficient myeloma cells

Pierre-Samuel Gillardin¹, Géraldine Descamps¹, Sophie Maiga¹, Benoit Tessoulin¹, Hanane Djamai¹, Benedetta Lucani¹, David Chiron¹, Philippe Moreau², Steven Le Gouill^{1,2}, Martine Amiot¹, Catherine Pellat-Deceunynck^{1*}, Agnès Moreau-Aubry¹

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; pierre.gillardin@etu.uni-nantes.fr; geraldine.descamps@univ-nantes.fr; sophie.maiga@univ-nantes.fr; benoit.tessoulin@chu-nantes.fr; benedetta.lucani@gmail.com; djamai.hanane@gmail.com; david.chiron@univ-nantes.fr; martine.amiot@univ-nantes.fr; catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr; agnes.aubry@univ-nantes.fr

² Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU, Nantes, France. ; philippe.moreau@chu-nantes.fr; steven.legouill@chu-nantes.fr

* Correspondence: catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr; Tel.: +33-228-080-298

Academic Editor: Elie Menu

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: 1) Background: TP53 deficiency remains a major adverse event in Multiple Myeloma despite therapeutic progresses. p73, a member of p53 family, has been poorly studied in myeloma. 2) Methods: using human myeloma cell lines with different TP53 status, we assessed methylation, expression and regulation of TP73. 3) Results: we report that TP73 is silenced by methylation and that decitabine increases its expression, which remains however insufficient for significant protein expression. Alkylating drugs increase expression of TP73 only in TP53wt cells and fail to synergize with decitabine in p53 deficient cells. 4) Conclusions: TP73 does not appear as a promising target for bypassing p53 deficiency in Multiple Myeloma.

Keywords: multiple myeloma; p53; p73; methylation; alkylating drugs

1. Introduction

Multiple Myeloma (MM) is characterized by an important biological heterogeneity related to recurrent chromosomal abnormalities, which occurs early in the disease development at the MGUS stage [1]. The recurrent chromosomal abnormalities are IgH gene translocation with recurrent partners located on chromosomes 4, 6,11,16 and 20 or hyperdiploidy of odd chromosomes. Different prognoses and overall survivals are associated with this first heterogeneity. However, and independently from this heterogeneity, the most adverse prognosis is related to chromosomal deletion of TP53 (with or without mutation) [2, 3]. Thus, as del(17)p is an adverse event whatever the treatment regimen, alternative treatments that bypass or circumvent p53 are needed. For instance, the p53 family member p73 could be of interest as p73 is also able to transactivate pro-apoptotic genes [4, 5]. Moreover, TP73 is rarely mutated but frequently silenced by epigenetic regulations, mainly CpG methylation, in hematological malignancies and in multiple myeloma (MM) [6-9]. TP73 expression might thus be reactivated by epigenetic drugs such as decitabine. To assess the interest in activating p73 in myeloma cells, we studied p73 expression and regulation, TP73 methylation and TP73 sequencing in a large panel of human myeloma cell lines HMCLs with a normal or abnormal TP53 status[10].

2. Results

2.1. TP73 is preferentially constitutively expressed in TP53wt HMCLs

We assessed expression of *TP73* in 22 HMCLs with different *TP53* status, Table 1 [11, 12]. Status of *TP53* and *TP73* was determined by sequencing of RT-PCR products and/or whole exon sequencing. *TP73* was expressed in 4 out of 7 *TP53*^{wt} HMCLs (AMO1, MDN, MM1S, NAN11), in 1 out of 3 *TP53*^{del} HMCLs (JJN3) and in 1 out of 15 *TP53*^{mut} HMCLs (XG11, Figure 1A). p73 expression was confirmed at the protein level for MDN, MM1S, NAN11, JJN3 and XG11 (Figure 1B). Whole exon sequencing showed that only XG11 displayed a missense mutation, I626V, which could explain the high expression level of p73.

2.2 Decitabin decreased *TP73* methylation and induced *TP73* expression

To assess the methylation level in *TP73* promoter, we performed nested methyl-specific PCR (MS-PCR) targeting the CpG island upstream of the gene (Figure 2). PCR-1 was run on bisulfite converted DNA with primers that did not involve CpG. The PCR-1 product was then used for 3 nested PCRs, two respectively specific of unconverted CpG (methylated PCR, M-PCR) and converted CpG (unmethylated PCR, U-PCR) sequence, and one quantifying the PCR-1 product (PCR-Q, Figure 2). PCRs were run in HMCLs treated or not with decitabine to assess the *TP73* methylation status (Figure 3A). In parallel, we measured the expression level of *TP73* by Q-PCR (Figure 3B). In JIM3, KMS12PE and XG5, *TP73* was found methylated and decitabine induced a decrease in M-PCR and an increase in U-PCR, which correlated with an increase in *TP73* expression. However, despite the increase in *TP73* expression, we could not detect any protein. Because anti-p73 Ab was directed against the N terminal part of the protein and could thus not detect $\Delta Np73$, we performed 3 RT-PCRs to assess the total *TP73* expression (exons 7-10), the full-length *TAp73* (exons 2-6) and the $\Delta Np73$ (exons 3'-6) isoforms. The *TAp73* isoform was increased in the 3 *TP53*^{mut} HMCLs, although in KMS12PE the $\Delta Np73$ isoform was the main increased isoform (Figure 3C). The data suggested that the lack of p73 detection by western blotting was not related to the lack of *TAp73* transactivation, but rather to a weak transactivation.

2.3 Melphalan and cisplatin induced *TP73* expression in *TP53*^{wt} HMCLs but not in decitabine-treated *TP53*^{mut} HMCLs

To further study *TP73* regulation, we treated 4 HMCLs that constitutively expressed p73 with alkylating drugs, melphalan and cisplatin and determined by RT-PCR and western blotting the regulation of *TP73* and p73. Regulation of p53 expression was assessed as a control of drug response [13]. Alkylating drugs increased the expression of the p73 full-length isoform in the *TP53*^{wt} MDN, MM1S and NAN11 HMCLs but not in *TP53*^{del} JJN3 HMCL (Figure 3D). MDN also expressed the $\Delta Np73$ isoform that was slightly increased by the drugs. By western blotting, we confirmed that melphalan and cisplatin similarly increased p73 expression in the 3 *TP53*^{wt} HMCLs but failed to increase p73 expression in *TP53*^{del} JJN3 (Figure 3E). As expected, p53 expression was increased by both drugs in the *TP53*^{wt} MDN, MM1S and NAN11 HMCLs but not in *TP53*^{del} JJN3 cells [13].

We then assessed whether melphalan could increase expression of p73 in decitabine-treated *TP53*^{mut} HMCLs. We selected the 3 HMCLs that displayed a strong increase in *TP73* expression upon decitabine treatment i.e., JIM3, KMS12PE and XG5 (Figure 3B). As shown in Figure 3F, alkylating drugs failed to increase any p73 expression that remained undetectable in the 3 *TP53*^{mut} cell lines.

3. Discussion

In myeloma, regulation of p73 expression has not been deeply investigated yet. For instance, *TP73* expression has been shown to be induced by PRIMA-1Met in several HMCLs including JJN3 in which p73 was reported to be partly involved in PRIMA-1Met-induced cell death [9, 14]. In hematological malignancies, *TP73* that does not display frequent mutations is known to be silenced by CpG methylation [6]. Indeed, whole exon sequencing showed that only 1 HMCLs (XG11) expressed a mutated p73 protein. We thus assessed *TP73* methylation and regulation in a large number of HMCLs. Our results showed that *TP73* is mainly silenced by methylation and that the methylation inhibitor decitabine reversed the methylation-mediated silencing. However, the *TP73* expression remained too

weak for allowing a detectable p73 expression by western blotting. We found that p73 was constitutively expressed in 6 HMCLs: 4 expressed a wildtype p53 protein (MDN, MM1S, NAN11, XG10), 1 was lacking p53 expression (JJN3) and the last was expressing a mutant p53 protein (XG11). Of note, p73 was overexpressed in XG11 despite a moderate *TP73* expression suggesting a stabilization/lack of degradation of the protein. In 3 out of 4 HMCLs that constitutively expressed p73 and displayed an unmethylated profile of CpG, alkylating drugs increased both *TP73* and p73 expression: this regulation seemed to be restricted to *TP53*^{wt} HMCLs as it did not occur in the *TP53*^{del} JJN3 HMCL. Alkylating drugs were also unable to increase p73 expression in the 3 *TP53*^{mut} HMCLs that were pretreated with decitabine. In summary, decitabine induced expression of *TP73* that remained insufficient for significant p73 expression. *TP73* does not appear as a promising target for bypassing p53 deficiency in myeloma cells.

4. Materials and Methods

4.1 HMCLs and reagents

HMCLs were previously described [10, 12, 15]. Unmethylated/methylated control DNAs, and the bisulfite conversion kit were purchased from Active Motif (La Hulpe, Belgium). Anti-p73 A300-126A and anti-p53 DO-1 Abs were purchased from Bethyl Laboratories (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France), respectively. Anti-actin was purchased from Millipore. Cisplatin and melphalan were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Q-PCR probes were purchased from Taqman (Thermofisher, Saint-Herblain, France).

4.2 Bisulfite treatment, methylation specific PCRs and RT-PCR

DNAs were treated with bisulfite as indicated by the supplier. Methylation specific PCRs (M-PCR, U-PCR) and quantification PCR (PCR Q) were performed after a first amplification (PCR1). PCR1, M-PCR, U-PCR and PCR Q were run with 25, 17, 20 and 19 cycles, respectively. The following primers were used PCR-1 GTTTTGGGTTTTGGGAGTTGAGAG and ACCACCCACTTCTCCTATAAAA (874 pb); M-PCR GGGGTATTATGGGTAGAGGATATC and ACATACTAAACGAATTCCGAACGACTC (109 bp); U-PCR GGGTATTATGGGTAGAGGATATT and ACATACTAAACAAATTCCAAACAACCTCTC (112 bp); PCR Q TAAATAGTGGGTGAGTTATGAAGATGT and TACACCAAACCCTAACTAAAAAACC (285 bp). Extracted RNAs were reversed transcribed and amplified as previously described [12].

For *TP73* RT-PCR assays, the following primers were used: *TAp73* ex2-6 CACCACGTTTGAGCACCTCT and AGATTATTGCCTTCCACGCG (630 pb); *TP73* ex7-10 GACGGAATTCACCACCATCCT and CCAGGCTCTCTTCAGCTTC (389 pb); $\Delta Np73$ ex3'-6 CCATGCTGTACGTCGGTGAC and CCAAATCCTTCTCCCTATCC (519 pb). For *TP73* Q-PCR assays, the *TP73* (Hs01056230_m1) and *RPL37A* (Hs01102345_m1) probes were used.

4.3 Western blotting

Expression of p53 and p73 was determined by western blotting as previously described [12]. A minimum of 80µg of proteins was loaded in each lane.

Acknowledgments: The work was supported by a grant from Ligue Grand-Ouest Contre Le Cancer and by Actions Cancer 44.

Author Contributions: DC, PM, SLG, MA, CPD and AMA designed research; PSG, GD, SM, BT, HD and BL acquired data; PSG, CPD and AMA analyzed data; CPD and AMA wrote the paper; all authors approved the final version of the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

HMCL Human Myeloma Cell Line

MM Multiple Myeloma
MS-PCR Methylation-specific PCR

References

1. Avet-Loiseau, H.; Attal, M.; Campion, L.; Caillot, D.; Hulin, C.; Marit, G.; Stoppa, A.M.; Voillat, L.; Wetterwald, M.; Pegourie, B.; Voog, E.; Tiab, M.; Banos, A.; Jaubert, J.; Bouscary, D.; Macro, M.; Kolb, B.; Traulle, C.; Mathiot, C.; Magrangeas, F.; Minvielle, S.; Facon, T.; Moreau, P. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival, *J Clin Oncol*, 30 (2012) 1949-1952.
2. B. Tessoulin, B.; Eveillard, E.; Lok, A.; Chiron, D.; Moreau, P.; Amiot, M.; Moreau-Aubry, A.; Le Gouill, S.; Pellat-Deceunynck, C. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev* **2017**, 31, 251-259, 10.1016/j.blre.2017.03.001.
3. Weinhold, N.; Ashby, C.; Rasche, L.; Chavan, S.S.; Stein, C.; Stephens, O.W.; Tytarenko, R.; Bauer, M.A.; Meissner, T.; Deshpande, S.; Patel, P.H.; Buzder, T.; Molnar, G.; Peterson, E.A.; van Rhee, F.; Zangari, M.; Thanendrarajan, S.; Schinke, C.; Tian, E.; Epstein, J.; Barlogie, B.; Davies, F.E.; Heuck, C.J.; Walker, B.A.; Morgan, G.J. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* **2016**, 128, 1735-1744, 10.1182/blood-2016-06-723007.
4. Soldevilla, B.; Millan, C.S.; Bonilla, F.; Dominguez, G. The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes Chromosomes Cancer* **2013**, 52, 989-1006, 10.1002/gcc.22095.
5. Zawacka-Pankau, J.; KostECKA, A.; Sznarkowska, A.; Hedstrom, E.; Kawiak, A. p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach. *Cell Cycle* **2010**, 9, 720-728.
6. Alexandrova, E.M.; Moll, U.M. Role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies, *Leuk Lymphoma* **2012**, 53, 2116-2129, 10.3109/10428194.2012.684348.
7. Kawano, S.; Miller, C.W.; Gombart, A.F.; Bartram, C.R.; Matsuo, Y.; Asou, H.; Sakashita, A.; Said, J.; Tatsumi, E.; Koeffler, H.P. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation, *Blood* **1999**, 94, 1113-1120.
8. A.M. Maas, A.C. Bretz, E. Mack, T. Stiewe, Targeting p73 in cancer, *Cancer Lett*, 332 (2013) 229-236.
9. Teoh, P.J.; Bi, C.; Sintosebastian, C.; Tay, L.S.; Fonseca, R.; Chng W.J. PRIMA-1 targets the vulnerability of multiple myeloma of deregulated protein homeostasis through the perturbation of ER stress via p73 demethylation, *Oncotarget* **2016**, 7, 61806-61819, 10.18632/oncotarget.11241.
10. Moreaux, J.; Klein, B.; Bataille, R.; Descamps, G.; Maiga, S.; Hose, D.; Goldschmidt, H.; Jauch, A.; Reme, T.; Jourdan, M.; Amiot, M.; Pellat-Deceunynck, C. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* **2011**, 96, 574-582, 10.3324/haematol.2010.033456.
11. Surget, S.; Descamps, G.; Brosseau, C.; Normant, V.; Maiga, S.; Gomez-Bougie, P.; Gouy-Colin, N.; Godon, C.; Bene, M.C.; Moreau, P.; Le Gouill, S.; Amiot, M.; Pellat-Deceunynck, C. RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway. *BMC Cancer* **2014**, 14, 437, 10.1186/1471-2407-14-437
12. B. Tessoulin, B.; Descamps, G.; Moreau, P.; Maiga, S.; Lode, L.; Godon, C.; Marionneau-Lambot, S.; Oullier, T.; Le Gouill, S.; Amiot, M.; Pellat-Deceunynck, C. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* **2014**, 124, 1626-1636, 10.1182/blood-2014-01-548800.
13. Surget, S.; Lemieux-Blanchard, E.; Maiga, S.; Descamps, G.; Le Gouill, S.; Moreau, P.; Amiot, M.; Pellat-Deceunynck, C. Bendamustine and melphalan kill myeloma cells similarly through reactive oxygen species production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other, *Leuk Lymphoma* **2014**, 55, 2165-2173, 10.3109/10428194.2013.871277.
14. Saha, M.N.; Jiang, H.; Yang, Y.; Reece, D.; Chang H. PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Mol Cancer Ther* **2013**, 12, 2331-2341, 10.1158/1535-7163.MCT-12-1166.
15. Surget, S.; Chiron, D.; Gomez-Bougie, P.; Descamps, G.; Menoret, E.; Bataille, R.; Moreau, P.; Le Gouill, S.; Amiot, M.; Pellat-Deceunynck, C. Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells, *Cancer Res* **2012**, 72, pp. 4562-4573, 10.1158/0008-5472.CAN-12-0487.

© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the



terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Table 1. HMCL characteristics

HMCL	Translocation	TP53 status and expression		TP73 status and expression		
		TP53	p53	TP73	Q-PCR	p73
AMO1	unknown	wt	+	wt	+	-
MDN	(11;14)	wt	+	wt	+	+
MM1S	(14;16)	wt	+	wt	+	+
NAN9	(4;14)	wt	+	wt	-	-
NAN11	(14;16)	wt	+	wt	+	+
XG6	(16;22)	wt	+	wt	+/-	-
XG7	(4;14)	wt	+	wt	+/-	nd
JJN3	(14;16)	deletion	-	wt	+	+
KMS11	(4;14)	deletion	-	wt	-	-
NAN8	(4;14)	disrupted ¹	-	wt	-	-
JIM3	(4;14)	R273C	+	wt	-	-
Karpas620	(11;14)	C135Y	+	wt	-	nd
KMM1	(6;14)	C135F	+	A211S	-	nd
KMS12PE	(11;14)	R337L	+	wt	-	-
LP1	(4;14)	E286K	+	wt	-	-
L363	(20;22)	S261T ²	-	wt	-	-
NAN1	(14;16)	E180*	-	wt	-	nd
NAN6	(14;16)	Indel ³	+ ⁵	wt	-	nd
NAN7	(11;14)	Indel ⁴	-	wt	-	nd
OPM2	(4;14)	R175H	+	wt	-	-
SKMM2	(11;14)	K132N	+	wt	-	nd
XG11	(11;14)	C135Y	+	I626V	+	+
XG1	(11;14)	Y126N	+	wt	+/-	nd
XG2	unknown	C176Y	+	wt	+/-	nd
XG5	(11;14)	R282W	+	wt	-	-

nd : not done; 1 disrupted by amplification of exons 1,2,3,4,5 and 6; 2 lack of intron 7 splicing; 3 deletion of exons 7, 8 and 9; 4 deletion of exon 11; 5 truncated form

Legends to figures

Figure 1. Constitutive *TP73* expression was mainly restricted to *TP53^{wt}* HMCLs

A. Constitutive expression of *TP73* was mainly restricted to *TP53^{wt}* HMCLs. Expression was assessed by Q-PCR in 25 HMCLs. The histograms represent the mean \pm SEM of 3 experiments (SEM fall within the symbols).

B. Constitutive expression of p73 was mainly restricted to *TP73⁺* HMCLs. Expression of p73 and p53 was assessed by western blotting with A300-126A p73 Abs and DO-1 p53 mAb.

Figure 2. Targeting of CpG islands in *TP73*

Upper and lower sequences represent the native and bisulfite converted *TP73* DNA sequence, respectively. The CpG are indicated with "+". Primers used for PCR1, M-PCR (Methylated-PCR), U-PCR (Unmethylated methylation) and PCR Q (Quantitative PCR) are indicated.

Figure 3. Cisplatin or melphalan induced the expression of *TAp73* isoform in *TP53^{wt}* HMCLs but not in *TP53^{abn}* HMCLs.

A. *TP73* is mainly methylated in *TP53^{mut}* HMCLs. MS-PCRs were performed after bisulfite conversion of DNA extracted from HMCLs treated or not with decitabine (5 μ M, 72 hours). M and U indicated methylated and unmethylated control DNAs.

B. Decitabine induced *TP73* expression. *TP73* expression was assessed by Q-PCR as described in the legend of Figure 1.

C. Decitabine induced expression of several *TP73* isoforms. RT-PCRs were run on cDNAs from control or decitabine-treated HMCLs (5 μ M, 72 hours), as indicated in the figure.

D. Cisplatin or melphalan increased the expression of *TAp73* isoform. RT-PCR expression of *TAp73* and $\Delta Np73$ was performed after a 16h-treatment with melphalan or cisplatin. *TP53^{wt}* HMCLs were treated with 7 μ M of melphalan or cisplatin, JJN3 cells were treated with 30 μ M of melphalan or 20 μ M of cisplatin.

E. Cisplatin or melphalan increased the expression p73 in *TP53^{wt}* HMCLs. Western blots were performed after an overnight treatment with melphalan or cisplatin as described in A. Right part represents the quantification of p73 and p53 over actin expression from 2 independent experiments (mean \pm SEM).

F. Decitabine and melphalan or cisplatin failed to induce p73 expression in *TP53^{mut}* HMCLs. HMCLs were treated 72 hours with decitabine (5 μ M) prior to an overnight treatment with 45 μ M of melphalan or 55 μ M of cisplatin. JJN3 proteins were loaded as a control of p73 expression.

Figure 1

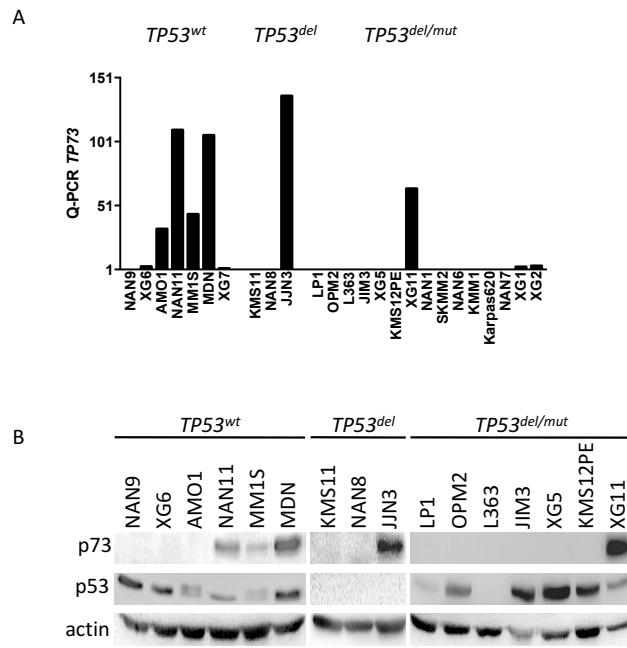
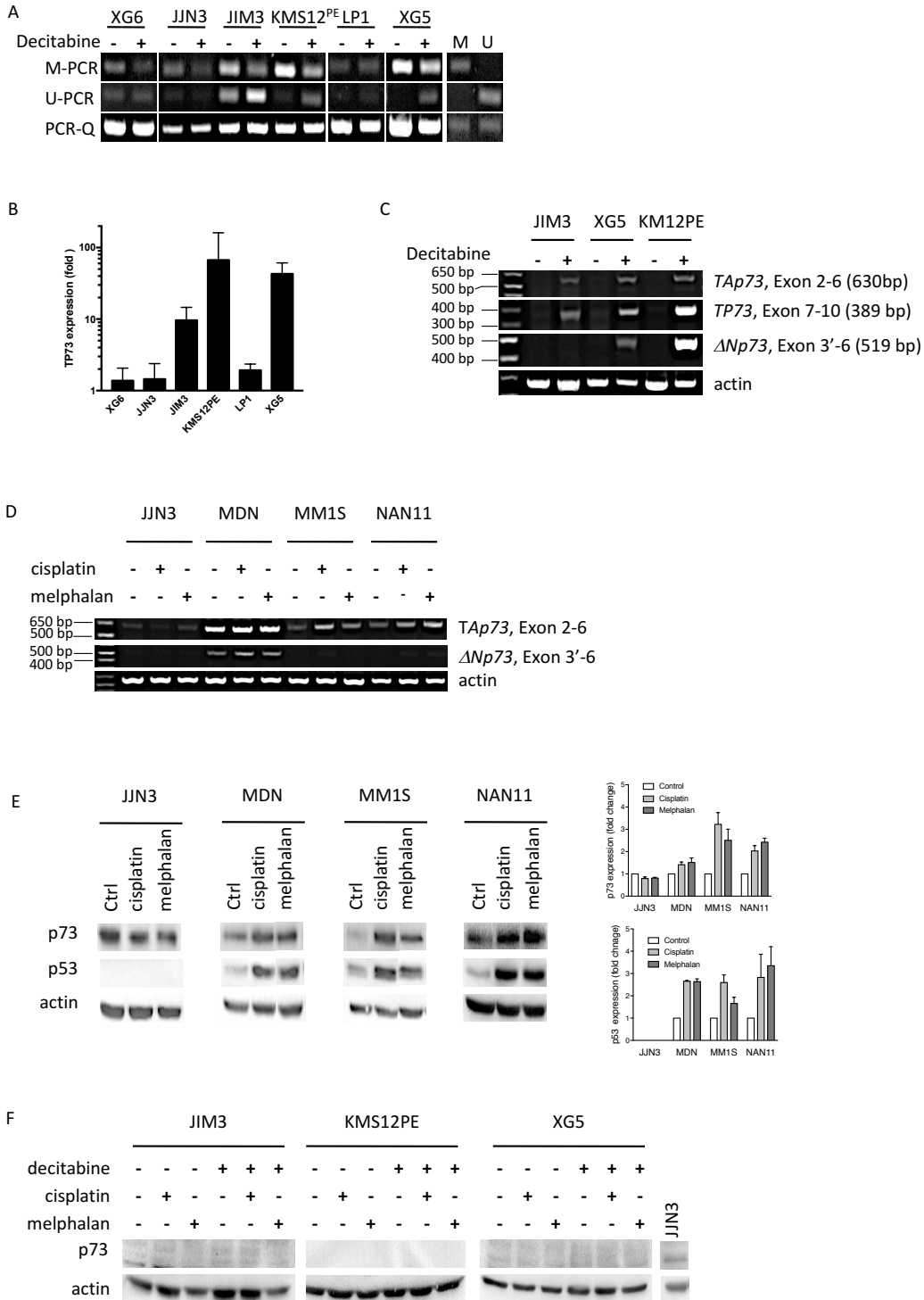


Figure 3



BIBLIOGRAPHIE

- Affer, M., Chesi, M., Chen, W.-D.G., Keats, J.J., Demchenko, Y.N., Roschke, A.V., Van Wier, S., Fonseca, R., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2014). Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* 28, 1725–1735.
- Al-Bahlani, S., Fraser, M., Wong, A.Y.C., Sayan, B.S., Bergeron, R., Melino, G., and Tsang, B.K. (2011). P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism. *Oncogene* 30, 4219–4230.
- Albarracin, F., and Fonseca, R. (2011). Plasma cell leukemia. *Blood Rev.* 25, 107–112.
- Amatya, V.J., Naumann, U., Weller, M., and Ohgaki, H. (2005). TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 178–184.
- Anderson, K.C. (2016). Progress and Paradigms in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 5419–5427.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115–130.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Campion, L., Caillot, D., Hulin, C., Marit, G., Stoppa, A.-M., Voillat, L., Wetterwald, M., Pegourie, B., et al. (2012). Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 1949–1952.
- Bakkus, M.H., Heirman, C., Van Riet, I., Van Camp, B., and Thielemans, K. (1992). Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 80, 2326–2335.
- Bálint, E., Bates, S., and Vousden, K.H. (1999). Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* 18, 3923–3929.
- Bataille, R., Jégo, G., Robillard, N., Barillé-Nion, S., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2006). The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91, 1234–1240.
- Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000935.
- Benetatos, L., Dasoula, A., Hatzimichael, E., Georgiou, I., Syrrou, M., and Bourantas, K.L. (2008). Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma* 8, 171–175.

- Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2003). Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol. Rev.* *194*, 96–104.
- Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., and Shaughnessy, J. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* *106*, 296–303.
- Billadeau, D., Jelinek, D.F., Shah, N., LeBien, T.W., and Van Ness, B. (1995). Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res.* *55*, 3640–3646.
- Billadeau, D., Liu, P., Jelinek, D., Shah, N., LeBien, T.W., and Van Ness, B. (1997). Activating mutations in the N- and K-ras oncogenes differentially affect the growth properties of the IL-6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res.* *57*, 2268–2275.
- Bitomsky, N., and Hofmann, T.G. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J.* *276*, 6074–6083.
- Borthakur, G., Ahdab, S.E., Ravandi, F., Faderl, S., Ferrajoli, A., Newman, B., Issa, J.-P., and Kantarjian, H. (2008). Activity of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome previously treated with azacitidine. *Leuk. Lymphoma* *49*, 690–695.
- Bourdon, J.-C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br. J. Cancer* *97*, 277–282.
- Boyd, K.D., Ross, F.M., Tapper, W.J., Chiecchio, L., Dagrada, G., Konn, Z.J., Gonzalez, D., Walker, B.A., Hockley, S.L., Wardell, C.P., et al. (2011). The clinical impact and molecular biology of del(17p) in multiple myeloma treated with conventional or thalidomide-based therapy. *Genes. Chromosomes Cancer* *50*, 765–774.
- Brenner, H., Gondos, A., and Pulte, D. (2008). Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* *111*, 2521–2526.
- Cahu, J., Bustany, S., and Sola, B. (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death Dis.* *3*, e446.
- Carrasco, D.R., Tonon, G., Huang, Y., Zhang, Y., Sinha, R., Feng, B., Stewart, J.P., Zhan, F., Khatri, D., Protopopova, M., et al. (2006). High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* *9*, 313–325.
- Chesi, M., Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., et al. (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* *13*, 167–180.
- Chiecchio, L., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Stockley, D.M., Smith, A.G., Orchard, K.H., Cross, N.C.P., Harrison, C.J., Ross, F.M., and UK Myeloma Forum (2009). Loss of 1p and rearrangement of MYC are associated with progression of smouldering myeloma to myeloma: sequential analysis of a single case. *Haematologica* *94*, 1024–1028.

- Chim, C.S., Kwong, Y.L., Fung, T.K., and Liang, R. (2004). Methylation profiling in multiple myeloma. *Leuk. Res.* 28, 379–385.
- Chiron, D., Surget, S., Maïga, S., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2012). The peripheral CD138+ population but not the CD138- population contains myeloma clonogenic cells in plasma cell leukaemia patients. *Br. J. Haematol.* 156, 679–683.
- Chretien, M.-L., Corre, J., Lauwers-Cances, V., Magrangeas, F., Cleynen, A., Yon, E., Hulin, C., Leleu, X., Orsini-Piocelle, F., Blade, J.-S., et al. (2015). Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood* 126, 2713–2719.
- Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495.
- Conforti, F., Sayan, A.E., Sreekumar, R., and Sayan, B.S. (2012a). Regulation of p73 activity by post-translational modifications. *Cell Death Dis.* 3, e285.
- Conforti, F., Yang, A.L., Agostini, M., Rufini, A., Tucci, P., Nicklison-Chirou, M.V., Grespi, F., Velletri, T., Knight, R.A., Melino, G., et al. (2012b). Relative expression of TAp73 and Δ Np73 isoforms. *Aging* 4, 202–205.
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., et al. (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol. Cell* 9, 175–186.
- Courtois, S., Caron de Fromental, C., and Hainaut, P. (2004). p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene* 23, 631–638.
- De Veirman, K., Van Ginderachter, J.A., Lub, S., De Beule, N., Thielemans, K., Bautmans, I., Oyajobi, B.O., De Bruyne, E., Menu, E., Lemaire, M., et al. (2015). Multiple myeloma induces Mcl-1 expression and survival of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 6, 10532–10547.
- Demchenko, Y.N., Glebov, O.K., Zingone, A., Keats, J.J., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2010). Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 115, 3541–3552.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
- Edwards, J.R., Yarychivska, O., Boulard, M., and Bestor, T.H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin* 10, 23.
- Farnebo, M., Bykov, V.J.N., and Wiman, K.G. (2010). The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 85–89.

- Fischer, M., Steiner, L., and Engeland, K. (2014). The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 3037–3058.
- Fonseca, R., Bailey, R.J., Ahmann, G.J., Rajkumar, S.V., Hoyer, J.D., Lust, J.A., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Greipp, P.R., and Dewald, G.W. (2002). Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 100, 1417–1424.
- 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., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., et al. (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23, 2210–2221.
- Fonseca, R., Monge, J., and Dimopoulos, M.A. (2014). Staging and prognostication of multiple myeloma. *Expert Rev. Hematol.* 7, 21–31.
- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 930–939.
- Galm, O., Wilop, S., Reichelt, J., Jost, E., Gehbauer, G., Herman, J.G., and Osieka, R. (2004). DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 18, 1687–1692.
- Garcia-Manero, G., Daniel, J., Smith, T.L., Kornblau, S.M., Lee, M.-S., Kantarjian, H.M., and Issa, J.-P.J. (2002). DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 2217–2224.
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489–492.
- Geli, J., Kiss, N., Karimi, M., Lee, J.-J., Bäckdahl, M., Ekström, T.J., and Larsson, C. (2008). Global and regional CpG methylation in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas: association to malignant behavior. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2551–2559.
- Gomez, L.C., Sottile, M.L., Guerrero-Gimenez, M.E., Zoppino, F.C.M., Redondo, A.L., Gago, F.E., Orozco, J.I., Tello, O.M., Roqué, M., Nadin, S.B., et al. (2017). TP73 DNA methylation and upregulation of Δ Np73 are associated with an adverse prognosis in breast cancer. *J. Clin. Pathol.*
- Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W.G., Levrero, M., and Wang, J.Y. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399, 806–809.

Gonsalves, W.I., Rajkumar, S.V., Go, R.S., Dispenzieri, A., Gupta, V., Singh, P.P., Buadi, F.K., Lacy, M.Q., Kapoor, P., Dingli, D., et al. (2014). Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis. *Blood* *124*, 907–912.

Greco, C., D'Agnano, I., Vitelli, G., Vona, R., Marino, M., Mottolese, M., Zuppi, C., Capoluongo, E., and Ameglio, F. (2006). c-MYC deregulation is involved in melphalan resistance of multiple myeloma: role of PDGF-BB. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *19*, 67–79.

Grigoriu, A., Ferreira, J.C., Choufani, S., Baczyk, D., Kingdom, J., and Weksberg, R. (2011). Cell specific patterns of methylation in the human placenta. *Epigenetics* *6*, 368–379.

Hallek, M., Bergsagel, P.L., and Anderson, K.C. (1998). Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* *91*, 3–21.

Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J.R., Hollmig, K., Zangarri, M., Pineda-Roman, M., van Rhee, F., et al. (2006). Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* *108*, 1724–1732.

Hatzimichael, E., Dasoula, A., Kounnis, V., Benetatos, L., Lo Nigro, C., Lattanzio, L., Papoudou-Bai, A., Dranitsaris, G., Briasoulis, E., and Crook, T. (2012). Bcl2-interacting killer CpG methylation in multiple myeloma: a potential predictor of relapsed/refractory disease with therapeutic implications. *Leuk. Lymphoma* *53*, 1709–1713.

Hebraud, B., Leleu, X., Lauwers-Cances, V., Roussel, M., Caillot, D., Marit, G., Karlin, L., Hulin, C., Gentil, C., Guilhot, F., et al. (2014). Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia* *28*, 675–679.

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.

Heller, G., Schmidt, W.M., Ziegler, B., Holzer, S., Müllauer, L., Bilban, M., Zielinski, C.C., Drach, J., and Zöchbauer-Müller, S. (2008). Genome-wide transcriptional response to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin a in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* *68*, 44–54.

Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Anderson, K.C. (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* *104*, 607–618.

Hoang, B., Zhu, L., Shi, Y., Frost, P., Yan, H., Sharma, S., Sharma, S., Goodglick, L., Dubinett, S., and Lichtenstein, A. (2006). Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood* *107*, 4484–4490.

Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* *26*, 1306–1316.

- Hu, L., Shi, Y., Hsu, J., Gera, J., Van Ness, B., and Lichtenstein, A. (2003). Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood* *101*, 3126–3135.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Staudt, L.M. (2004a). Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* *5*, 191–199.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Staudt, L.M. (2004b). Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* *5*, 191–199.
- Hurt, E.M., Thomas, S.B., Peng, B., and Farrar, W.L. (2006). Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 1154–1160.
- Izzi, B., Binder, A.M., and Michels, K.B. (2014). Pyrosequencing Evaluation of Widely Available Bisulfite Conversion Methods: Considerations for Application. *Med. Epigenetics* *2*, 28–36.
- Jego, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (2001). Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* *97*, 1817–1822.
- Jha, A.K., Nikbakht, M., Jain, V., Sehgal, A., Capalash, N., and Kaur, J. (2012). Promoter hypermethylation of p73 and p53 genes in cervical cancer patients among north Indian population. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 9145–9157.
- Jin, B., and Robertson, K.D. (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *754*, 3–29.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000919.
- Johnsen, H.E., Bøgsted, M., Schmitz, A., Bødker, J.S., El-Galaly, T.C., Johansen, P., Valent, P., Zojer, N., Van Valckenborgh, E., Vanderkerken, K., et al. (2016). The myeloma stem cell concept, revisited: from phenomenology to operational terms. *Haematologica* *101*, 1451–1459.
- Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J.F., Wijdenes, J., Brochier, J., and Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br. J. Haematol.* *100*, 637–646.
- Juan, L.J., Shia, W.J., Chen, M.H., Yang, W.M., Seto, E., Lin, Y.S., and Wu, C.W. (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 20436–20443.

- Kaiser, M.F., Johnson, D.C., Wu, P., Walker, B.A., Brioli, A., Mirabella, F., Wardell, C.P., Melchor, L., Davies, F.E., and Morgan, G.J. (2013). Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood* *122*, 219–226.
- Kartasheva, N.N., Contente, A., Lenz-Stöppler, C., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* *21*, 4715–4727.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.-J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.-X., Sebag, M., et al. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* *12*, 131–144.
- Kim, S.Y., Min, H.J., Park, H.K., Oh, B., Kim, T.Y., She, C.J., Hwang, S.M., Kim, M., Kim, H.K., Kim, I., et al. (2011). Increased copy number of the interleukin-6 receptor gene is associated with adverse survival in multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *17*, 810–820.
- Kiss, N.B., Kogner, P., Johnsen, J.I., Martinsson, T., Larsson, C., and Geli, J. (2012). Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas. *BMC Med. Genet.* *13*, 83.
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., and Cedar, H. (2016). DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* *76*, 3446–3450.
- Kubo, N., Okoshi, R., Nakashima, K., Shimozato, O., Nakagawara, A., and Ozaki, T. (2010a). MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *403*, 405–411.
- Kubo, N., Okoshi, R., Nakashima, K., Shimozato, O., Nakagawara, A., and Ozaki, T. (2010b). MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *403*, 405–411.
- Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 175–187.
- Kumar, S.K., Rajkumar, S.V., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Zeldenrust, S.R., Dingli, D., Russell, S.J., Lust, J.A., et al. (2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* *111*, 2516–2520.
- Kuo, A.J., Cheung, P., Chen, K., Zee, B.M., Kioi, M., Lauring, J., Xi, Y., Park, B.H., Shi, X., Garcia, B.A., et al. (2011). NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Mol. Cell* *44*, 609–620.
- Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., et al. (2007). Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* *356*, 2582–2590.

- Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., et al. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* *113*, 5412–5417.
- Lau, L.M.S., Nugent, J.K., Zhao, X., and Irwin, M.S. (2008). HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene* *27*, 997–1003.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* *13*, 941–950.
- Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmenjaud, E., Sotto, J.J., and Callanan, M. (2001). Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* *32*, 250–264.
- Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ.* *17*, 86–92.
- Li, F., Hu, L., Xu, Y., Li, Z., Yi, S., Gu, Z., Li, C., Hao, M., Ru, K., Zhan, F., et al. (2016). Identification of characteristic and prognostic values of chromosome 1p abnormality by multi-gene fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma. *Leukemia* *30*, 1197–1201.
- Liu, G., and Chen, X. (2005). The C-terminal sterile alpha motif and the extreme C terminus regulate the transcriptional activity of the alpha isoform of p73. *J. Biol. Chem.* *280*, 20111–20119.
- Lodé, L., Eveillard, M., Trichet, V., Soussi, T., Wuillème, S., Richebourg, S., Magrangeas, F., Ifrah, N., Campion, L., Traullé, C., et al. (2010). Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* *95*, 1973–1976.
- Logotheti, S., Pavlopoulou, A., Galtsidis, S., Vojtesek, B., and Zoumpourlis, V. (2013). Functions, divergence and clinical value of TAp73 isoforms in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *32*, 511–534.
- Lomas, J., Amiñoso, C., Gonzalez-Gomez, P., Eva Alonso, M., Arjona, D., Lopez-Marin, I., de Campos, J.M., Isla, A., Vaquero, J., Gutierrez, M., et al. (2004). Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *148*, 148–151.
- Maas, A.-M., Bretz, A.C., Mack, E., and Stiewe, T. (2013). Targeting p73 in cancer. *Cancer Lett.* *332*, 229–236.
- Maïga, S., Brosseau, C., Descamps, G., Dousset, C., Gomez-Bougie, P., Chiron, D., Ménoret, E., Kervoelen, C., Vié, H., Cesbron, A., et al. (2015). A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *87*, 285–288.
- Malik, P., and Cashen, A.F. (2014). Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Cancer Manag. Res.* *6*, 53–61.

- Mancini, F., Di Conza, G., Pellegrino, M., Rinaldo, C., Prodosmo, A., Giglio, S., D'Agnano, I., Florenzano, F., Felicioni, L., Buttitta, F., et al. (2009). MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* *28*, 1926–1939.
- Marabese, M., Mazzeletti, M., Vikhanskaya, F., and Broggin, M. (2008). HtrA2 enhances the apoptotic functions of p73 on bax. *Cell Death Differ.* *15*, 849–858.
- Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., and Moll, U.M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J.* *26*, 923–934.
- Martínez-Baños, D., Sánchez-Hernández, B., Jiménez, G., Barrera-Lumbreras, G., and Barrales-Benítez, O. (2017). Global methylation and promoter-specific methylation of the P16, SOCS-1, E-cadherin, P73 and SHP-1 genes and their expression in patients with multiple myeloma during active disease and remission. *Exp. Ther. Med.* *13*, 2442–2450.
- Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Min, D.-J., Sweet, S.M.M., Thomas, P.M., Zamdborg, L., Heffner, A., Will, C., Lamy, L., Staudt, L.M., et al. (2011). The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* *117*, 211–220.
- Meek, D.W., and Knippschild, U. (2003). Posttranslational modification of MDM2. *Mol. Cancer Res. MCR* *1*, 1017–1026.
- Million, K., Horvilleur, E., Goldschneider, D., Agina, M., Raguénez, G., Tournier, F., Bénard, J., and Douc-Rasy, S. (2006). Differential regulation of p73 variants in response to cisplatin treatment in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* *29*, 147–154.
- Min, D.-J., Ezponda, T., Kim, M.K., Will, C.M., Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K.S., and Licht, J.D. (2013a). MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia* *27*, 686–694.
- Min, D.-J., Ezponda, T., Kim, M.K., Will, C.M., Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K.S., and Licht, J.D. (2013b). MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia* *27*, 686–694.
- Mirabella, F., Wu, P., Wardell, C.P., Kaiser, M.F., Walker, B.A., Johnson, D.C., and Morgan, G.J. (2013). MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma. *Blood Cancer J.* *3*, e114.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 631–636.
- Moreaux, J., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maïga, S., Hose, D., Goldschmidt, H., Jauch, A., Rème, T., Jourdan, M., et al. (2011). A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* *96*, 574–582.

Moreaux, J., Rème, T., Leonard, W., Veyrune, J.-L., Requirand, G., Goldschmidt, H., Hose, D., and Klein, B. (2012). Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 2685–2692.

Moreaux, J., Bruyer, A., Veyrune, J.-L., Goldschmidt, H., Hose, D., and Klein, B. (2014). DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br. J. Haematol.* *164*, 613–616.

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

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* *15*, 2–8.
Mulligan, G., Lichter, D.I., Di Bacco, A., Blakemore, S.J., Berger, A., Koenig, E., Bernard, H., Trepicchio, W., Li, B., Neuwirth, R., et al. (2014). Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood* *123*, 632–639.

Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.-C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* *13*, 962–972.

Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Hayashi, S., Hosoda, M., Todo, S., and Nakagawara, A. (2003). Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* *197*, 105–109.

Nakano, J., Huang, C.-L., Liu, D., Ueno, M., Sumitomo, S., and Yokomise, H. (2005). Survivin gene expression is negatively regulated by the p53 tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* *27*, 1215–1221.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.

Park, G.B., Kim, Y.-S., Kim, D., Kim, S., Lee, H.-K., Cho, D.-H., Lee, W.J., and Hur, D.Y. (2013). Melphalan-induced apoptosis of EBV-transformed B cells through upregulation of TAp73 and XAF1 and nuclear import of XPA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 6281–6291.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.

Pluta, A., Nyman, U., Joseph, B., Robak, T., Zhivotovsky, B., and Smolewski, P. (2006). The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia* *20*, 757–766.

Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R.D., and Roberts, R.J. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* *274*, 33002–33010.

Raj, K., and Mufti, G.J. (2006). Azacytidine (Vidaza(R)) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2, 377–388.

Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastiris, E., Richardson, P., et al. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15, e538-548.

Rajkumar, S.V., Landgren, O., and Mateos, M.-V. (2015). Smoldering multiple myeloma. *Blood* 125, 3069–3075.

Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H.E., and Dahl, I.M.S. (2005). Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* 105, 317–323.

Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdicikova, L., Brooimans, R.A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., et al. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 93, 431–438.

Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y.-C., Vousden, K.H., Cesareni, G., and Melino, G. (2005). The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* 24, 836–848.

Rufini, A., Agostini, M., Grespi, F., Tomasini, R., Sayan, B.S., Niklison-Chirou, M.V., Conforti, F., Velletri, T., Mastino, A., Mak, T.W., et al. (2011). p73 in Cancer. *Genes Cancer* 2, 491–502.

Saha, M.N., Jiang, H., Yang, Y., Reece, D., and Chang, H. (2013). PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2331–2341.

Saki, N., Abroun, S., Hajizamani, S., Rahim, F., and Shahjahani, M. (2014). Association of Chromosomal Translocation and MiRNA Expression with The Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Cell J.* 16, 99–110.

Sane, S., and Rezvani, K. (2017). Essential Roles of E3 Ubiquitin Ligases in p53 Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Sawyer, J.R. (2011). The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet.* 204, 3–12.

Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S., and Barlogie, B. (1998). Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 91, 1732–1741.

Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2007). Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 26, 2243–2254.

- Sirohi, B., and Powles, R. (2004). Multiple myeloma. *Lancet Lond. Engl.* 363, 875–887.
- Smith, D., Armenteros, E., Percy, L., Kumar, M., Lach, A., Herledan, G., Stubbs, M., Downward, J., and Yong, K. (2015). RAS mutation status and bortezomib therapy for relapsed multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 169, 905–908.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 5, 401–409.
- Stewart, A.K., and Fonseca, R. (2005). Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 6339–6344.
- Stindt, M.H., Muller, P. a. J., Ludwig, R.L., Kehrlöesser, S., Dötsch, V., and Vousden, K.H. (2015). Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* 34, 4300–4310.
- Stoffel, A., Filippa, D., and Rao, P.H. (2004). The p73 locus is commonly deleted in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk. Res.* 28, 1341–1345.
- Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccarini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., et al. (2005). The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol. Cell* 18, 447–459.
- Surget, S., Chiron, D., Gomez-Bougie, P., Descamps, G., Ménoret, E., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2012). Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer Res.* 72, 4562–4573.
- Surget, S., Descamps, G., Brosseau, C., Normant, V., Maïga, S., Gomez-Bougie, P., Gouy-Colin, N., Godon, C., Béné, M.C., Moreau, P., et al. (2014a). RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway. *BMC Cancer* 14, 437.
- Surget, S., Lemieux-Blanchard, E., Maïga, S., Descamps, G., Le Gouill, S., Moreau, P., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2014b). Bendamustine and melphalan kill myeloma cells similarly through reactive oxygen species production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other. *Leuk. Lymphoma* 55, 2165–2173.
- Teoh, P.J., Chung, T.H., Sebastian, S., Choo, S.N., Yan, J., Ng, S.B., Fonseca, R., and Chng, W.J. (2014). p53 haploinsufficiency and functional abnormalities in multiple myeloma. *Leukemia* 28, 2066–2074.
- Teoh, P.J., Bi, C., Sintosebastian, C., Tay, L.S., Fonseca, R., and Chng, W.J. (2016). PRIMA-1 targets the vulnerability of multiple myeloma of deregulated protein homeostasis through the perturbation of ER stress via p73 demethylation. *Oncotarget* 7, 61806–61819.

- Tessoulin, B., Descamps, G., Moreau, P., Maïga, S., Lodé, L., Godon, C., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Le Gouill, S., Amiot, M., et al. (2014). PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* *124*, 1626–1636.
- Tessoulin, B., Eveillard, M., Lok, A., Chiron, D., Moreau, P., Amiot, M., Moreau-Aubry, A., Le Gouill, S., and Pellat-Deceunynck, C. (2017). p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev.* *31*, 251–259.
- Thanendrarajan, S., Tian, E., Qu, P., Mathur, P., Schinke, C., van Rhee, F., Zangari, M., Rasche, L., Weinhold, N., Alapat, D., et al. (2017). The level of deletion 17p and bi-allelic inactivation of TP53 has a significant impact on clinical outcome in multiple myeloma. *Haematologica* *102*, e364–e367.
- Toh, W.H., Siddique, M.M., Boominathan, L., Lin, K.W., and Sabapathy, K. (2004). c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. *J. Biol. Chem.* *279*, 44713–44722.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 909–923.
- Tonino, S.H., Mulkens, C.E., van Laar, J., Derks, I.A.M., Suo, G., Croon-de Boer, F., van Oers, M.H.J., Eldering, E., Wang, J.Y., and Kater, A.P. (2015). Induction of TAp73 by platinum-based compounds to overcome drug resistance in p53 dysfunctional chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *56*, 2439–2447.
- Tureson, I., Velez, R., Kristinsson, S.Y., and Landgren, O. (2010). Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 830–834.
- Ushiku, T., Chong, J.-M., Uozaki, H., Hino, R., Chang, M.-S., Sudo, M., Rani, B.R., Sakuma, K., Nagai, H., and Fukayama, M. (2007). p73 gene promoter methylation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* *120*, 60–66.
- Van Dyke, D.L., Shanafelt, T.D., Call, T.G., Zent, C.S., Smoley, S.A., Rabe, K.G., Schwager, S.M., Sonbert, J.C., Slager, S.L., and Kay, N.E. (2010). A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *148*, 544–550.
- Våtsveen, T.K., Tian, E., Kresse, S.H., Meza-Zepeda, L.A., Gabrea, A., Glebov, O., Dai, H.Y., Sundan, A., Kuehl, W.M., and Børset, M. (2009). OH-2, a hyperdiploid myeloma cell line without an IGH translocation, has a complex translocation juxtaposing MYC near MAFB and the IGK locus. *Leuk. Res.* *33*, 1670–1677.
- Våtsveen, T.K., Børset, M., Dikic, A., Tian, E., Micci, F., Lid, A.H.B., Meza-Zepeda, L.A., Coward, E., Waage, A., Sundan, A., et al. (2016). VOLIN and KJON-Two novel hyperdiploid myeloma cell lines. *Genes. Chromosomes Cancer* *55*, 890–901.

Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149–159.

Vescio, R.A., Cao, J., Hong, C.H., Lee, J.C., Wu, C.H., Der Danielian, M., Wu, V., Newman, R., Lichtenstein, A.K., and Berenson, J.R. (1995). Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J. Immunol. Baltim. Md* 150 155, 2487–2497.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Chiecchio, L., Smith, E.M., Boyd, K.D., Neri, A., Davies, F.E., Ross, F.M., and Morgan, G.J. (2011). Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 117, 553–562.

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. (2015). Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 3911–3920.

Wang, B., Xiao, Z., Ko, H.L., and Ren, E.C. (2010). The p53 response element and transcriptional repression. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 870–879.

Wang, W.K., Bycroft, M., Foster, N.W., Buckle, A.M., Fersht, A.R., and Chen, Y.W. (2001). Structure of the C-terminal sterile alpha-motif (SAM) domain of human p73 alpha. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 545–551.

Weinhold, N., Ashby, C., Rasche, L., Chavan, S.S., Stein, C., Stephens, O.W., Tytarenko, R., Bauer, M.A., Meissner, T., Deshpande, S., et al. (2016). Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* 128, 1735–1744.

Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S., and Kuehl, W.M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 113, 5418–5422.

Wu, H., and Leng, R.P. (2015). MDM2 mediates p73 ubiquitination: a new molecular mechanism for suppression of p73 function. *Oncotarget* 6, 21479–21492.

Wu, H., Zeinab, R.A., Flores, E.R., and Leng, R.P. (2011). Pirh2, a ubiquitin E3 ligase, inhibits p73 transcriptional activity by promoting its ubiquitination. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 1780–1790.

Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 240–251.

Zawacka-Pankau, J., Kostecka, A., Sznarkowska, A., Hedström, E., and Kawiak, A. (2010). p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 720–728.

Zhang, X.G., Gaillard, J.P., Robillard, N., Lu, Z.Y., Gu, Z.J., Jourdan, M., Boiron, J.M., Bataille, R., and Klein, B. (1994). Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83, 3654–3663.

Zhang, Y., Rohde, C., Tierling, S., Stamerjohanns, H., Reinhardt, R., Walter, J., and Jeltsch, A. (2009). DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 507, 177–187.

Zhao, Y., Guo, J., Zhang, X., Zhang, Z., Gu, S., Fei, C., Li, X., and Chang, C. (2013). Downregulation of p21 in myelodysplastic syndrome is associated with p73 promoter hypermethylation and indicates poor prognosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 140, 819–827.

Thèse de Doctorat

Pierre GILLARDIN

Régulation épigénétique et protéique de p73 dans le Myélome Multiple

Epigenetic and post-translational régulation of p73 in Multiple Myeloma

Résumé

Les anomalies de TP53, que sont la délétion génique associée ou non à des mutations somatiques, demeurent un facteur de résistance au traitement dans le Myélome Multiple (MM) malgré l'introduction de nouveaux agents thérapeutiques. Pour contourner les anomalies de TP53, nous avons étudié la possibilité d'activer p73, un membre de la famille de p53, qui n'est pas fréquemment muté dans les cancers. Nous avons étudié l'expression, la méthylation et la régulation de TP73 dans une collection de lignées de MM sauvages ou déficientes pour p53. Nous montrons que TP73 est rarement exprimé et surtout dans les lignées TP53 sauvage. Nous avons étudié la méthylation de l'îlot CpG situé en amont du gène par MS-PCR et montré que l'absence d'expression correspond à son hyperméthylation, qui peut néanmoins être réversée par la décitabine, un inhibiteur de la méthylation. Malgré l'augmentation d'expression de TP73, la décitabine ne permet pas une expression protéique significative de p73. Pour étudier la régulation de p73, nous avons utilisé des agents alkylants, des inhibiteurs de MDM2 et du protéasome. Nous montrons que les nutlin3a et MG132, ne stabilisent pas p73 mais diminuent son expression constitutive. Les agents alkylants induisent une augmentation de p73 mais uniquement dans les lignées TP53 sauvage et l'extinction de p53 par ARN interférence inhibe cette régulation. Dans les lignées déficientes pour p53, la décitabine augmente l'expression génique mais le melphalan ne permet pas de stabilisation de la protéine. L'ensemble de nos résultats montre que TP73 n'apparaît pas être un bon candidat pour contourner les anomalies de TP53.

Mots clés

Myélome multiple, p53, p73, méthylation, décitabine, agents alkylants

Abstract

TP53 deficiency remains a major adverse event in Multiple Myeloma despite therapeutic progresses. p73, a member of p53 family, is very rarely mutated and has been poorly studied in myeloma. Using human myeloma cell lines with different TP53 status, we assessed methylation, expression and regulation of TP73. We report that TP73 is silenced by methylation and that decitabine increases its expression, which remains however insufficient for significant protein expression. Alkylating drugs increase expression of TP73 only in TP53wt cells and fail to synergize with decitabine in p53 deficient cells. On the other hand, MG132 and nutlin-3a don't stabilize p73 in response to in TP53wt p73 positive cell lines. TP73 does not appear as a promising target for bypassing p53 deficiency in Multiple Myeloma.

Key Words

myeloma, p53, p73, methylation, alkylating drugs, decitabine, MG132.