

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « (voir liste des spécialités) »

Par

Benoît Tessoulin

« Identification par séquençage de l'exome de la dérégulation des voies de signalisation dans le myélome multiple et leurs conséquences fonctionnelles, notamment sur la voie p53 »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 10 Octobre 2018

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers – Unité Inserm U1232

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

Pr Thierry Soussi, Professeur de Biologie Moléculaire,
Karolinska Institute, Stockholm, Suède

Pr Fabrice Jardin, Professeur d'hématologie,
Centre Henri Becquerel, Rouen, France

Dr Salomon Manier, Hématologue,
CHU de Lille

Présidé par le Pr Philippe Moreau,
Professeur d'hématologie, CHU de Nantes

Dirigée par le Dr Catherine Pellat-Deceunynck,
Directrice de recherche CRCINA – UMR 1232 – ERL 601,
Nantes

Remerciements:

Mes remerciements vont d'abord, et naturellement, au Dr Catherine Pellat-Deceunynck, qui m'accompagne, et me dirige dans ce monde scientifique depuis mon Master 2. Sa rigueur dirigée vers l'essentiel, sa saine bataille pour l'ordre dans les idées - et les façons de les énoncer- ainsi que son esprit critique m'ont apporté énormément, et ont infiltré, un peu j'espère, ma façon de penser. Je ne désespère pas de te convertir définitivement à R !

Merci également au Dr Martine Amiot, pour son esprit très critique, mais quasi-invariablement juste, pour ses remarques et sa confiance,

Au Dr Agnès Moreau-Aubry, pour sa bonne humeur, son aide pour la réalisation de ce travail et sa culture cinématographique synchronisée à la mienne,

Merci au Dr David Chiron, à sa rigueur et à sa sympathie,

Aux piliers de l'équipe 10, Géraldine, Sophie, Patricia, Christelle et Céline ; indispensables compagnes de voyages,

Aux Dr Thierry Soussi, Fabrice Jardin, Philippe Moreau et Manier, qui me font l'honneur de juger ce travail et qui portent, chacun dans leur domaine leur travail au plus haut niveau d'exigence,

Au Pr Steven Le Gouill, pour ses conseils, son enthousiasme communicatif, son soutien indéfectible et son aide pour les projets passés et à venir,

Au Pr Philippe Moreau, pour son soutien précieux au cours de ces années,

A Antonin, un « co-rameur » aux données inexpugnables, et dont l'humour a fait paraître courtes ces années,

A ma famille, à Alexandra et à Théophile, irremplaçables, aux autres ?

Après 3 ans passés à ce bureau (je n'ai jamais travaillé aussi longtemps dans un même endroit !), je repars dans un monde peu éloigné, où j'espère faire fructifier ce que vous m'avez apporté.

Un nœud de fleurs se mêle aux fers qui nous enlacent.
Victor Hugo ; Le dévouement (1828)

Remerciements:	2
Introduction	5
p53	5
Une famille structurée	5
Activation - Régulation	9
Rôles biologiques : la duplicité d'un gardien ?	13
p53, l'intégrateur de signaux, le « master-switch » cellulaire	14
Anomalies de p53 : plus qu'une simple perte de fonction	17
Le Myélome Multiple	21
Stratification	22
Biologie du myélome	24
Le plasmocyte : un sécréteur dans la lymphopoïèse B	24
Evènements cytogénétiques	25
Evènements mutationnels : plus de voies que de gènes	27
Evènements épigénétiques	31
Evolution clonale	32
Microenvironnement	35
MM et résistance aux traitements	36
Prise en charge du myélome multiple et des leucémies à plasmocyte	36
Pronostic du myélome	36
Prise en charge du MM	39
Stratégies novatrices	42
Les lignées de MM	43
Objet du travail	46
Article 1. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell	47
Article 2. Human myeloma cell lines display mutations related to myeloma patients at relapse and harbor major hits in the DNA repair	57
Abstract	60
Introduction	61
Materials and Methods	62

Results	64
Discussion	71
Acknowledgments	74
References	75
Figure Legends	79
Figures	82
Supplementary Information	87
Mise à jour des données de PRIMA-1^{Met} dans le MM	147
L'auranofin et PRIMA-1 ^{Met} présentent un même profil de cytotoxicité dans les HMCLs et les cellules primaires de patients	148
La mort induite par PRIMA-1 ^{Met} et l'Auranofin est Bax/Bak indépendante	149
La mort induite par PRIMA-1 ^{Met} est majoritairement caspase-dépendante	150
Conclusion des travaux sur Prima-1 ^{Met}	151
Discussion	155
Annexes	168
Article 3. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance.	169
Article 4. Allogeneic stem cell transplantation for patients with mantle cell lymphoma who failed autologous stem cell transplantation: a national survey of the SFGM-TC	181
Article 5. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma	183
Article 6. Carboplatin instead of cisplatin in combination with dexamethasone, high-dose cytarabine with or without rituximab (DHAC+/-R) is an effective treatment with low toxicity in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas.	185
Article 7. Decitabine and Melphalan Fail to Reactivate p73 in p53 Deficient Myeloma Cells.	187
Article 8. Diagnostic and management of life-threatening Adult-Onset Still Disease: a French nationwide multicenter study and systematic literature review.	189
Article 9. Predicting early prognosis of pneumocystis pneumonia in HIV and non-HIV patients: The AlveoPNeumo Score.	191
Article 10. BH3 mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3 mimetics in myeloma treatment.	193
Références	194

Introduction

p53

Une famille structurée

A compter de la découverte de p53 à la fin des années 70 (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979), des efforts biologiques majeurs se sont déployés pour comprendre la structure et les mécanismes de cette protéine complexe, aux multiples facettes et indispensable à la majorité des processus cellulaires.

Le gène *TP53* est situé en 17p13.1, il compte 11 exons (dont le 1^{er} est non-codant), deux promoteurs (un proximal P1 et un interne P2 dans l'exon 4). A cette diversité de promoteurs s'ajoute une diversité d'initiation de la traduction, chaque promoteur comptant deux codons d'initiation (ATG1, ATG40, ATG133 et ATG160). La protéine p53 « canonique » (pleine longueur, TA-p53) compte 393 acides aminés (AA) et est divisée en plusieurs régions fonctionnelles, Figure 1.

La portion amino-terminale (N-terminal) contient deux domaines de transactivation (TAD1-2, AA : 1->42 et 43->63), le site de fixation de Mdm2 (Murine Double Minute 2, la ligase E3 la mieux décrite de p53), est localisé sur le TAD1. Ces TAD sont nécessaires à la fonction transcriptionnelle de p53, les expérimentations cellulaires et animales ont mis en évidence que ces deux domaines possédaient des spectres transcriptionnels différents. Les TAD sont également sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles, en particulier des phosphorylations (Brady et al., 2011; Raj and Attardi, 2017). Les TAD sont suivis d'une région riche en proline, assurant des fonctions essentielles de réponses aux dommages à l'ADN (AA : 64-90) et qui assurent la séparation avec le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD) (Baptiste et al., 2002). Le DBD représente la plus grande portion de la protéine, regroupant 4 exons (AA : 91 :292), peu de résidus sont la cible de modifications post-traductionnelles alors que 90% des mutants des cancers humains s'y concentrent (p53.iarc.fr, R=18) (Leroy et al., 2014; Pavletich et al., 1993).

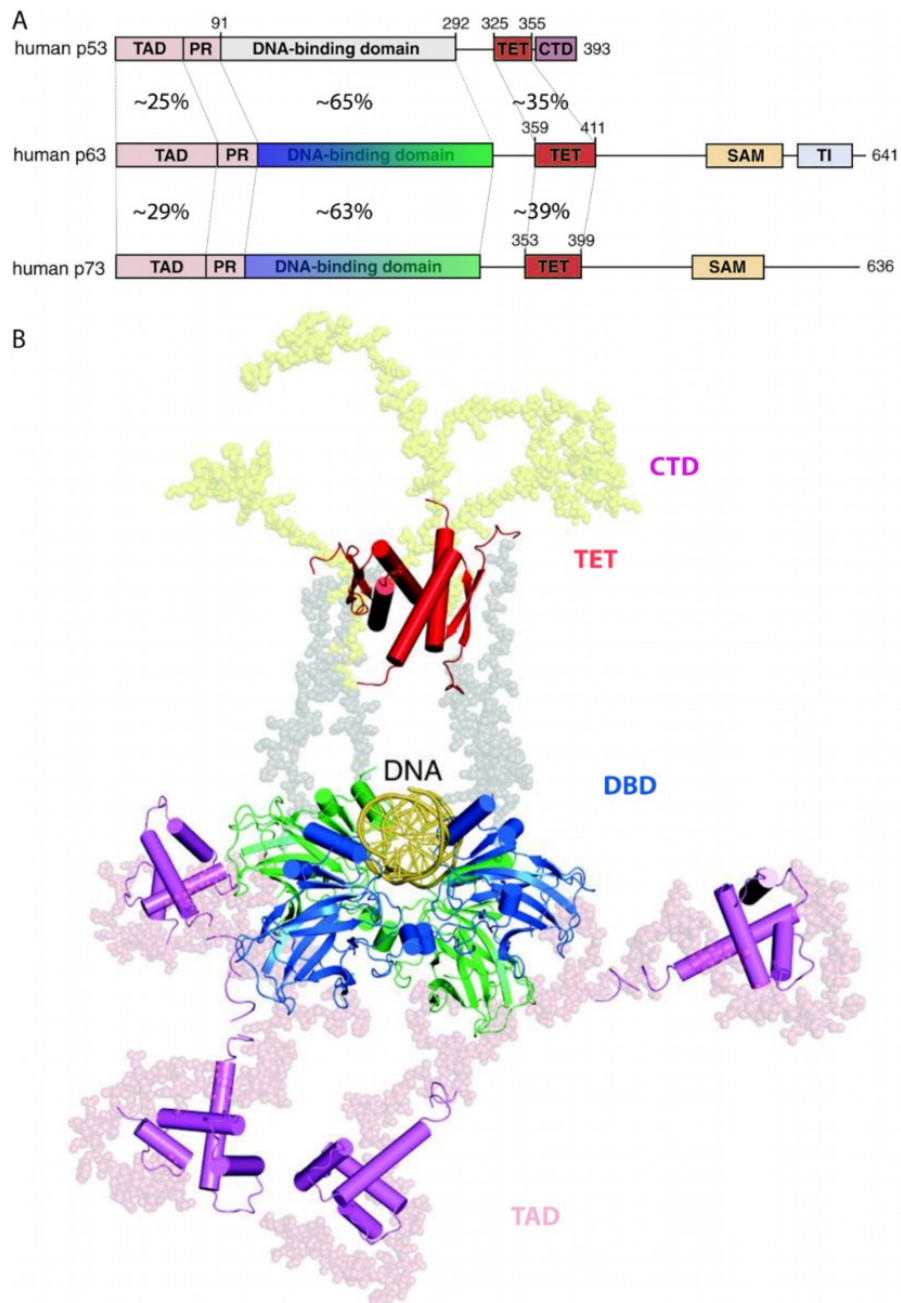


Figure 1. Structure des protéines de la famille p53. A : Domaines fonctionnels de p53/p63 et p73. En % les degrés d'homologie de séquence. B : visualisation tridimensionnelle du tétramère p53 interagissant avec une séquence d'ADN. Au niveau des TAD, le domaine Taz-2 de p300 est figuré en magenta. TAD : Transactivation Domain, PR : Prolin-Rich Domain, TET : Tetramerization Domain, CTD : C-terminal Domain, SAM : Sterile Alpha Motif. Adapté de Joerger et al. et Dötsch et al. (Dötsch et al., 2010; Joerger and Fersht, 2010; Joerger et al., 2014).

Le DBD contient les boucles d'interaction avec l'ADN, qui sont elles-mêmes constituées des résidus les plus fréquemment mutés. Le domaine d'oligomérisation est constitué de structures secondaires (feuillet β et une hélice α) (AA : 325-355), qui permettent l'association en homodimères puis en dimères de dimères (tétramères). Ce domaine est particulièrement discordant avec ses homologues p63/p73, ces derniers possédant une hélice α de stabilisation supplémentaire (Joerger et al., 2009, 2014). Le signal de localisation nucléaire (NLS) est inclus dans la partie C-terminale de p53 (AA : 355-393), cette région hautement flexible est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles, en particulier elle porte la majeure partie des résidus acétylés ou ubiquitinylés. Cette extrémité a été initialement décrite comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle de p53, cependant les travaux de ces 15 dernières années ont démontré que cette « queue » c-terminale facilite la transcription p53-médiée (en particulier sur les sites de réponse à p53 non-canoniques) et également les interactions protéines-protéines grâce sa plasticité conformationnelle (Chuikov et al., 2004; Laptenko et al., 2015; Rustandi et al., 2000; Sullivan et al., 2018; Tong et al., 2015).

Cet intégrateur cellulaire majeur n'est pas apparu dans le règne du vivant *ex-nihilo*, comme en témoignent les études phylogéniques. En 1997 et 1998, Kaghad et Yang découvrent des protéines homologues à p53 : p73 et p63 (Kaghad et al., 1997; Yang et al., 1998), dont les études structurales et fonctionnelles révéleront qu'elles possèdent une forte homologie, mais une biologie distincte. En effet, si p63 et p73 partagent certaines des activités de p53, telles la transcription de gènes intervenant dans le cycle cellulaire, elles sont également pourvues d'activités propres en particulier lors du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire (Dötsch et al., 2010). P63 est un acteur rôle majeur du développement des *epithelia* tandis que p73 est dévolu au développement neurologique (Yang et al., 1999, 2000). La forme ancestrale commune semble être proche de *TP63* et *TP73*, tandis que l'acquisition des promoteurs internes et finalement *TP53* sont plus récentes dans l'évolution (groupe des chordés). L'évolution se serait faite par duplications géniques permettant la conservation d'homologie des grands domaines protéiques (Belyi et al., 2010; Soussi et al., 1987, 1990).

La diversité de la famille p53 ne s'arrête pas à ses membres, en effet, de nombreuses isoformes (12 pour p53) ont été détectées pour les trois membres p53, p63 et p73.

Ces isoformes procèdent de trois mécanismes principaux, Figure 2(Arai et al., 1986; Flaman et al., 1996; Matlashewski et al., 1987; Surget et al., 2013). Les isoformes modifiant la portion N-terminale (appelées ΔN) utilisent un promoteur alternatif P2 et des codons d'initiation de la traduction en 40 et 160. Ces formes Δ ($\Delta 40p53$ -, $\Delta 133p53$ -, et $\Delta 160p53$ -) sont plus courtes. La forme $\Delta 40p53$ - n'a pas de TAD1 et exerce un effet dominant négatif sur TA-p53(Courtois et al., 2002). La forme $\Delta 133p53$ - peut être directement transactivée par p53/p63 et p73(Aoubala et al., 2011; Marcel et al., 2012) et pourrait modifier le programme transcriptionnel de p53. L'épissage alternatif de l'intron 9 est à l'origine des isoformes intéressant la partie C-terminale (appelées -p53 α , -p53 β ; -p53 γ). L'épissage entier de l'intron est responsable de la forme canonique α , tandis que d'autres schémas avec rétention partielle de l'intron 9 sont à l'origine d'un raccourcissement de la protéine p53, par transcription d'un codon stop (formes β et γ). D'un point de vue clinique, la découverte la plus intéressante reste la description par l'équipe de Bourdon, d'un impact de la forme γ dans le cancer du sein. Certaines patientes *TP53^{mut}* présentaient une sur-expression des isoformes γ , l'expression de cette isoforme s'associant à un aussi bon pronostic que les patients avec deux allèles sauvages de *TP53*(Bourdon et al., 2011).

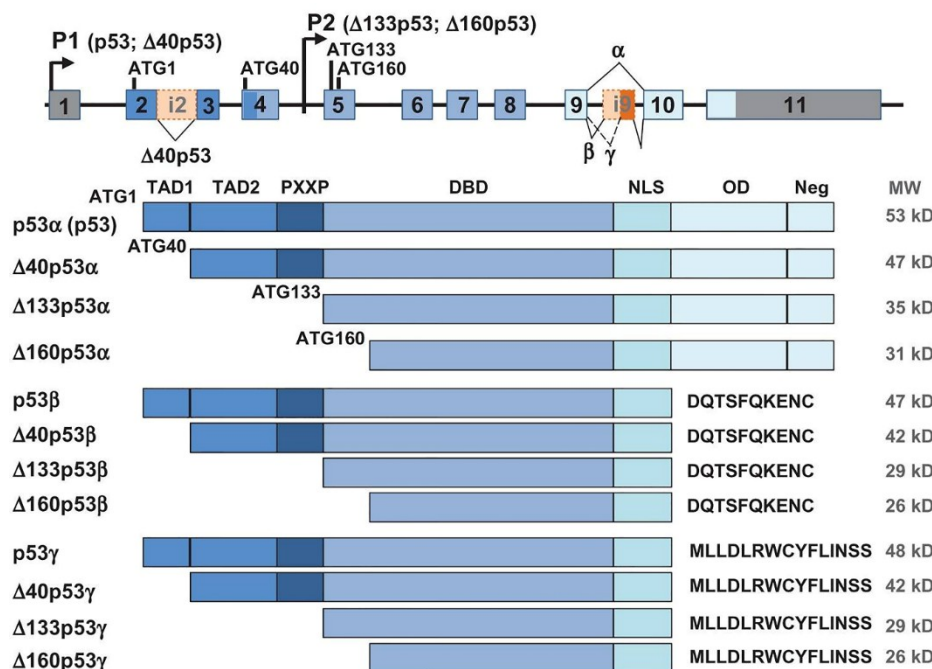


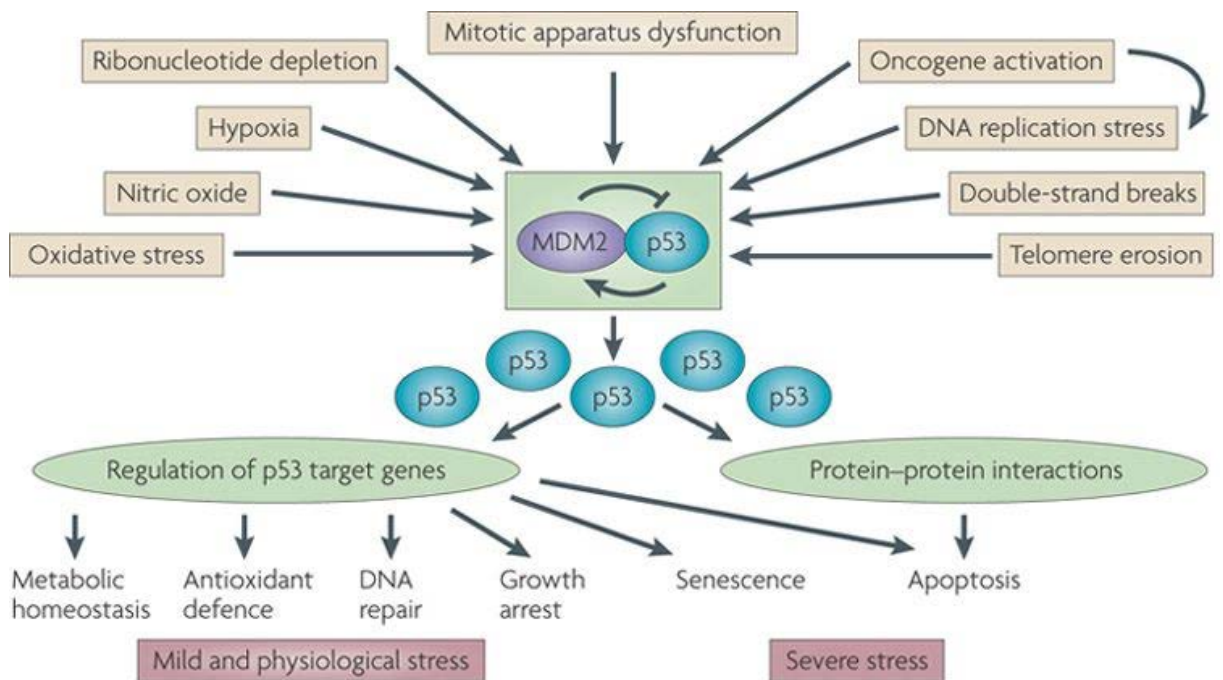
Figure 2. Isoformes de p53. D'après Surget et al. 2013(Surget et al., 2013)

Ainsi, de nombreux mutants de *TP53* sont susceptibles d'intervenir dans des régions non-codantes du gène et de modifier les expressions des isoforme. Le groupe de DAS

a par exemple illustré comment un mutant silencieux dans la zone d'entrée du ribosome peut modifier la traduction de l'ARNm et la quantité relative d'isoformes (Grover et al., 2011; Ray et al., 2006).

Activation - Régulation

L'intégration de signaux cellulaires différents est en majeure partie réalisée par les régulateurs post-traductionnels de p53, Figure 3 (Meek and Anderson, 2009; Vousden and Prives, 2009). En effet, alors que les effets de p53 sont principalement transcriptionnels, sa propre modulation transcriptionnelle n'est pas au premier plan. Brièvement, d'un point de vue transcriptionnel, les principaux mécanismes de sa régulation sont la méthylation de son promoteur, la fixation de facteurs de transcription ubiquitaires tels cMyc/Max, NFκB, ou p53 lui-même ou l'organisation de la chromatine (Agirre et al., 2003; Pogribny et al., 2000; Saldaña-Meyer and Recillas-Targa, 2011; Saldaña-Meyer et al., 2014).



Nature Reviews | Cancer

Figure 3. Intégration des stimuli cellulaires par p53. Selon Levine et Oren. (Levine and Oren, 2009)

En absence de stress aigu, le niveau d'expression de la protéine p53 est faible, principalement par dégradation par le protéasome(Lazo, 2017). En effet, Mdm2 (gène *HDM2*) ubiquitinye des résidus lysines (K370, K372, K373, K381, K382, et K386) de p53, promouvant l'exportation de ce dernier hors du noyau (mono-ubiquitylation) et/ou sa dégradation *via* la sous-unité 26S du protéasome (poly-ubiquitylation). La transcription d'*HDM2* est sous la dépendance de p53 lui-même, à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle négatif. D'autres ubiquitines-ligases de p53 sont décrites, telles Pirh2, COP1, CHIP, ARF-BP1, E6-AP, TOPORS, TRIM24 et MKRN1, qui contribuent à l'ubiquitylation de p53, Figure 4.

L'activité biologique de p53 passe par sa stabilisation et donc par l'inhibition de ces processus de dégradation(Moll and Petrenko, 2003). Les mécanismes de modulation de l'ubiquitylation sont nombreux, en effet, les résidus concernés par l'ajout d'ubiquitine en C-terminal sont en compétition avec l'acétylation médiée par p300. De même, les résidus (Sérine/Thréonine) en N-terminal de p53 peuvent être phosphorylés (en particulier la Tyrosine 18), et empêcher l'interaction entre MDM2 et p53, favorisant l'interaction p300-p53 et conduisant à une augmentation de la demi-vie de p53(Schon et al., 2002; Teufel et al., 2009). Ces processus de phosphorylation sont les principaux acteurs de l'activation de p53 dans la signalisation des dommages à l'ADN par la cascade des kinases ATM-dépendantes (ATM, ATR, Chk1, Chk2). D'autres voies de signalisation intracellulaire modifient les phosphorylations de p53 et donc sa stabilité, Figure 4 (AMPK, mTOR, MAPK)(Meek and Anderson, 2009).

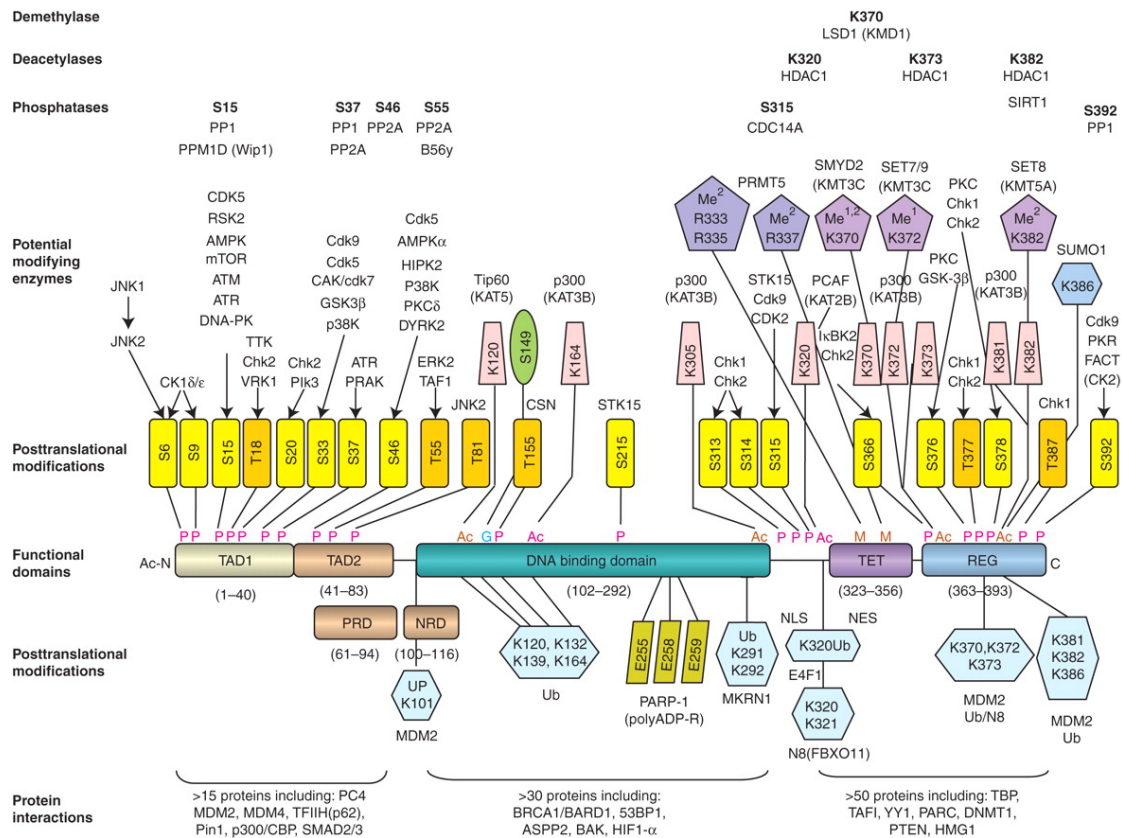


Figure 4. Modifications post-traductionnelles de p53. D'après Meek et Anderson, CSH Perspectives in Biology 2009

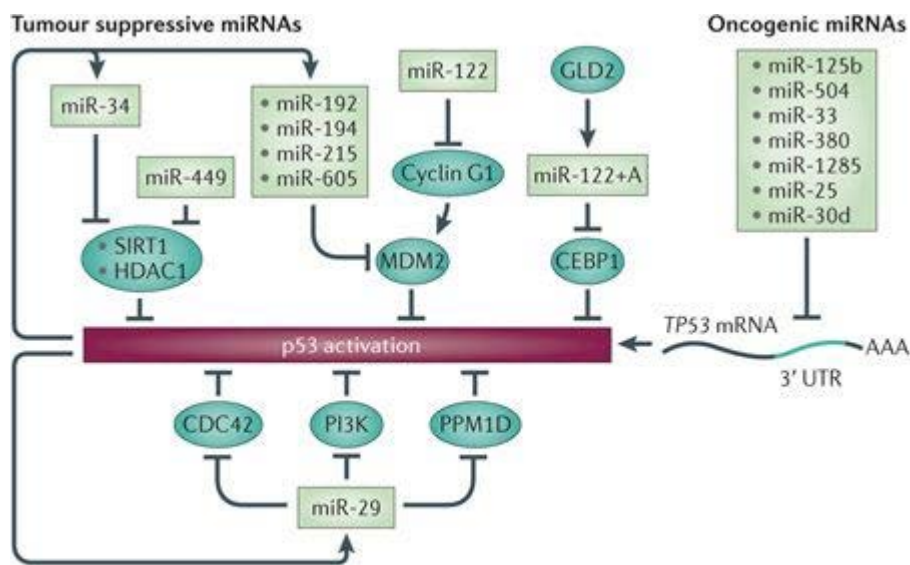
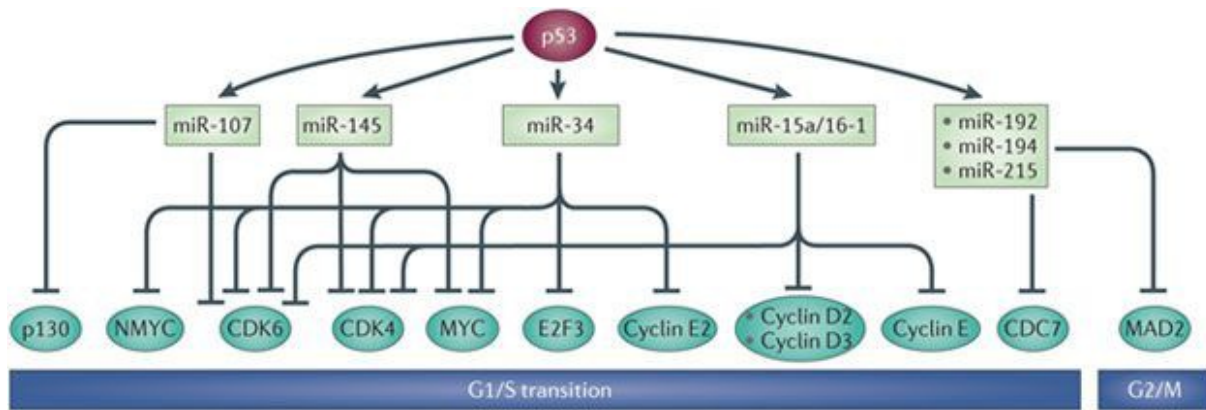
La régulation de l'ubiquitinylation de p53 est également médiée par d'autres acteurs, tel Mdm4 qui est indispensable à l'activité de Mdm2, ou au contraire p14^{ARF} qui empêche l'interaction p53-Mdm2(Kruse and Gu, 2009; Shvarts et al., 1997). Ce processus d'ubiquitinylation est dynamique, ainsi des USP7 et USP10 permettent la dé-ubiquitinylation de p53 (+/- Mdm2)(Brooks et al., 2007; Chen et al., 2005a; Sherr, 2006; Yuan et al., 2010).

En plus de modifier la stabilité de p53, de nombreuses modifications post-traductionnelles modifient l'affinité de p53 pour ses cibles, l'immensité des combinaisons entre les modifications et les phénomènes biologiques qui en découlent commence à être entraperçue et la sélectivité/le choix du programme transcriptionnel est pour l'instant assez mal comprise. Les stress peu intenses sont associés à une réponse orientée vers l'arrêt du cycle, alors que les stress génotoxiques sévères orientent la cellule vers une mort cellulaire programmée, l'apoptose. Un des acteurs qui a été étudié dans la modulation de la réponse de la lysine K120.

L'acétylation de cette dernière privilégie la localisation de p53^{K120-Ac} sur les promoteurs de gènes pro-apoptotiques plutôt que d'arrêt du cycle, ainsi que la localisation mitochondriale de p53, abrogeant les capacités pro-apoptotiques de p53 sans modifier son rôle d'arrêt du cycle (Sykes et al., 2009). De nombreuses autres modifications post-traductionnelles (SUMOylation, neddylation, méthylation) interviennent, et coopèrent (Dai and Gu, 2010; Meek and Anderson, 2009). Ces modifications post-traductionnelles peuvent intervenir très rapidement, dès la sortie de p53 du polysome (Gajjar et al., 2012).

Pour finir, une boucle de régulation insoupçonnée a été publiée en 2016 par l'équipe de Toledo à partir de constructions d'isoformes murins de p53^{Δ31/Δ31}. Cette équipe a mis en évidence que l'activation de p53, permettrait la répression transcriptionnelle de gènes de la famille Fanconi (*via* l'axe p21/E2F4-DREAM [DP, RB-like, E2F4 et MuvB]) En effet, des motifs CDE/CHR (cell cycle-dependent element/ cell cycle genes homology region) sont retrouvés en amont des gènes des phases G2/M du cycle cellulaire et de la voie de Fanconi (Engeland, 2018; Fischer et al., 2016; Jaber et al., 2016). Ainsi, la surexpression de p53 serait à l'origine d'une boucle positive de régulation par réduction de l'efficacité de la voie Fanconi, d'une accumulation de dommages à l'ADN et l'activation de p53, un mécanisme non confirmé et paradoxal (Jaber et al., 2016).

Les micro-ARN (miRNA) sont un mode de régulation post-transcriptionnelle majeur des acteurs de la voie p53, par interférence ARN (Hermeking, 2012). Ces mRNA sont de courtes séquences d'ARN (20-25nt) qui possèdent une séquence complémentaire de certaines régions 3' non traduites d'ARNm. Les molécules d'ARN double brins formés par complémentarité de séquence sont clivées (ou la traduction de l'ARNm cible inhibée) au sein des complexes RISC (RNA-induced silencing complex). P53 a une action transcriptionnelle directe sur de nombreux miRNA (miR-34a, miR-200, miR-15/16 et miR-192/194/215) mais également sur les enzymes qui permettent la maturation des pré-miRNA (DROSHA et DICER1 [*via* p63]) (Su et al., 2010; Suzuki et al., 2009). Les principaux miRNA sous la dépendance de p53 et agissant sur les acteurs du cycle cellulaire et le réseau p53 sont figurés dans la figure 5.



Nature Reviews | Cancer

Figure 5. Modulations cibles des miRNA induits par p53. D'après Hermeking et al., 2012

Rôles biologiques : la duplicité d'un gardien ?

Le rôle biologique de p53, et en particulier sa caractérisation de gène suppresseur de tumeur a été débattue dès sa découverte. En effet, au cours des 10 premières années de recherche, des données apparemment contradictoires se sont accumulées sur cette protéine de 53(-54)kDa qui était stabilisée dans les cellules transformées par le virus simiesque 40 (SV40) et retrouvée « associée » à une protéine virale (l'antigène T)(Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Les descriptions fonctionnelles initiales de p53 suggéraient des propriétés pro-tumorales, en particulier de coopération avec d'autres oncogènes connus comme Ras, et une accumulation, à l'origine de transformations cellulaires(Parada et al., 1984). Cependant, au sein de ces cellules

transformées, des clones ont émergé, qui avaient rétro-intégré des segments de génomes viraux au sein des *loci* de *TP53*, invalidant l'expression de ce dernier, une caractéristique plutôt retrouvée dans les gènes suppresseurs de tumeurs (Ben David et al., 1988). Finalement, plusieurs groupes ont réévalué le paradigme: au sein des tumeurs, le locus de *TP53* est très souvent le siège d'une perte d'hétérozygotie (avec délétion d'un bras 17p13 et mutation de l'allèle restant) et seuls des mutants de *TP53* sont tumorigènes (Baker et al., 1989; Hinds et al., 1989; Mowat et al., 1985). La démonstration inverse, p53 « suppresseur de tumeur » sera apportée par la transfection et la surexpression de cDNA de *TP53*^{sauvage} dans des lignées transformées (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989; Haber and Harlow, 1997). Il est intéressant de noter d'un point de vue épistémologique, qu'un des articles effectuait la révolution copernicienne sans complètement l'assumer : « The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation » ; à moins que les reviewers n'aient pas été prêts à ce changement de paradigme. D'un défaut de connaissance de la séquence « sauvage » de *TP53*, ces errements initiaux mettaient en avant certains des rôles maintenant reconnus des mutants de p53 dans la tumorigenèse.

p53, l'intégrateur de signaux, le « master-switch » cellulaire

Comme suggéré par sa très grande stabilité au cours de l'évolution et sa dérégulation fréquente lors des processus tumoraux, p53 est un gène majeur du destin cellulaire. Les fonctions de p53 sont dominées par l'inhibition du cycle cellulaire, l'induction d'apoptose ou de la sénescence et la réparation de l'ADN, des fonctions qui concourent à la suppression tumorale (Lane, 1992; Vousden and Prives, 2009). D'autres fonctions, telles l'orientation métabolique (principalement par la modulation de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative (Puzio-Kuter, 2011)) ou l'autophagie sont également rentrées dans le spectre des acteurs d'aval de p53 (Biegging et al., 2014; Morselli et al., 2008).

Les effets biologiques de p53 résultent en majeure partie de son rôle de facteur de transcription. Les séquences de réponse à p53 (p53RE) présentent un motif de type RRRCWWGYYY (N) RRRCWWGYYY (R = A/G , W = A/T , Y = C/T , N = 0 à 13 nucléotides) , Figure 6. La séquence de ces p53RE semble être un déterminant majeur d'activation du programme transcriptionnel de p53, et singulièrement mieux conservé au cours de l'évolution (et moins dépendant de facteurs auxiliaires potentiellement type-cellulaire dépendants) que celui d'autres

facteurs de transcription (e.g. MAX, SRF, JUND, CEBPB, ...)(Andrysiak et al., 2017; Sullivan et al., 2018).

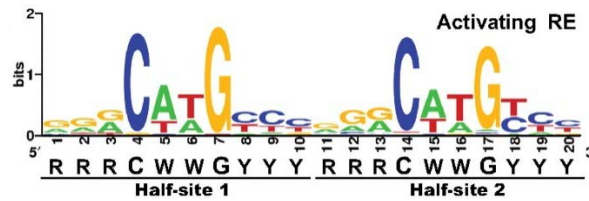


Figure 6. *p53-Response Element*. D'après Andrysiak et al & Wang et al.(Andrysiak et al., 2017; Wang et al., 2009)

Dans une étude combinant de nombreuses techniques de génomique à haut débit (ChIP-seq p53, RNA-seq des ARN en cours de transcription [GRO-SEQ], RNA-seq des ARN totaux et associés aux polysomes, et criblage shRNA), l'équipe d'Espinosa a retrouvé le programme transcriptionnel connu, mais surtout confirmé le caractère non-remplaçable de l'activité de p53. C'est-à-dire, aucun gène cible ne récapitule son effet biologique pour la suppression tumorale, aucune anomalie isolée par shRNA n'a conféré d'avantage en survie à la Nutlin-3a (inhibiteur de Mdm2), en dehors de l'émergence de mutants *TP53*(Andrysiak et al., 2017), des résultats déjà observés dans un modèle murin p21-/Puma- et Noxa-(Valente et al., 2013). Ce programme transcriptionnel est résumé dans la Figure 7.

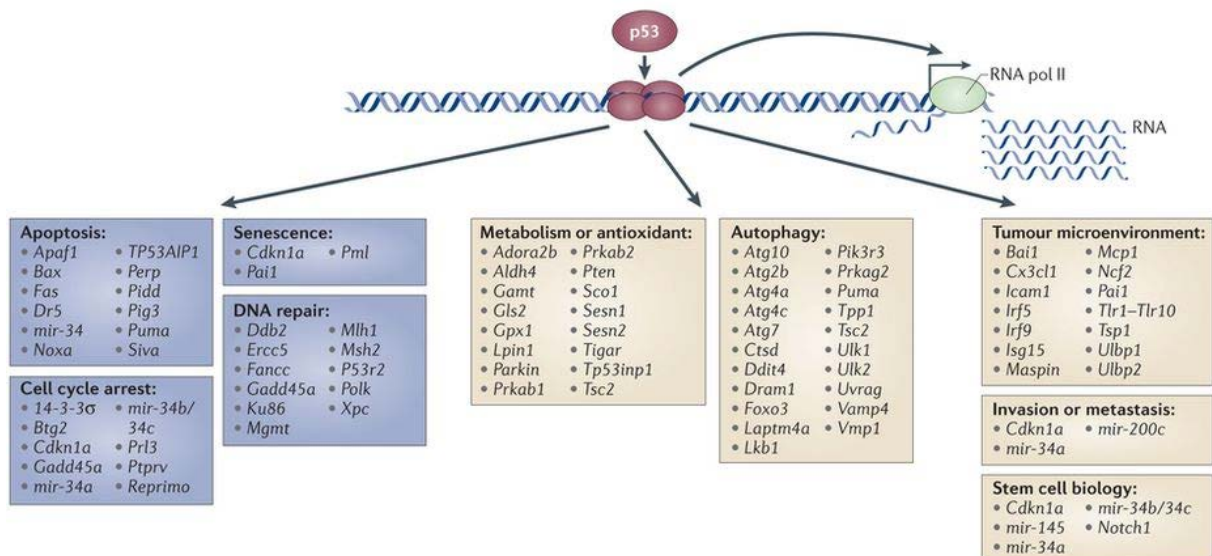


Figure 7. *Programme transcriptionnel de p53*. D'après Biegging, 2014.

Sa fonction anti-tumorale transcriptionnelle repose principalement sur la modulation du cycle cellulaire (*via CDKN1A*), l'induction d'apoptose (*BAX, BBC3, FAS*), ou la promotion des réparations de l'ADN (*DDB2, XPC*). Par ailleurs, en plus de la suppression tumorale, p53 présente également des fonctions qui préviennent la progression tumorale, en particulier en limitant la survenue de dommages à l'ADN et le stress réplicatif (*via Mdm2* et les Polycomb Repressor Complex, qui limitent le déroulement de la fourche de réplication lors de la phase S)(Klusmann et al., 2016; Wienken et al., 2017). Cette protection des dommages est en contradiction avec l'axe p53-Fanconi développé par l'équipe de Toledo(Jaber et al., 2016). La protéine p53 influe également sur la méthylation du génome humain. Le séquençage du génome humain a révélé, de façon inattendue par son ampleur, de très nombreuses séquences répétées dispersées plus ou moins longues (SINEs, LINEs) qui ont la capacité à se propager au sein du génome (rétro-transposons)(Smit, 1999). De même, les régions péri-centromériques et centromériques sont constituées de séquences d'ADN répétées en tandem (« ADN satellite »), non codant. Le groupe de Gudkov a démontré récemment que p53 maintient une pression de méthylation sur ces régions d'ADN « déchet », et que les cellules déficientes pour p53 présentaient une plus forte sensibilité aux agents hypométhylants(Leonova et al., 2018, 2013; Nieto et al., 2004; Roulois et al., 2015; Welch et al., 2016). La finalité biologique évoquée par les auteurs serait de prévenir la mobilité des rétro-transposons, qui est un processus majeur de mutagenèse(Amariglio and Rechavi, 1993). De plus, la transcription de ces séquences d'ARN répétées en tandem, ou de rétro-transposons, conduit à la formation de molécules d'ARN double-brin, à l'origine d'une réponse interféron cytotoxique (solution de « back-up » p53 indépendante, en cas de transcription de régions normalement sous silence). Ces résultats font partie des hypothèses expliquant la constatation d'une plus forte instabilité chromosomique et d'un plus grand nombre de mutants dans les tumeurs p53 mutées et la dérégulation très fréquente de la voie interféron dans le cancer(Borden et al., 2007). Un autre mécanisme, également p53-médié, de contrôle de l'expansion des rétro-transposons a également été décrit, renforçant l'idée du rôle biologique de p53 comme protecteur du génome contre ces agressions(Wylie et al., 2016).

L'activité biologique de p53 passe également par les interactions protéine-protéine, en particulier nucléaires (facteurs de transcription, p63, p73, 53-BP1). A ce jour, plus de 1050 interactions ont été répertoriées par le site UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04637>), dont des modélisations *in-silico* prédites. Si le rôle nucléaire des interactions interprotéiques de p53 est bien décrit, des interactions directes avec des protéines cytoplasmiques, entre autres lors de l'apoptose (Bax) ont été décrites (Green and Kroemer, 2009; Moll et al., 2005).

Anomalies de p53 : plus qu'une simple perte de fonction

Les patients présentant un syndrome de Li-Fraumeni sont des porteurs germinaux de mutants de *TP53* (hétérozygotes) et présentent un développement accru de néoplasies multiples (Malkin et al., 1990). Des mutations ponctuelles peuvent donc invalider la fonction suppressive de tumeurs de p53.

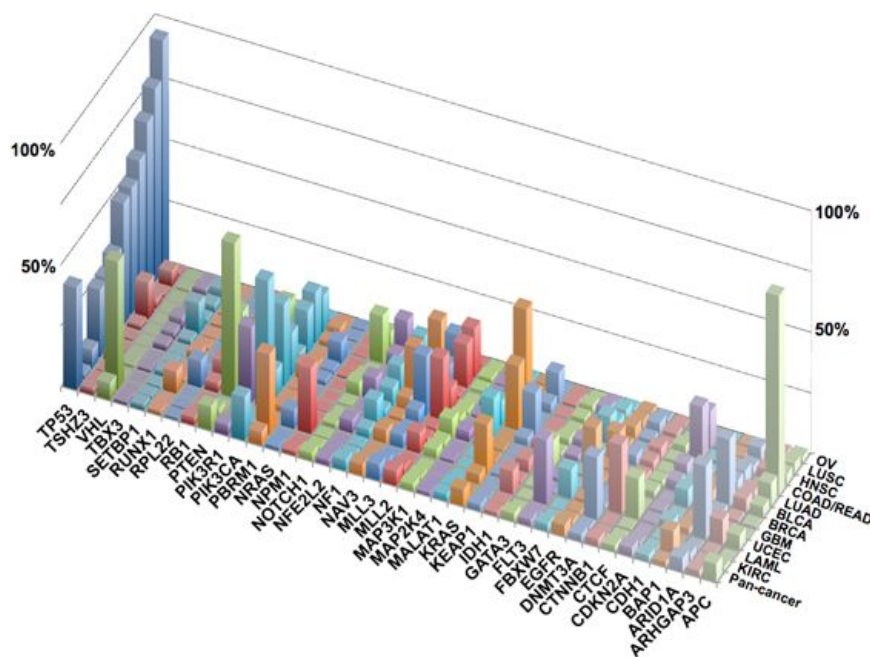


Figure 8. Principaux mutants retrouvés au sein des cancers. Glioblastome Multiforme (GBM), Leucémie Aigue Myéloblastique/Lymphoblastique (LAML), carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSC), adénocarcinome pulmonaire (LUAD), carcinome épidermoïde pulmonaire (LUSC), carcinome mammaire (BRCA), carcinome rénal à cellules claires (KIRC), carcinome ovarien (OV), carcinome urothélial de vessie (BLCA), carcinome utérin (UCEC), adénocarcinome colique/rectal (COAD/READ)

D'après Soussi et al. et Kandoth et al. (Kandoth et al., 2013; Soussi and Wiman, 2015).

Les mutations de *TP53* affectent plus de 50% des cancers au diagnostic, mais il existe une forte hétérogénéité entre les différentes histologies, Figure 8 (Soussi and Wiman, 2015). Six codons, (« hot-spots » : R175, G245, R248, R249, R273, et R282) concentrent plus de 25% des anomalies dont 73% de mutants faux-sens ((Leroy et al., 2014), p53.iarc.fr, Révision=18). Ces résidus sont principalement situés dans les boucles en contact avec l'ADN (L1, L2, L3 et Loop-Sheet-Helix)(Joerger and Fersht, 2010). Les autres anomalies de séquences sont principalement des décalages du cadre de lecture (9%), des non-sens (8%) ou des mutants des zones d'épissage. De façon paradoxale, cette très forte représentation de mutants ponctuels faux-sens classerait *TP53* dans les « oncogènes », selon la classification 'ratiométrique' de Volgestein(Vogelstein et al., 2013).

La présence des mutants de *TP53*, qu'ils soient « contact » (touchant la zone du DBD et modifiant la reconnaissance des p53RE [en particulier les résidus Arg248, Arg273, et Arg280]) ou « conformationnels » (altérant la structure tridimensionnelle de p53) modifient ses capacités transcriptionnelles sur ses cibles classiques(Kato et al., 2003). Si 6 codons concentrent 25% des mutants, il reste 75% des patients avec des mutations s'échelonnant dans tout le DBD, pour lesquels les caractérisations fonctionnelles sont moins évidentes. Par ailleurs, et contrairement à ce qui est constaté pour d'autres gènes suppresseurs de tumeurs (*BRCA1*, *RB1*, *ATM*...) la persistance d'un allèle sauvage de *TP53* et la constitution d'une hétérozygotie *TP53*^{Mut/sauvage} est associée à une dominance négative : l'hétéro-tétramérisation de protéines p53^{mut} et p53^{sauvage} s'associe à la perte de fonction des protéines p53^{sauvage}(Chan et al., 2004; Kern et al., 1992). Cependant, l'allèle sauvage continue possiblement d'exercer une fonction biologique, puisque dans la majorité des situations, la mutation de *TP53* est isolée par perte de l'allèle non-muté(Baker et al., 1989; Lodé et al., 2010). Une explication alternative serait que la délétion du locus concerne un autre gène dont la fonction biologique est non-caractérisée à ce jour(Liu et al., 2016).

La perte du programme transcriptionnel de p53 n'est pas la seule conséquence des mutants de *TP53*, c-à-d les conséquences biologiques diffèrent entre la perte totale de *TP53* et la mutation de *TP53*, traduisant un gain de fonction (GOF) du mutant. Les

modèles murins ont eu un apport déterminant dans cette démonstration. En effet, les histologies, les temps de survenue et l'invasivité des tumeurs spontanées diffèrent entre les souris *TP53^{KO}* (principalement des lymphomes T et des sarcomes) et les *TP53^{mut}* (phénotype de Li-Fraumeni avec un spectre tumoral beaucoup plus large, dont les carcinomes)(Donehower et al., 1992; Lang et al., 2004; Olive et al., 2004). Les différents mutants *TP53* démontrent également, dans la souris, des spectres tumoraux différents. Ces données se confirment chez les patients Li-Fraumeni : les patients porteurs d'un *p53^{KO}* ou non-sens ont une durée moyenne de survenue de néoplasies presque deux fois plus longue que des patients porteurs de *TP53^{Mut}* (R248Q), bien que des différences phénotypiques existent également entre variants(Hanel et al., 2013; Xu et al., 2014). Cette caractéristique du GOF et de la dominance négative de p53 se retrouve également au travers de son spectre mutationnel, majoritairement composé de faux-sens, tandis que de nombreux autres gènes suppresseurs de tumeurs présentent des anomalies abrogeant toute expression et/ou fonction (Cox et al., 2005; Petitjean et al., 2007; Soussi and Wiman, 2015). Une des caractéristiques des mutants p53 faux-sens est la forte accumulation de protéines p53 dans le noyau de la cellule, renforçant la dominance négative et pouvant possiblement permettre des réponses moins spécifiques à *p53^{mut}*. La baisse du niveau d'expression de Mdm2 (par interruption de la boucle de rétrocontrôle) n'est pas la seule explication à cette stabilisation de *p53^{mut}*. Le groupe de Moll a apporté une réponse à la question : les mutants de p53 forment des complexes avec Mdm2, CHIP (une autre E3 ligase de p53) et deux Heat-Shock-Proteins (HSP70/90). Ce complexe abolit les activités E3 ligase de Mdm2 et CHIP, empêchant totalement l'ubiquitylation de p53 et sa stabilisation(Li et al., 2011). De façon surprenante, les résidus en N- et C-terminal de p53 sont très peu sujets aux mutations somatiques. Cette absence de mutants interroge : leur impact pro-tumoral est-il faible ? ou ne sont sélectionnés que des mutants p53 aux extrémités « fonctionnelles », permettant l'expression du GOF?

Les mécanismes des GOF de p53 sont résumés dans une revue de Muller(Muller and Vousden, 2013). P53 peut se lier à des facteurs de transcriptions et moduler leur fonction *via* le recrutement de cofacteurs supplémentaires(Girardini et al., 2011; Liu et al., 2011; Strano et al., 2002). Ce mécanisme est bien décrit suite à des dommages à l'ADN par un inhibiteur de topoisomérase : la présence d'un mutant p53 est à l'origine du recrutement anormal d'une acétyl-transférase (p300) plutôt que d'une déacétylase

(HDAC1) avec NF-Y sur les promoteurs cibles de ce dernier, à l'origine d'une sur-expression de gènes du cycle cellulaire (Di Agostino et al., 2006; Liu et al., 2011; Walerych et al., 2016). Le processus inverse peut également être constaté avec une diminution d'expression. Les partenaires de *TP53^{Mut}* semblent être mutant dépendant (certains mutants partageant plusieurs facteurs de transcription « cibles »), par exemple : Yap-1, NF-Y, p73, ou Nrf2 (Kim and Lozano, 2018). Par exemple, plusieurs expérimentations de Chip-on-Chip ont permis d'identifier des partenaires privilégiés de *TP53^{R175H}*, qui semblent communs au cancer du sein et du poumon (lignées SKBr3 et H1299) (Dell'Orso et al., 2011; Stambolsky et al., 2010). *P53^{mut}*, comme *p53^{sauvage}* peut également agir de façon non-transcriptionnelle sur les protéines et enzymes cellulaires, et voir ses interactions modifiées, par exemple avec l'AMPK (cyclase AMP-dépendante) (Zhou et al., 2014). Un dernier mécanisme, de moins en moins évoqué dans la littérature serait la reconnaissance de motifs d'ADN de type *p53^{mut}-RE*, cependant, ces zones spécifiques des résidus mutés de p53 (non reconnus de *p53^{sauvage}*) n'ont pas été caractérisées. L'hypothèse d'une activation non-liée à une séquence spécifique mais à une conformation protéique est possible, par exemple dans les zones d'arrimage de l'ADN à la matrice nucléaire (Göhler et al., 2002; Will et al., 1998).

Le spectre des inactivations de p53 est dépendant des types tumoraux et des tissus d'origine. En effet, les inactivations directes de p53 dans les carcinomes (des *epithelia* sécréteurs ou non) touchent en majorité *TP53* par mutation (entre 20% et 43% des cas, p53.iarc.fr, Révision 18), tandis que les sarcomes, rétinoblastomes et mélanomes inactivent très fréquemment les acteurs de régulation de p53 : Mdm2, Mdm4 ou HAUSP (Barretina et al., 2010; Gembarska et al., 2012; Laurie et al., 2006), enfin d'autres « panachent » les anomalies. Un sous-type histologique très particulier, les carcinomes épidermoïdes associés au papillomavirus humain (HPV16/18), expriment des protéines virales (E6-E7) capables d'inactiver directement p53 (Thomas et al., 1999). Enfin, au sein des types tumoraux, certaines mutations et signatures mutationnelles sont enrichies par rapport aux autres types tumoraux, en particulier par l'exposition aux mutagènes environnementaux (les rayonnements ultra-violet dans les carcinomes cutanés, le benzo(a)pyrene dans l'adénocarcinome pulmonaire du patient fumeur, etc...) (Denissenko et al., 1996; Giglia-Mari and Sarasin, 2003; Pfeifer et al., 2002).

Le Myélome Multiple

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne B mature, caractérisée par la prolifération tumorale de plasmocytes (Swerdlow et al., 2016). Avec plus de 4500 cas par an, le MM est une des hémopathies malignes les plus fréquentes en France (14%, INVS 2012). L'incidence est de 6.3 (/100000) pour les femmes européennes et 4.4 pour les hommes européens avec un âge médian au diagnostic de 75 et 72 ans, pour les femmes et les hommes, respectivement, Figure 9 (INVS 2012).

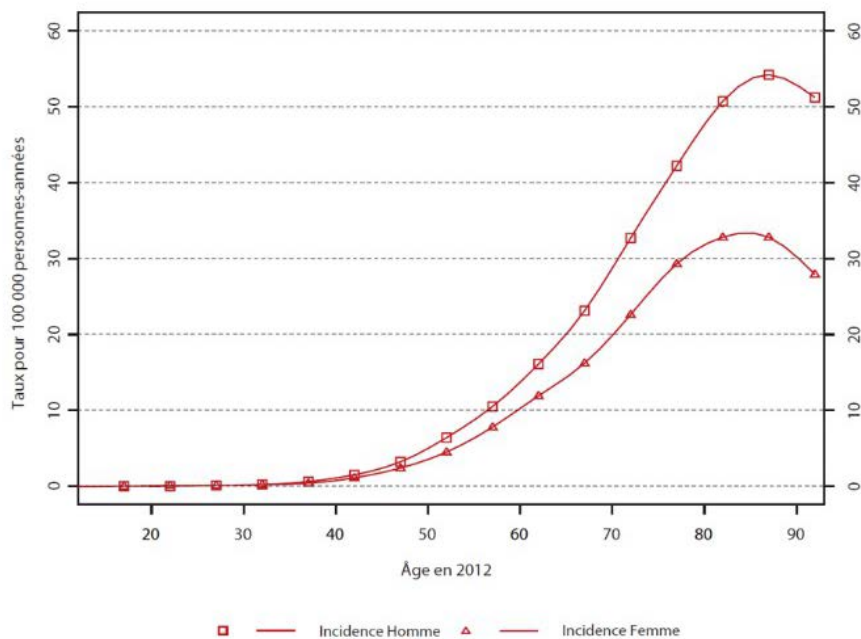


Figure 9 : Incidence par âge en 2012 - Myélome multiple & plasmocytome

Le MM fait partie du spectre des néoplasies à cellules plasmocytaires, qui présente comme autres entités la gammopathie monoclonale de significativité indéterminée IG-G/-A (GMSI, ou MGUS), la leucémie plasmocytaire (primaire ou secondaire), le plasmocytome (osseux) solitaire, le plasmocytome extra-osseux, le POEMS, l'amylose AL et la maladie des dépôts de chaînes d'immunoglobulines (Swerdlow et al., 2016).

Stratification

Les critères diagnostiques des MGUS et du myélome multiple ont évolué au cours de ces 20 dernières années, afin de mieux définir les différentes pathologies et leur prise en charge.

La MGUS est définie par une plasmocytose médullaire inférieure à 10%, un pic monoclonal d'immunoglobuline inférieur à 30g/L et l'absence de signes cliniques d'atteinte d'organe du myélome (critères CRAB définis plus bas).

Le myélome multiple symptomatique est défini par la présence d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10% et la présence d'au moins un critère d'atteinte d'organe (Kyle and Rajkumar, 2009) définissant les critères C(alcemia) R(renal impairment) A(nemia) B(one lesion) : une hypercalcémie (>2.75mM), une insuffisance rénale (clairance de la créatinine <40mL/min), une anémie (<10g/dL, ou -2g/dL par rapport à la norme inférieure du laboratoire) et/ou au moins une lésion osseuse ostéolytique (ou un plasmocytome).

Depuis 2003, un consensus a dessiné les contours d'une catégorie intermédiaire entre myélome et MGUS, le myélome indolent (SMM): plasmocytose >10%, pic d'immunoglobulines >30g/L, protéinurie de chaînes légères libres significative (>0.5g/24H) et absence de critères CRAB (Durie et al., 2003; Kyle and Greipp, 1980).

Ces critères diagnostiques ont été révisés par l'International Myeloma Working Group (IWMMG) en 2014 (Rajkumar et al., 2014). Cette modification visait à identifier des patients asymptomatiques porteurs de SMM et à haut risque de progression clinique, sous la forme d'évènements potentiellement mortels (hypercalcémie) ou à forte morbidité (insuffisance rénale, fractures, compressions médullaires, etc...). Bien qu'adoptés, ces critères sont issus de cohortes rétrospectives parfois restreintes, générées de façon hétérogène, au sein de différents groupes coopérateurs (Hillengass et al., 2010; Kastiris et al., 2014; Larsen et al., 2013; Rajkumar et al., 2011). Ces SMM à « haut risque de progression » (80% d'évènement CRAB dans les 2 ans) présentent des Myeloma Defining Events (MDE) : une plasmocytose médullaire >60%, un déséquilibre de chaîne légère supérieur à 100 et plus d'une lésion focale détectée à l'IRM. Cependant, les consensus fluctuent entre groupes coopérateurs et de nouveaux critères apparaissent ou se raffinent (Wu et al., 2018). L'incidence exacte des SMM de haut risque n'est pas connue. Il s'agit d'une pathologie asymptomatique et une seule

étude suédoise de registre de MM mettait en évidence un taux de 4.2% au sein des MM, probablement sous-évaluée compte-tenu de la non-exhaustivité de l'étude(Kristinsson et al., 2013).

Ainsi, le terme de myélome multiple symptomatique, qui définissait les patients ayant besoin d'un traitement a perdu de son sens, puisque tous les MM (avec des critères CRAB ou des critères MDE) sont désormais traités.

Plusieurs formes cliniques se distinguent et sont regroupées dans la table 1.

Entité	Définition	Présentation clinique
Myélome Multiple / SMM	Prolifération plasmocytaire intra-médullaire	Peuvent s'associer à des atteintes osseuses focales
Plasmocytome Solitaire	Localisation osseuse isolée sans dissémination ni infiltration médullaire	Seule forme « guérissable » à l'heure actuelle
Plasmocytomes osseux multiples	Plasmocytomes développés aux dépens de l'os, en continuité de la moelle osseuse.	Tumeurs osseuses (rachis, côtes, crane, bassin)
Formes extra-médullaires	Plasmocytomes des tissus mous ou infiltration plasmocytaire d'un site distant de la moelle osseuse. Secondaires à une dissémination hématogène	Atteintes des tissus mous (peau, foie, reins, adénopathies, système nerveux central...) ou des cavités naturelles (plèvre, péritoine).
Leucémie plasmocytaire primaire (pPCL)	Présence dans le sang , au diagnostic, de plus de 20% de plasmocytes malins ($>2.10^9/L$)	Les atteintes extra-médullaires sont très communes dans les PCL.
Leucémie plasmocytaire secondaire (sPCL)	Présence dans le sang , après traitement, de plus de 20% de plasmocytes malins ($>2.10^9/L$)	

Table 1. Formes cliniques des principales proliférations plasmocytaires tumorales. D'après Touzeau et al. 2016

Les formes extra-médullaires et les leucémies à plasmocytes, se caractérisent par leur capacité à se développer en dehors de la niche tumorale médullaire, et infiltrer le sang, les tissus mous (peau, foie, reins, système nerveux central...) ou les cavités naturelles (plèvre, péritoine). Ces patients ont une durée de survie extrêmement restreinte avec une médiane de 6 à 12 mois, en dépit de l'amélioration des prises en charge(Larrea et al., 2013; Touzeau and Moreau, 2016; Usmani et al., 2012).

Biologie du myélome

Le plasmocyte : un sécréteur dans la lymphopoïèse B

Le plasmocyte est le résultat de la différenciation terminale de la lymphopoïèse B, à l'origine de la réponse humorale (Nutt et al., 2015). Bien qu'appartenant au lignage B, la morphologie du plasmocyte, son transcriptome et sa localisation le rendent unique par sa capacité à sécréter des immunoglobulines (Nutt et al., 2015). Brièvement, les réarrangements des loci des chaînes d'immunoglobulines V(D)J permettent l'assemblage et l'expression du récepteur cellulaire B (BCR) et la migration des précurseurs-B médullaires vers les organes lymphoïdes secondaires. Une voie indépendante des lymphocytes T, permet la synthèse rapide d'immunoglobulines de faible affinité par des plasmablastes à faible persistance (Martin and Kearney, 2002; Oracki Sarah A. et al., 2010). Cependant, la réponse B humorale adaptative a besoin de la stimulation antigénique et de l'aide de lymphocytes T pour produire une réponse immunitaire prolongée et très affine. Ce double signal entraîne la prolifération des lymphocytes B naïfs (lymphoblastes) au sein du centre germinatif nouvellement formé. Cette prolifération est associée aux hyper-mutations somatiques des régions hypervariables du BCR, et sont le résultat de deux phénomènes conjugués : la déamination des cytosines en uracile (par l'Activation-Induced [Cytidine] Deaminase, AID) et la réparation de ces modifications de bases. De nombreuses voies concourent à cette réparation plus ou moins fidèle et la caractérisation de ce phénomène est essentielle à la compréhension de la genèse des translocations récurrentes et de l'acquisition de certains mutants du MM, en particulier sur les gènes cibles des translocations (Abdouni et al., 2018; Álvarez-Prado et al., 2018; Kumar et al., 2018; Nicolas et al., 2018).

Deux types cellulaires seront générés par compétition d'affinité et après la commutation isotypique : les lymphocytes B mémoire et les plasmocytes, tous deux de durée de vie longue et de haute affinité pour l'antigène (Tangye et al., 2013). Les plasmocytes se différencient des B mémoire par l'expression de facteurs de transcription indispensables à l'acquisition du phénotype sécréteur : la X-box-binding protein 1 (X-BP1), l'interferon-regulatory factor 4 (IRF4) et BLIMP1/PRDM1 (Basso and Dalla-Favera, 2012, 2015; Diehl et al., 2008), une part importante de ces modifications d'expression sont sous la dépendance de BCL-6, et en particulier du miR-125b (ciblant BLIMP et IRF3) (Gururajan et al., 2010). La localisation médullaire des plasmocytes

sécréteurs est le résultat de la migration des plasmablastes dans le sang, puis du homing et de l'ennichement d'une sous-population seulement (Blink et al., 2005; Kabashima et al., 2006). Ces plasmocytes médullaires, mettent sous silence leur programme de cycle cellulaire en particulier de MYC (cible du programme répresseur de PRDM1) et ne prolifèrent plus (Lin et al., 2000, 1997). Les plasmocytes malins sont majoritairement porteurs de chaînes d'immunoglobuline commutées (non Ig-D/-M) et hyper-mutées, signant leur caractère post-centre germinatif (Bakkus et al., 1992).

Evènements cytogénétiques

Le myélome multiple est invariablement précédé par l'apparition du clone MGUS (Landgren et al., 2009; Weiss et al., 2009). Ce clone pré-malin (qui peut être détecté plus de 8 ans avant le diagnostic de MM) est porteur d'anomalies cytogénétiques acquises au cours de la lymphopoïèse B, probablement lors des hyper-mutations somatiques et de la commutation isotypique, deux processus qui nécessitent des cassures double brins de l'ADN et leurs réparations par recombinaison.

Evènements cytogénétiques primaires

Ces évènements oncogéniques primaires (détectés dès le stade MGUS et à l'origine probable du développement tumoral) regroupent les hyper-diploïdies (gains de copie des chromosomes impairs 3,5,7,9,11,15,19 et 21, n=48-74) et les translocations récurrentes (Avet-Loiseau et al., 2002; Fonseca et al., 2002; Morgan et al., 2012). De façon intéressante, la quasi-totalité des évènements oncogéniques primaires s'accompagne d'une dérégulation (sur-expression) des cyclines D : CCND1, CCND2 ou CCND3 par des mécanismes directs (produit de translocation, hyperdiploïdie) ou indirects (fixation de cMaf sur le promoteur de CCND2 (Hurt et al., 2004)), cependant sans corrélation directe avec l'index de prolifération cellulaire (Bergsagel et al., 2005).

- L'hyperdiploïdie (HD) concerne 50% des patients au diagnostic (MGUS, SMM, ou MM) (Chng et al., 2011), et est constituée par une trisomie de la majorité des chromosomes impairs. Le mécanisme sous-jacent expliquant un gain si important de chromosomes serait le recouvrement depuis une catastrophe mitotique, comme observé dans la leucémie aigüe lymphoblastique (Debes-Marun et al., 2003; Onodera et al., 1992). Une dérégulation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau (spindle assembly checkpoint), à l'origine d'une ségrégation asymétrique des chromatides pourrait également expliquer la

fréquence de ces trisomies(Chretien et al., 2015; Díaz-Rodríguez et al., 2011; Gisselsson et al., 2010). Au-delà de ce regroupement cytogénétique, ce groupe de patient est hétérogène. En effet, par analyse transcriptomique, si la surexpression des gènes de synthèse protéique et de transcription est commune aux HD, plusieurs groupes de pronostics différents sont individualisés (IL6, Cycle Cellulaire et NFκB). Les HD peuvent présenter des translocations récurrentes, le peu d'échantillons analysés ne permettant cependant pas d'établir avec précision la séquence des évènements(Pawlyn et al., 2015).

- Les translocations récurrentes surviennent chez un patient sur deux, et juxtapose le promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines (14q32.33) à plusieurs partenaires privilégiés (table 2)(Sonneveld et al., 2016). De façon rare (<5%) le promoteur des chaînes légères est utilisé (κ en 2p11.2 et λ en 22q11.22)

Evènements génomiques primaires				Evènements génomiques secondaires			
Evènement		Gènes (s)	Fréquence (%)	Evènement		Gènes (s)	Fréquence (%)
Translocation avec promoteur chaînes lourdes				Délétion de bras chromosomique ou focale			
	t(4;14)	<i>FGFR3/ MMSET</i>	15		1p	<i>CDKN2C [1.5%], FAF1, FAM46C</i>	30
	t(6;14)	<i>CCND3</i>	4		6q		33
	t(11;14)	<i>CCND1</i>	20		8p		25
	t(14;16)	<i>MAF</i>	4		13	<i>RB1, DIS3</i>	44
	t(14;20)	<i>MAFB</i>	1		11q	<i>BIRC2/BIRC3</i>	7
Hyper-Diploïde					14q	<i>TRAF3</i>	38
	Gains chromosomiques	NA	50		16q	<i>WWOX, CYLD</i>	35
	3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21				17p	<i>TP53</i>	7
				Amplification			
					1q	<i>CKS1B, MCL1, ILF2</i>	30

Translocations			
	t(8 ;14)	MYC	20

Table 2. Fréquence des évènements cytogénétiques primaires/secondaires (au diagnostic). Adapté de Sonneveld et al. (Sonneveld et al., 2016)

Evènements cytogénétiques secondaires

Ces évènements cytogénétiques secondaires surviennent au sein des sous-clones et selon un processus darwinien favorisant l'émergence du clone porteur sous forme d'une maladie active (Avet-Loiseau et al., 2001; Hultcrantz, 2017; Manier et al., 2017; Morgan et al., 2012; Walker et al., 2014a). Un évènement précipitant dans cette transformation est l'acquisition d'une surexpression de c-Myc, la majorité (67%) des MM présente une surexpression des gènes cibles de ce dernier alors que ce phénomène est rare au stade MGUS (Chesi et al., 2008; Chng et al., 2011). Les mécanismes à l'origine de cette surexpression sont multiples : transcriptionnel, génomique (gains de copie et translocations) et stabilisation protéique (MAPK) (Carrasco et al., 2006; Sears et al., 2000; Shaffer et al., 2008). En particulier, les translocations impliquant MYC s'enrichissent de façon très significative depuis les stades MGUS/Indolent (<5%) à MM (15-20%) (Avet-Loiseau et al., 2001; Walker et al., 2014a, 2015a). Ces dernières impliquent les promoteurs des chaînes d'immunoglobulines (chaînes lourde >>> chaînes légères), mais également des promoteurs de *FAM46C*, *FOXO3*, *PRDM1*, *NSMCE2* et *TXNDC5* (Affer et al., 2014; Walker et al., 2015a). Au sein des évènements cytogénétiques secondaires, la délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)), occupe une place particulière : rare au diagnostic, elle s'enrichit avec les rechutes et est associée à un pronostic particulièrement défavorable lorsqu'elle est retrouvée au diagnostic ou acquise (Gertz et al., 2005; Herrero et al., 2016; Moreau et al., 2014; Weinhold et al., 2016).

Evènements mutationnels : plus de voies que de gènes

Depuis les premiers séquençages de génome entier, il est devenu évident que le MM ne présente pas de gène invariablement muté, qui présiderait à l'oncogénèse du plasmocyte malin (Chapman et al., 2011). Cependant, plusieurs voies de signalisation

sont fréquemment mutées au diagnostic, concourant à la survie et à la sélection d'un clone tumoral.

La voie des Mitogen-Associated Protein Kinases(MAPK)

Cette cascade de kinase intègre la majorité des signaux extracellulaires de croissance (Epithelial Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblastic Growth Factor, ...) se liquant aux récepteurs à tyrosines kinases transmembranaires. Les mutants de *KRAS* et *NRAS* touchent 40% des patients au diagnostic et plus de 50% à la rechute, constituant les principaux mutants de la voie MAPK(Walker et al., 2018). Ces mutants faux-sens activateurs concernent les codons hot-spots 12, 13 et 61 (99.2% des mutants des séquences homologues de *N-/K-* et *HRAS* recensés), qui forment les boucles protéiques (1, 2 et 4). L'augmentation de l'affinité de ces boucles pour le nucléotide GTP permet l'activation constitutive de RAS (Prior, Lewis, & Mattos, 2012). Le MM est la seule hémopathie B mature à présenter une si forte proportion de mutants de la voie MAPK (Tessoulin et al., 2017). Ces mutants sont hétérozygotes, avec une fréquence allélique d'environ 33%, ces données sont en faveur de 1) leur caractère oncogénique et dominant et 2) d'une hétérogénéité intra-tumorale importante, potentiellement à l'origine d'un échec de thérapies ciblées(Heuck et al., 2016; Walker et al., 2015b). Au cours de l'évolution clonale, les anomalies de cette voie MAPK augmentent, bien qu'individuellement les mutants *RAS* puissent être perdus ou gagnés, au cours de l'évolution et de la dominance des clones(Weinhold et al., 2016).

La voie NFκB : une activation essentielle

La stimulation des plasmocytes intramédullaires par le microenvironnement est indispensable à leur survie et s'effectue majoritairement par la transduction du signal par la voie NFκB(Elgueta et al., 2010). De puissants activateurs de NFκB sont produits par le stroma médullaire, sous forme soluble (APRIL, BAFF, RANKL) ou cellulaire (CD40L)(Hayden and Ghosh, 2004; Romagnoli et al., 2007). Le plasmocyte malin conserve cette forte dépendance à la voie NFκB, et 82% des patients présentent une surexpression des acteurs de la voie NFκB(Annunziata et al., 2007; Demchenko and Kuehl, 2010). La famille des facteurs de transcription NFκB est constituée de cinq membres (sous-unités, p50/p105, p52/p100, RelA, RelB et c-Rel) se combinant par homo-/hétéro-dimérisation et dont le programme transcriptionnel recouvre la réponse immune (TNFα, IL-1, IL-8), la prolifération cellulaire (CyclinD1, CyclinE, CDK2, c-MYC)

et la survie cellulaire (Bcl-2, Bcl-X_L, TRAF1/2, XIAP, c-FLIP)(Bassères and Baldwin, 2006; Hayden and Ghosh, 2004). Les lignées humaines de myélome multiple, majoritairement dérivées de formes extra-médullaires de MM, présentent une forte sur-activation de leur voie NFκB sans microenvironnement, cette sur-activation est en grande partie due à des mutations des régulateurs de la voie(Annunziata et al., 2007; Romagnoli et al., 2007). De même, chez les patients au diagnostic, une atteinte d'au moins un acteur de la voie NFκB, à l'origine de sa sur-activation est retrouvée dans 14% des cas(Walker et al., 2018).

La voie p53

Les hémopathies malignes, contrairement à la majorité des tumeurs solides (en particulier des carcinomes) se présentent avec peu d'anomalie de p53 au diagnostic. Ainsi, les anomalies touchant le locus *TP53* en 17p13 sont rares au diagnostic de MM(<10%) mais s'acquièrent avec la progression, constituant un tournant dans l'histoire individuelle de la pathologie.

Les atteintes de la voie p53 dans le MM sont principalement liées à des altérations de *TP53*. Les délétions du locus 17p13 concernent 10% des patients au diagnostic, le plus souvent hétérozygotes, et dans une proportion variable au sein de la population des plasmocytes malins d'un patient (médiane de 75%, extrêmes :30-100%)(Avet-Loiseau et al., 2007; Drach et al., 1998). Les mutants de *TP53* sont encore plus rares au diagnostic (~5.5%), et sont concentrés dans les patients porteurs d'une délétion 17p, constituant le tableau classique de gène suppresseur de tumeur avec perte d'hétérozygotie et inactivation bi-allélique, Table 3(Chapman et al., 2011; Lodé et al., 2010; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2015a; Weinhold et al., 2016). Au sein des leucémies à plasmocytes primaires, les anomalies de *TP53* sont de 25% au diagnostic (30% de délétions et 25% de mutations)(Lionetti et al., 2016; Royer et al., 2016). Une étude récente qui colligeait 101 patients atteints de leucémies à plasmocytes secondaires rapporte une délétion du locus 17p13 dans 46% des cas(Jurczyszyn et al., 2018).

A la rechute, les proportions de mutants et délétions de *TP53* augmentent, touchant plus de 15% des patients. Les formes extra-médullaires leucémisées secondaires sont touchées dans 20% des cas(Lionetti et al., 2016). Weinhold rapporte l'expérience de 5 patients (sur 33 testés) ayant développé un clone avec un deuxième évènement sur

TP53 à la rechute, ce deuxième évènement était contemporain de l'acquisition d'un phénotype extra-médullaire ou leucémisé et d'une survie de moins d'un an (Weinhold et al., 2016).

D'autres acteurs de la voie p53 peuvent être altérés, en particuliers les régulateurs directs de p53. Le locus de *MDM2* est porté par le bras long du chromosome 12 avec des amplifications retrouvées dans 8% des cas (Elnenaei et al., 2003; Quesnel et al.). Les autres acteurs de l'ubiquitinylation de p53 (*Mdm4*, *HAUSP*, *Pirh2*, *Cop1*, *ARF-BP1* ou *CHIP*) ne semblent pas concernés par des anomalies dans le MM.

Des évènements épigénétiques interviennent également pour moduler la voie p53 dans le MM. Le gène *CDKN2A* est traduit en deux facteurs protéiques par lecture alterne du cadre, *INK4a* et *p14^{ARF}* (Quelle et al., 1995). *Arf* permet la stabilisation de p53, en se complexant à *Mdm2* mais réduit également la traduction en se complexant à la nucléophosmine (*NPM*, responsable entre-autres, de la conformation des ARN ribosomiaux) (Bertwistle et al., 2004; Sherr, 2006). Les atteintes par délétions ou mutations de *CDKN2A* sont rares chez les patients atteints de MM (<1%), cependant, l'hyper-méthylation de son promoteur est un évènement observé dès le stade MGUS (15%) et jusqu'aux stades MM (37%) et sPCL (29%). Cependant, des données contradictoires sur cette hyperméthylation sont retrouvées dans la littérature, qui interviendrait très tardivement dans le développement tumoral (Dib et al., 2007; Gonzalez-Paz et al., 2007; Tiedemann et al., 2008; Yu et al., 2017). La signalisation IL-6, majeure dans la survie du myélome, serait impliquée dans la maintenance de la méthylation du promoteur de *TP53* (Hodge et al., 2005). Enfin, l'équipe de Croce a mis en évidence un mécanisme indirect de modulation de l'activité de p53, via les miR-32/-106b/-181a. Ces derniers ciblent *PCAF*, un cofacteur de l'activité acétylase de p300 (p300-CBP-Associated Factor). Ces miRNA sont sur-exprimés dans les MGUS et les MM et réduisent l'activité de p53 (Pichiorri et al., 2010). Les autres modificateurs post-traductionnels de p53 ont été peu étudiés, cependant, de nombreuses altérations des enzymes dé-acétylases et méthyl-transférases surviennent à la rechute, pouvant modifier les niveaux d'acétylation et méthylation de p53, et son activité biologique (Pawlyn et al., 2016).

Diagnostic (%)	Gène	Rechute (%)
21,3	KRAS	24,7
19,3	NRAS	24,0
10,0	DIS3	12,7
7,1	BRAF	9,3
6,9	FAM46C	8,0
5,7	RB1	3,1
5,5	TP53	18,4
4,5	TRAF3	3,0
4,3	EGR1	4,3
3,9	CDKN2C	5,1
3,8	TET2	3,8
3,8	FANCA	5,8
3,5	ATM	1,7
3,1	LTB	1,3
3,1	PRKD2	2,6
2,8	IRF4	4,7
2,8	FGFR3	0,9
2,2	SP140	4,3
2,1	PRDM1	5,3
1,5	BIRC3	2,3
1,2	ATR	0,0

Table 3. Principales alterations géniques au diagnostic et à la rechute. Mutations et pertes (délétions bialléliques) ont été agrégées des études Chapman et al., Lohr et al, Walker et al., Weinhold et al. et Chavan et al.(Chapman et al., 2011; Chavan et al., 2017; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2018; Weinhold et al., 2016).

Evènements épigénétiques

Un processus d'adaptation majeur des cellules eucaryotes est la régulation épigénétique de leur matériel nucléaire. En particulier, le niveau de méthylation des promoteurs des gènes et les modifications d'histones (méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitination) modifient profondément l'expression génique (Cedar and Bergman, 2009; Chi et al., 2010). Les mutations des enzymes/protéines modifiant les marques épigénétiques sont présents chez plus de 50% des patients au diagnostic et augmentent avec la progression (par exemple, 17% vs 6.9% pour les méthyltransférases d'histones). Ces anomalies sont potentiellement à l'origine d'une instabilité génétique transcriptionnelle et structurelle (Pawlyn et al., 2016). En particulier, les patients t(4;14) présentent une sur-expression du gène 'multiple

myeloma SET domain' (MMSET/ WHSC1/ NSD2) associée à des modifications de leurs motifs de méthylation de l'ADN et des marques d'histone H3K36^{me2} et H3K27^{me3}, possiblement à l'origine de la dérégulation transcriptionnelle et de l'impact pronostic péjoratif de cette translocation (Chesi et al., 1998; Martinez-Garcia et al., 2011). Par ailleurs, la surexpression d'EZH2, agissant sur l'H3K27, est également associée à un pronostic négatif dans le MM, possiblement *via* la mise sous silence de bloqueurs du cycle (*CDKN1A*, *CDKN2B*) (Pawlyn et al., 2017a).

Les anomalies de méthylation de l'ADN font partie de l'histoire naturelle du MM. En effet, la transition du MGUS au MM s'accompagne quantitativement d'une hypométhylation globale (hors îlots CpG) et qualitativement d'une hyper-méthylation gène-spécifique (gènes suppresseurs de tumeurs : *CDKN2B*, *BCL2*, *GPX3*, *RBP1*, *TP73*, *SPARC* et *TGFBI*) (Alexandrova and Moll, 2012; Heuck et al., 2013; Kaiser et al., 2013; Walker et al., 2011). De façon inattendue, la transition de MM à PCL ne s'effectue pas par une accentuation de l'hypométhylation globale mais par une hyper-méthylation, qui concerne 75% des gènes déméthylés à la transition précédente : signalisation intercellulaire, développement cellulaire/différentiation et adhésion cellulaire (Walker et al., 2011).

Pour finir, les microARN permettent un contrôle post-transcriptionnel des ARN messagers, cependant peu de données convaincantes ont émergé des études menées, et en particulier il existe un faible chevauchement de miRNA identifiés d'une étude à l'autre, en dehors ceux régulant p53 (Dimopoulos et al., 2013; Wong et al., 2012).

Evolution clonale

Le développement tumoral est un processus multi-étagé, fait d'insuccès tumoraux et de sélections itératives de clones (Nowell, 1976). En effet, le risque de développement d'un MM depuis le stade de MGUS est seulement de 1% par an. Cette latence est évocatrice d'un processus darwinien de sélection par le micro-environnement : l'écosystème (spontané, ou modifié par un traitement) exerce une pression de sélection sur la tumeur, favorisant l'émergence d'un clone généré stochastiquement et qui présente un avantage en survie, alors que d'autres clones disparaissent ou ne s'imposent pas (Greaves and Maley, 2012). Au sein des clones sélectionnés, des anomalies (génétiques ou épigénétiques) confèrent l'avantage en survie et sont

« driver » tandis que la majorité des autres anomalies, sont passagères. Ces dernières pourront intervenir dans un 2^{ème} temps, en cas de modification de l'écosystème et des pressions thérapeutiques par exemple.

Les histoires naturelle et thérapeutique du MM suggèrent une évolution clonale par la transformation d'une forme non tumorale MGUS, vers une forme indolente, puis MM ou pPCL et finalement, après traitement, sPCL ou MM extra-médullaire. L'un des éléments évocateurs de cette « filiation » est la persistance chez un même patient de l'anomalie cytogénétique 1^{re} au cours de l'évolution de sa pathologie plasmocytaire. Au regard de l'évolution clonale, le caractère primaire de l'anomalie doit cependant être nuancé. En effet, la proportion du clone porteur de l'anomalie est d'environ 50% au stade MGUS et progresse à 70-80% des plasmocytes anormaux au stade MM, ce qui traduit une réduction de la diversité clonale au cours des traitements (An et al., 2015; López-Corral et al., 2011, 2012). L'ensemble des études de séquençage et d'hybridation compétitive des plasmocytes tumoraux a mis en évidence une prolifération oligo-clonale chez la majorité des patients, avec un clone majoritaire et plusieurs sous-clones (Bolli et al., 2014; Chapman et al., 2011; Keats et al., 2012; Lohr et al., 2014; Magrangeas et al., 2013; Walker et al., 2015a; Weston-Bell et al., 2013). Les travaux de B. Walker ont démonté la présence de ces clones à tous les stades de la pathologie (Figure 10).

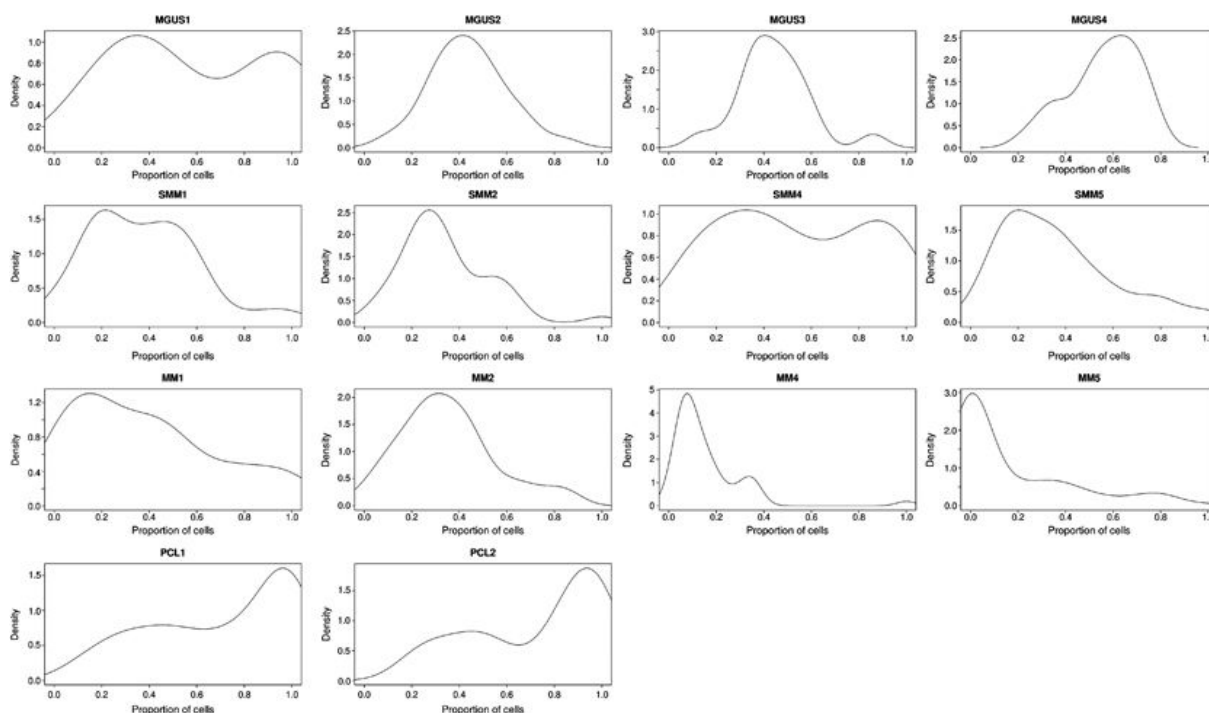


Figure 10: Illustration de la présence de sous-clones au sein des données de séquençage de l'étude de Walker et al. 2014. La présence de multiples pics est évocatrice de sous-clones. MGUS : Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance, SMM : Smoldering Myeloma, PCL : plasma cell leukemia.

Le suivi des anomalies au cours de la progression de la pathologie met en évidence une majoration des anomalies du nombre de copies (CNA) et des mutants chez les patients (Keats et al., 2012; Mailankody et al., 2017; Walker et al., 2014b). Quatre à 7 clones coexistent chez les patients porteurs d'un MM, qui existaient dans les formes SMM dans une très faible proportion (Lohr et al., 2014; Melchor et al., 2014; Walker et al., 2014b).

Le mécanisme d'évolution est dans 2/3 des cas par branchement à partir d'un clone initial tandis que 15% des évolutions sont linéaires (Weinhold et al., 2016). Cette diversification clonale majoritaire par branchement définit la diversité intra-clonale. La première étude génomique "cellule unique" (sur 6 patients) sans inférence par déconvolution de signal, a confirmé les résultats sur ADN mélangé et la coexistence des schémas linéaires et branchés. Peu de marqueurs de progression ont été mis en évidence dans les études avec échantillons appariés, mais le nombre d'échantillons analysé reste limité (moins de 20 patients avec données WES : *RB1*, *BRCA2*, *RUNX2*). Weinhold note cependant un enrichissement, déjà constaté sur des cohortes

non appariées, des anomalies de *TP53* et de la voie PI(3)K/RAS(Weinhold et al., 2016).

D'un point de vue clinique ce comportement clonal apporte deux éclairages importants dans nos prises en charge :

- La nécessité d'un traitement combiné chez les patients, pour prévenir l'émergence d'un clone sélectionné et augmenter les chances d'efficacité.
- Considérer des retraitements, en échec au temps thérapeutique n-2. L'étude sériée de Bolli *et al.* a très bien montré l'exemple d'un patient avec un clone de 2^{ème} rechute identique au clone du diagnostic, eux-mêmes différents du clone de 1^{ère} rechute.

Pour finir, une constatation cytogénétique intéressante a été réalisée par une équipe allemande, à partir des données de l'HOVON65/GMMG-HD4. Les patients qui présentaient un haut risque cytogénétique (del 17p13, gain 1q21, et t(4;14)) sans sous-clones (détectés par cytogénétique/FISH seulement) avaient une survie meilleure (75% vs 50% à 6ans) que les patients avec un sous-clone(Merz et al., 2018). Ces derniers résultats sous-tendent que la résistance pré-existe au traitement et que le sous-clone le plus adapté est rapidement sélectionné par le traitement.

Microenvironnement

Le microenvironnement est essentiel à la survie des plasmocytes tumoraux, en effet, la durée de vie des plasmocytes en dehors de leur niche tumorale est très courte. Depuis le stade MGUS jusqu'au MM, le plasmocyte malin prolifère par l'intégration de signaux du micro-environnement, dont l'un des acteurs principaux est la cellule stromale (BMSC). Cette dernière sécrète des facteurs de croissance essentiels tels que l'IL6 ou l'IGF-1. Ces sécrétions activent les voies de prolifération et de survie telles NFκB, MAPK et PI3K/Akt (Kawano et al., 1988; Mantovani and Garlanda, 2006), et *via* une boucle longue, permettent la synthèse de facteurs de croissance par la cellule tumorale, enrichissant en retour sa niche tumorale(Manier et al., 2012). L'IL-6 et l'IGF1 sont également des facteurs majeurs de la survie plasmocytaire, en induisant l'expression d'anti-apoptotiques (BCL-XI, Mcl-1)(Chauhan et al., 1997; De Bruyne et al., 2010; Puthier et al., 1999). Le plasmocyte malin a une action directe sur son microenvironnement, une des manifestations cliniques les plus communes est l'ostéolyse localisée (« lacunes osseuses »). Cette ostéolyse est le résultat d'une part

de la sur-activation des ostéoclastes et d'autre part de l'inhibition de l'activité des ostéoblastes, par la synthèse respective de RANK ligand (et MIP-1 α) et DKK1 par les plasmocytes malins(Balakumaran et al., 2010). L'accumulation des anomalies acquises au cours du développement du MM dans les voies MAPK et NF κ B, peut permettre une indépendance aux signaux extérieurs, favorisant le développement tumoral(Annunziata et al., 2007; Walker et al., 2018; Weinhold et al., 2016).

MM et résistance aux traitements

Le MM se caractérise par une résistance aux traitements anti-néoplasiques usuels. Une partie de cette résistance est liée au microenvironnement médullaire, et en particulier de la niche tumorale *via* la voie NF κ B et l'hypoxie médullaire relative(Martin et al., 2011). La voie NF κ B permettrait la surexpression de nombreux gènes de la voie Fanconi de façon transcriptionnelle (*via* RelB/p50), Yarde et ses collègues ont ainsi démontré que l'utilisation d'inhibiteur du protéasome (qui inhibe partiellement la voie NF κ B(Hideshima et al., 2009)) réduisait l'expression des acteurs de la voie Fanconi et la réparation des dommages à l'ADN induits par les alkylants (melphalan)(Chen et al., 2005b; Yarde et al., 2009). Enfin, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont des acteurs majeurs de la survie des plasmocytes, en particulier Bcl-2 et Mcl-1, dont les rôles biologiques ont été démontré dans plusieurs criblages par RNA interférence ou CRISPR-CAS9(Gong et al., 2016; Marchesini et al., 2017; Tiedemann et al., 2012).

Prise en charge du myélome multiple et des leucémies à plasmocyte

En dehors d'un essai thérapeutique, seuls les patients porteurs d'un myélome multiple symptomatique ou d'un myélome indolent de haut risque, requièrent une prise en charge thérapeutique.

Pronostic du myélome

Les scores pronostiques d'une pathologie dépendent des traitements reçus par ces patients, les scores actuels sont donc basés majoritairement sur des patients traités par immunomodulateurs (Imids), Inhibiteurs du protéasome, gluco-corticoïdes, et alkylants (haute dose du sujet jeune). Le Revised-International Staging System (R-ISS) est une évolution de l'ISS(Greipp et al., 2005) prenant en compte les informations cytogénétiques(Palumbo et al., 2015). Ce score est construit sur les taux de β 2 microglobuline, l'albuminémie plasmatique et le score iFISH(FISH interphasique). Le

score iFISH sur les plasmocytes tumoraux définit les patients de pronostic péjoratif s'ils sont porteurs d'une translocation (4 ;14) ou (14 ;16) ou d'une délétion 17p. Le R-ISS permet une bonne séparation des différents groupes pronostiques, au sein des patients jeunes bénéficiant d'une intensification thérapeutique avec greffe de cellules souches autologues et au sein des patients plus âgés traités sans intensification mais au moyen des stratégies sus-citées, Figure 11, Table 4.

		LDH			
		Normal		Haut	
		FISH		FISH	
		Standard	Haut	Standard	Haut
ISS	I β2Mic>5.5mg/L & Alb >35g/L	SG=82 SSp=55	SG= 62; SSP= 36		
	II				
	III β2Mic>5.5mg/L		SG=40 SSP=24		

Table 4. Calcul du score R-ISS à partir des données biochimiques et cytogénétiques. SG= survie globale à 5 ans (%), SSP= survie sans progression à 5 ans (%)

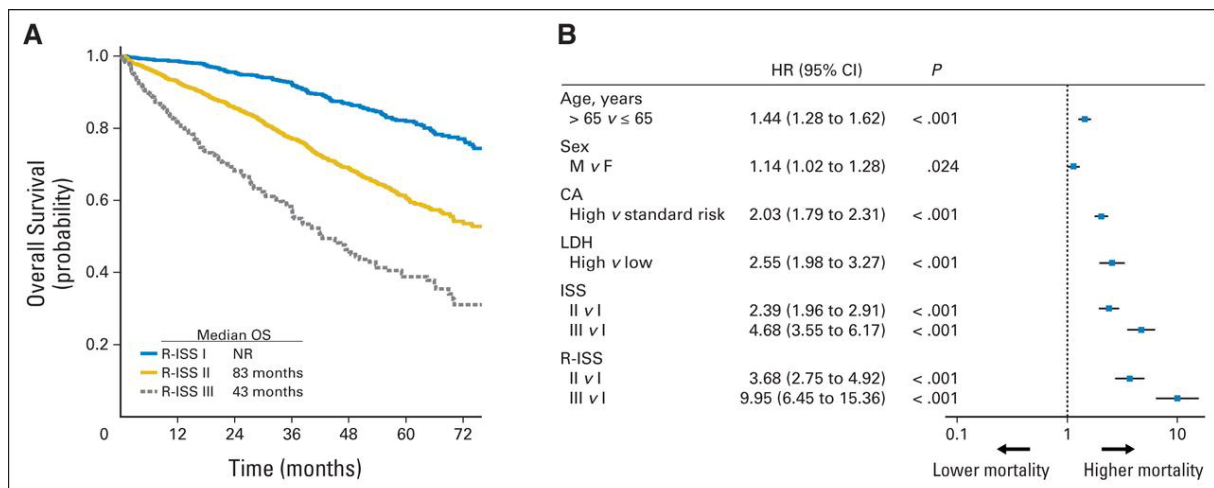


Figure 11. Stratifications selon R-ISS. A. survie globale. B. hazard-ratios des composants du score et du score composite. (Palumbo et al., 2015)

Un score pronostique intermédiaire entre ISS et R-ISS a été publié afin de détecter les jeunes patients à haut risque de progression (ou rechute) précoce dans les 2

premières années de traitement. Il comprenait l'ISS-3 et LDH augmentés et/ou iFISH del(17p)/t(4;14), score de 0 à 4 (Moreau et al., 2014).

Au côté des scores bio-cytogénétiques, la démocratisation des analyses transcriptomiques a vu fleurir de nombreux scores pronostiques, entraînés sur des cohortes de patients traités différemment et avec très peu de recouvrement dans les sets de gènes sélectionnés. Ces divergences mettent en évidence la robustesse variable de ces scores, et *in fine*, leur faible applicabilité clinique. Récemment, Chng *et al*, sous l'égide de l'IMWG, a combiné ces différents scores : signature d'instabilité chromosomique (CINGECS) (Chung et al., 2013), l'index centrosomique (CNTI) (Chng et al., 2008b), la signature du HOVON-65/GMMG-HD4 (EMC92) (Kuiper et al., 2012), la signature à 7 gènes issue des lignées de MM (Moreaux et al., 2011), la signature liée aux délétions homozygotes (HZDCD) (Dickens et al., 2010), l'index à 15 gènes de l'Intergroupe Francophone du Myelome (Decaux et al., 2008), la signature de prolifération (PI) (Hose et al., 2011), et les signatures à 70 et 80 gènes de l'UAMS (UAMS70, UAMS80) (Shaughnessy et al., 2007, 2011). Cette analyse a révélé que la moyenne de deux scores (HZDCD et EMC92) permettait de prédire avec une grande sensibilité, chez les patients autogreffés, le risque de rechute précoce et de mortalité (Chng et al., 2016). L'apport de stratification au R-ISS est pour l'instant inconnu, pour mémoire, l'ajout de l'EMC92 à l'ISS et aux anomalies FISH n'avait apporté que peu de plus-value clinique dans le pronostic (Kuiper et al., 2015), ces résultats restent pour l'instant confinés aux publications.

Au-delà de l'expression de ARN codants, une étude portant sur 308 patients d'un essai prospectif mettait récemment en évidence un set d'ARN non-codants dont l'expression serait corrélée à la survie des patients. Ces modifications de transcrits devront être validées sur une nouvelle cohorte et explorées biologiquement (Samur et al., 2018).

Les patients très haut risque - TP53 // Nouveaux facteurs pronostiques ?

De nouveaux facteurs prédictifs, en particulier mutationnels, font leur apparition avec l'agrégation des données bio-cliniques et génomiques. Publiée en 2015, l'étude de Walker a porté sur 465 patients, annotés par séquençage d'exome et traités selon un protocole prospectif (avec intensification selon la catégorie d'âge).

Cette étude démontre que les mutations affectant l'intégration du signal de dommage à l'ADN (*ATM*, *ATR*, *TP53*) bien que rares lorsqu'elles sont prises isolément (3%,

1.5%, 3%, respectivement) touchent 11% des patients lorsqu'elles sont prises en compte comme un tout (avec les del(17p)). Les altérations de ce 'signal TP53' (selon Walker) s'associent avec une SSP médiocre de 15mois (vs 28m) et une SG de 23m (vs 40m). Ces anomalies de *TP53*, d'*ATM* et d'*ATR* restent des facteurs indépendants en analyse multivariée (avec l'ISS, l'âge, les translocations de *MYC* et la t(4 ;14)). Dans la même étude, Walker détaille d'autres mutants : *CCND1*, *ZFH4*, qui combinés à l'ISS, aux statuts *TP53*, *ATM/ATR*, del(17p), t(4;14) et à l'amp(1q) identifient un groupe de très mauvais pronostic, dont la moitié progresse dans l'année de l'initiation du traitement et dont la médiane de survie est inférieure à un an. Cependant, une validation prospective dans un groupe de patients indépendant est en attente.

Le rôle des mutants de *RAS* est plus controversé, en effet, alors que l'équipe de Fonseca retrouvait un impact défavorable des mutants, les résultats de la cohorte de Walker disqualifient les premiers. La différence majeure entre les deux études d'effectifs similaires (et réalisées à plus de 10 ans d'intervalle) était l'utilisation d'Imids et d'inhibiteurs du protéasome dans l'étude de Walker, gommant probablement les impacts des mutants de *RAS*. Ces différences renforcent de façon évidente s'il le fallait que l'impact pronostique dépend du traitement(Chng et al., 2008a; Walker et al., 2015b).

Prise en charge du MM

Au diagnostic

La biologie du MM a été à l'origine d'une asymétrie d'amélioration des survies par rapport au reste des hémopathies lymphoïdes B matures. En effet, tandis que ces dernières profitaient de la multiplication des schémas semi-intensifs, du développement des alkylants, des inhibiteurs de topoisomérases, des sels de platines, et du raffinement diagnostic, pour le MM aucune association supérieure au melphalan oral associé à la prednisone n'a été démontrée jusque dans les années 80(Bergsagel et al., 1962; Blokhin et al., 1958; Mass, 1962; 1998).

L'utilisation de la chimiothérapie intensive (melphan haute-dose) au milieu des années 80, en rechute puis en première ligne(Attal et al., 1996; Barlogie et al., 1987; McElwain and Powles, 1983) avait été à l'origine de l'augmentation du taux de rémission complète et de la durée des rémissions. Cependant, les niveaux de réduction tumorale avant intensification restaient très faibles, malgré la diversification des combinaisons

de traitements (VAD : Vincristine, doxorubicine, dexaméthasone). Un second virage sera pris au tournant des années 2000 avec l'utilisation de la thalidomide et des inhibiteurs du protéasome, contribuant à l'amélioration sensible de survie dont nous sommes les témoins contemporains (Orlowski et al., 2002; Singhal et al., 1999) (Figure 12).

Ces développements ont conduit à l'utilisation de ces trois classes : les alkylants (melphalan/cyclophosphamide), les Imids (thalidomide, lenalidomide, pomalidomide) et les inhibiteurs du protéasome (bortézomib).

Cependant, alors que la survie à 5 ans progresse invariablement depuis les années 90 (Figure 12), le sous-groupe de patients porteurs d'une anomalie de *TP53* n'a que peu bénéficié des avancées thérapeutiques, la majorité de ces dernières exploitant des mécanismes p53-dépendants (melphalan et Inhibiteur du protéasome) (Moreau et al., 2014).

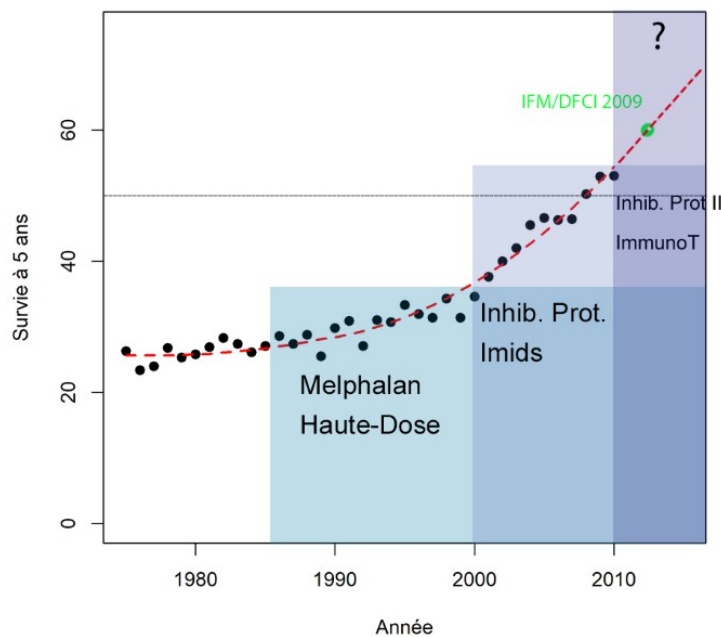


Figure 12. Evolution de la survie globale à 5 ans des patients porteurs de MM. Données INVS jusqu'à 2012. La droite pointillée après 2010 est une projection, le point vert est la donnée du dernier protocole de traitement des sujets jeunes (IFM-2009/DFCI).

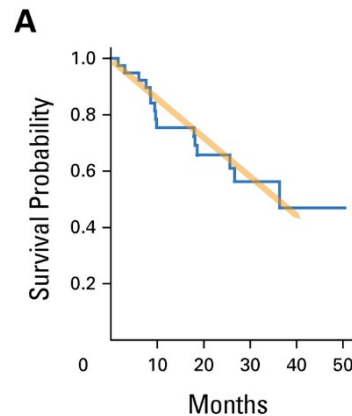
En dépit des scores pronostiques les plus récents, les choix thérapeutiques en première ligne se font en fonction de critères cliniques :

Les sujets jeunes et sans co-morbidités bénéficient de l'intensification thérapeutique par melphalan haute dose, comme à nouveau démontré récemment par l'intergroupe Francophone du Myélome à l'ère des nouvelles thérapies (Attal et al., 2017). L'induction précède l'intensification et repose sur l'utilisation d'une triplette : inhibiteur du protéasome, Imid et dexaméthasone, 4 cycles (Moreau et al., 2011, 2016a; Sonneveld et al., 2013). La collecte de cellules souches est potentialisée par le cyclophosphamide (Attal et al., 2017). Le melphalan à haute dose (200mg/m²) reste, pour l'instant, l'agent de référence du conditionnement de l'autogreffe, sans radiothérapie, sans majoration de dose ou association à d'autres cytotoxiques (Blanes et al., 2013; Carreras et al., 2007; Cunningham et al., 1994; Moreau et al., 2002; Nieto et al., 2017). A l'issue de cette intensification, une consolidation courte (2 cycles) de la même triplette est effectuée (Ladetto et al., 2010). Dans le cadre de ce schéma de traitement, la maintenance reste débattue. Le légalidomide en maintenance est approuvé en France et recommandé par l'IMWG, cependant son « service médical rendu » étant faible il n'est pas remboursé. La réalisation d'une double autogreffe pour les patients à haut risque est maintenant recommandée (Cavo et al., 2016).

Les sujets âgés ont longtemps bénéficié de l'association melphalan-predinose-thalidomide (Facon et al., 2007). L'association melphalan-prednisone-bortézomib (San Miguel et al., 2008) et le légalidomide-dexaméthasone tendent à remplacer cette stratégie (Facon et al., 2018). L'intensification thérapeutique (avec des doses similaires à celles des sujets jeunes) chez les sujets âgés, hautement sélectionnés n'est pas associée à une mortalité excessive (Garderet et al., 2016; Kumar et al., 2008) mais n'est ni recommandée ni classique. On peut s'interroger de son impact sur la qualité de vie face aux alternatives thérapeutiques à disposition, en particulier le développement de l'immunothérapie.

Les leucémies à plasmocytes primaires s'appuient sur le même schéma de traitement que les patients jeunes, avec l'adjonction d'un inhibiteur de topoisomérase dans l'induction : la doxorubicine. Le standard actuel est la double autogreffe ou le tandem autogreffe/allogreffe et une année de consolidation par bortézomib, revlimid et

dexaméthasone. Cependant, même avec ce traitement très agressif, ¼ des patients au diagnostic sont réfractaires, et la survie sans progression médiane est de 15 mois. Ces patients qui présentent une anomalie du locus *TP53* dans 28% des cas restent exposés à un taux de rechute quasi-constant, Figure 13(Royer et al., 2016).



Figures 13. Données de survie globale du protocole « Leucémie à plasmocytes primaires » (AOL-2009). La droite jaune illustre un taux de rechute constant au cours du temps.

A la rechute

Les traitements de rechutes sont moins codifiés, les stratégies ne dépendant plus de l'âge des patients mais des traitements antérieurs reçus.

Plusieurs classes thérapeutiques se combinent, là aussi le plus souvent en triplettes(Boudreault et al., 2017; Laubach et al., 2016). Les alkylants se diversifient (cyclophosphamide, bendamustine), l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome de seconde génération (carfilzomib, ixazomib oral) est possible, et on peut recourir à un Imid de 3^{ème} génération, le pomalidomide(Baz et al., 2016; Damaj et al., 2012; Moreau et al., 2016b; Stewart et al., 2015).

L'allogreffe de cellules souches reste une thérapie peu efficace dans le MM, grevée d'une forte mortalité toxique, qu'elle soit myélo-ablative ou non(Pawarode et al., 2016).

Stratégies novatrices

Après le raz de marée de l'immunothérapie anti-CD20 dans le champ du lymphome B, l'immunothérapie a réinvesti le champ du myélome. En particulier, les anticorps anti-CD38 ont démontré leur efficacité en rechute en association avec le bortezomib(Palumbo et al., 2016) ou le lénalidomide(Dimopoulos et al., 2016), et

gagnent maintenant les premières lignes des sujets âgés(Mateos et al., 2018) et jeunes (CASSIOPEA, NCT02076009).

D'autres cibles, tel le BCMA (B-Cell maturation Antigen, un récepteur essentiel à la survie des plasmocytes *via* ses ligands APRIL et BAFF) peuvent être utilisées : par des anticorps couplés (Trudel et al., 2017) ou des Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-T cells)(Cohen et al., 2017). Les études de CAR-T-cells produisent des résultats impressionnants, mais les données d'efficacité concernent majoritairement des patients juste après l'expansion des clones T. Peu de patients ont un suivi supérieur à un an, et l'expansion du clone a disparu dans les 6mois pour 50% des malades. Bien qu'efficaces chez des patients de très mauvais pronostic (67% de del(17p)/*TP53*^{mut}, 30% de maladie extra-médullaire), il est à noter que sur 33 patients inclus, seuls 21 ont reçu le traitement, dont 8 ont eu une réponse au moins partielle au traitement (avec deux rechutes très précoces dans les 4 premiers mois). Néanmoins, des engouements scientifiques et médicaux majeur (et commerciaux) favorisent l'amélioration des techniques et le développement de nouvelles générations de CAR-T pour apporter des solutions à des patients en impasse thérapeutique

Alors que les inhibiteurs de checkpoint immunitaires (PD-1, PD-L1) se développent en oncologie solide et dans les autres champs de l'hématologie, les essais dans le MM en association avec les Imids ont été suspendus pour surmortalité dans les bras expérimentaux. L'avenir de cette stratégie et sa combinaison avec d'autres drogues dans le MM est incertain.

Les lignées de MM

Notre équipe possède une collection de 45 lignées humaines de myélomes multiple (HMCL). Trente-trois lignées sont utilisées de façon courante, dont 20 sont dépendantes de l'IL6 pour leur survie (avec une lignée, U266 qui possède une activité autocrine). Les HMCLs sont dérivées de cellules de patients présentant des leucémies secondaires, des pleurésies, de l'ascite ou des formes sous-cutanées tumorales. Elles sont donc majoritairement issues de patients déjà traités, et le plus souvent réfractaires aux derniers traitements reçus. Les HMCLs présentent les caractéristiques décrites dans la table 5. L'étude du transcriptome des HMCLs a confirmé que ce modèle est bien représentatif des patients. En effet, les dérégulations issues des événements cytogénétiques primaires, détectés au diagnostic, sont toujours à l'origine d'une

ségrégation des lignées entre elles, tout comme chez les patients, Figure 14 (Moreaux et al., 2011; Zhan et al., 2006). Trente-deux lignées présentent une translocation avec un promoteur de chaîne d'immunoglobuline (30 avec un promoteur de chaîne lourde) dont 2 avec un partenaire inconnu. Les lignées présentant une hyper-diploïdie sont rares (Li et al., 2007), et ces hyper-diploïdes présentent d'autres anomalies chromosomiques inhabituelles pour cette catégorie de patient (Chng and Fonseca, 2008).

La traçabilité des lignées et l'absence de dérive clonale est primordiale dans l'empilement des résultats biologiques et leur mise en relation. Par exemple, le séquençage des cDNA de *TP53* a été conduit en même temps que le séquençage des cDNA des ARNm de *KRAS* et *NRAS*, tandis que les données de transcriptome et d'annotation fonctionnelle sont incrémentées avec la génération de nouvelles lignées et les nouvelles questions biologiques. L'identité de chaque lignée est assurée par la réalisation d'un immunophénotype à chaque décongélation, selon un algorithme publié (Maïga et al., 2015).

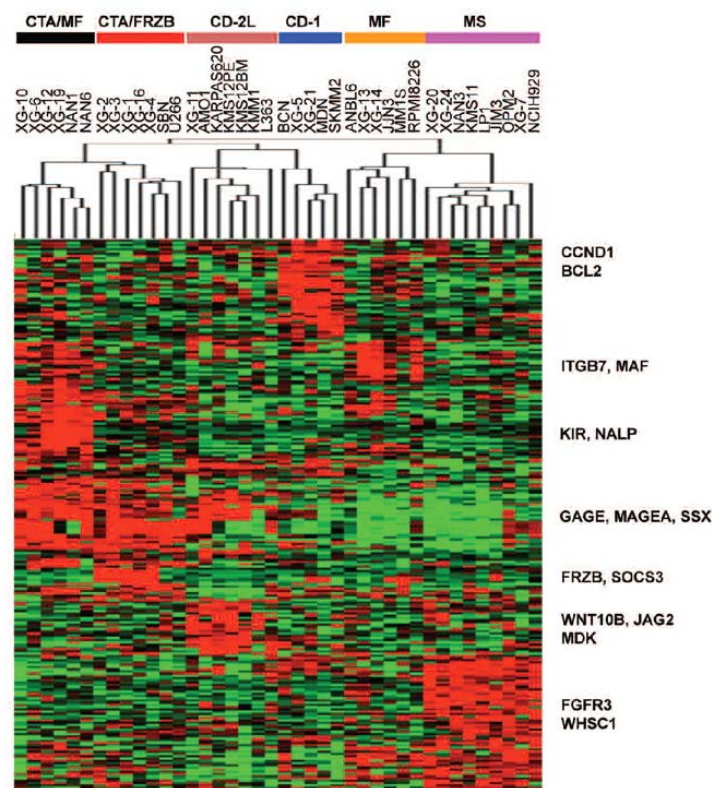


Figure 14. Classification non supervisée des HMCLs. D'après Moreaux et al. 2011

	Cible de Translocation	Genomic (Chr17, hg19)	Protéine	Domaine Protéique	Biologie protéique	Séquéncé WES
AMO1	other			wt	wt	x
ANBL6	maf	7576855G>A	Q331STOP	TET	NE.NS	
BCN	maf			wt	wt	x
JIM3	mmset	7577121G>A	R273C	L1	DBL	x
JJN3	maf		NE	NE	NE.NS	x
KARPAS620	ccnd1	7578526C>T	C135Y	L1	DBL	x
KMM1	ccnd1	7578526C>A 7577559G>A	C135F S241F*	L1 L2/L3	DBL DBL	x
KMS11	mmset	-	KO	NE	NE.NS	x
KMS12BM	ccnd1	7574017C>A	R337L	TET	NDBL	
KMS12PE	ccnd1	7574017C>A	R337L	TET	NDBL	x
L363	maf	7577499C>G	S261T	NDBL	NDBL	x
LP1	mmset	7577082C>T	E286K	L1	DBL	x
MDN	ccnd1			wt	Wt	x
MM1S	maf			wt	Wt	x
NAN1	maf	7578392C>A	E180STOP	L2/L3	NE.NS	x
NAN10	ccnd1	7578448G>T	C161A	NDBL	NDBL	x
NAN11	maf			wt	Wt	x
NAN3	mmset	7577539C>T	wt/R248Q	L2/L3	DBL	x
NAN6	maf	Del7577830-7576554	del exons7-9	L1/2/3/TET	NE.NS	x
NAN7	ccnd1	?	>exon 7	L1/2/3/TET	NE.NS	x
NAN8	mmset	?	>exon 7	L1/2/3/TET	NE.NS	x
NAN9	mmset			wt	Wt	x
NCIH929	mmset			wt	Wt	x
OPM2	mmset	7578406C>T	R175H	L2/L3	DBL	x
RPMI8266	maf	7577085C>T	E285K	L1	DBL	
SBN	other			wt	Wt	
SKMM2	ccnd1	7578534C>A	K132N	L1	DBL	x
U266	ccnd1	7578449C>T	A161T	NDBL	NDBL	x
XG-1	ccnd1	7578554A>T	Y126N	L1	DBL	x
XG-10	other			wt	Wt	x
XG-11	ccnd1	7578526C>T	C135Y	L1	DBL	x
XG-12	maf			wt	Wt	
XG-13	maf		R248Q	L2/L3	DBL	
XG-14	ccnd1		G266E	NDBL	NDBL	
XG-16	other	7578190T>C	Y220C	NDBL	NDBL	x
XG-19	maf			wt	Wt	
XG-2	other	7578403C>T	C176Y	L2/L3	DBL	x
XG-20	mmset	?	del exons7-9	L1/2/3/TET	NE.NS	
XG-21	ccnd1			wt	Wt	
XG-24	mmset			wt	Wt	
XG-3	other			wt	Wt	x
XG-5	ccnd1	7577094G>A	R282W	L1	DBL	x
XG-6	maf			wt	wt	x
XG-7	mmset			wt	wt	x

Table 5. Caractéristiques des HMCLs, status TP53. >exon7 : pas d'amplification de cDNA après exon 7. En rouge : les « hot-spots », WT : wild-type, TET : tetramerization, L1/2/3 : boucles liant l'ADN, NDBL : boucles ne liant pas l'ADN. DBL : boucles liant l'ADN. NE.NS : non-exprimé ou tronquée (non-sens). *: mutants portés par 2 allèles différents.

Objet du travail

Pour ce travail de thèse nous sommes partis de deux constats : le MM est une hémopathie à la biologie unique au sein des hémopathies B et pourtant, ses modèles sont incomplètement annotés d'un point de vue génomique.

Le premier article a voulu apporter un nouvel éclairage sur les altérations possibles de la voie p53 dans les hémopathies malignes B au diagnostic, sur les relations entre ces altérations et sur les schémas d'inactivation de la voie.

Le deuxième article s'est concentré sur l'exploration des anomalies génomiques du MM. Nous avons séquencé l'exome de nos 33 lignées de MM, afin de mettre en évidence des altérations coordonnées de voies de signalisation stratégiques pour le MM. Ces résultats ont été mis en relation avec les annotations phénotypiques (réponses aux traitements, dépendances mitochondriales, anomalies du cycle cellulaire, etc...).

Enfin, j'ai poursuivi le travail que nous avons publié lors de mon Master 2 sur l'efficacité de PRIMA-1^{Met} dans le MM, en particulier en axant notre recherche sur le mécanisme de mort et la recherche d'une cible non-p53. Ces résultats « mis à jour » sont présentés et confrontés à la littérature parue après la publication de notre article.

Article 1. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell

Tessoulin et al., Blood Reviews, 2016

Résumé :

La dérégulation de la voie p53 par anomalies directes de *TP53* (délétions/mutations) est associée à une diminution des réponses aux traitements dans les hémopathies malignes B. Nous avons décrit avec ce premier travail les anomalies des acteurs d'intégration et de régulation de la voie p53 (*MYC*, *RAS*, *CDKN2A^{ARF}*, *MDM2*, *ATM* et *TP53*), depuis la leucémie aigüe lymphoblastique B jusqu'aux hémopathies plasmocytaires. Les résultats de ce travail sont que les anomalies ne sont pas distribuées de façon homogène (et donc aléatoire) au sein des hémopathies.

En effet, les atteintes directes de *TP53* ou d'*ATM* (par mutation et/ou délétion, souvent associées entre elles) sont particulièrement fréquentes au sein des lymphomes B Diffus à grandes cellules et à Cellules du Manteau. Au sein des activateurs oncogéniques, les dérégulations de *MYC*, en particulier les gains, sont très rares dans les lymphomes post-GC, alors qu'elles sont fréquentes dans les leucémies pro-lymphocytaires B, le MM et les leucémies plasmocytaires. Les mutations de *RAS* sont absentes des hémopathies malignes B, en dehors des deux extrémités du spectre nosologique : les LAL-B et les pathologies plasmocytaires.

Afin d'améliorer la compréhension de l'hétérogénéité des anomalies décrites, nous avons réalisé une analyse factorielle multiple, prenant en compte les anomalies oncogéniques et les anomalies des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette analyse montre que les dérégulations de *MYC* sont souvent associées au statut *TP53* du groupe histologique. De plus, les hémopathies présentant des gains de *MYC*, des délétions de *TP53* et des mutations de *RAS* présentent des survies défavorables au sein des hémopathies. Une autre caractéristique mise en évidence dans ces associations est l'indépendance entre les anomalies de *TP53* et d'*ATM*, ces dernières étant rares dans le MM, mais s'enrichissant dans les PCL. Associée à cette revue interprétée, nous proposons plusieurs stratégies thérapeutiques pour les hémopathies malignes B, se basant sur le regroupement d'anomalies plus que l'histologie.



Review

p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell



B Tessoulin^{a,b,*}, M Eveillard^{a,c}, A Lok^{a,b}, D Chiron^a, P Moreau^{a,b}, M Amiot^a, A Moreau-Aubry^a, S Le Guill^{a,b}, C Pellat-Deceunynck^{a,*}

^a CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes, France

^b Department of Hematology, Nantes University Hospital, Nantes, France

^c Hematology Biology Department, Nantes University Hospital, Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

p53 Pathway
MYC
ATM
ARF
MDM2
Survival
B-cell malignancies
Myeloma
Lymphoma

ABSTRACT

TP53 deletion or mutation is frequent in B-cell malignancies and is associated with a low response rate. We describe here the p53 landscape in B-cell malignancies, from B-Acute Lymphoblastic Leukemia to Plasma Cell Leukemia, by analyzing incidence of gain or loss of function of actors both upstream and within the p53 pathway, namely *MYC*, *RAS*, *ARF*, *MDM2*, *ATM* and *TP53*. Abnormalities are not equally distributed and their incidence is highly variable among malignancies. Deletion and mutation, usually associated, of *ATM* or *TP53* are frequent in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma. *MYC* gain, absent in post-GC malignancies, is frequent in B-Prolymphocytic-Leukemia, Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemias. *RAS* mutations are rare except in MM and PCL. Multiple Factorial Analysis notes that *MYC* deregulation is closely related to *TP53* status. Moreover, *MYC* gain, *TP53* deletion and *RAS* mutations are inversely correlated with survival. Based on this landscape, we further propose targeted therapeutic approaches for the different B-cell malignancies.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Abnormalities in the p53 pathway are present in virtually all cancer cells and are associated with poor outcomes [1,2]. p53 has a dual role as a genomic guardian and as a master regulator of stress. Moreover, p53 has recently been uncovered as a major switch for metabolic control and mitochondrial function in cells [1,2]. Being at the helm of the cellular fate, both p53 expression and regulation are tightly regulated. Aside from the direct deletion and/or mutation of *TP53*, several mutations, deletions and/or amplifications of genes involved in the regulation of the p53 pathway abrogate the precise regulation of this pathway in cancer cells [1,2]. p53 is activated by the increase of its genomic expression and/or by several types of direct modifications, i.e., phosphorylation, ubiquitylation, and sumoylation, all of which impact the half-life and/or function of p53 [1]. Abnormalities involving the p53 pathway are found at all the levels of its regulation. Direct abnormalities include chromosomal deletion (del17p), hypermethylation of the p53 promoter, and missense or nonsense mutation in *TP53* exons, while indirect

abnormalities abrogate its activation by DNA damaging drugs via deletion and/or mutation of *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), or alter its stabilization via deletion of *ARF* (alternate reading frame of *CDKN2A* locus) or overexpression of *MDM2* (murine double minute 2). However, some of these abnormalities are reversible, as pharmacological agents can inhibit promoter methylation (demethylating drugs) or protein interactions (e.g. p53/MDM2/USP7). In addition to *TP53* deletion/mutation, the most frequent and common abnormalities across cancer cells are *Myc* overexpression (due to translocation, amplification, or overexpression) and *RAS* mutations [2]. Both of these oncogenes that contribute to tumorigenesis and sustained proliferation also modulate the activity of p53 pathway [3,4].

The aim of this review is to provide an updated panorama of p53 pathway dysregulation. We thus analyzed cytogenetic and genomic abnormalities involving “oncogenic activators” (*MYC*, *RAS*), regulators (*ATM*, *MDM2*, *ARF*) and *TP53* itself to identify specific pharmaceutical targets in hematological lymphoid malignancies of B-cell origin, from Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) to plasma cell leukemia (PCL). The comprehensive analysis of genomic abnormalities in hematological malignancies, including the recent extensive exome sequencing, shows that pathologies display a “specific” pattern of abnormalities that either preferentially target *TP53*, *ATM* or other effectors or target all of them. The role of miRNA deregulation was not addressed in this review because established data assessing miRNA expression in B-cell malignancies were not available at the time of article submission.

* Corresponding authors at: INSERM UMR1232, CNRS ERLG001, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers, IRS-UN, 8 Quai Moncoussu, BP 70721, Nantes F-44007, France.

E-mail addresses: benoit.tessoulin@univ-nantes.fr (B. Tessoulin), catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr (C. Pellat-Deceunynck).

2. The p53 pathway can be reversibly or irreversibly impaired by numerous abnormalities

The p53 pathway (Fig. 1) is a complex pathway involving >50 genes and/or proteins involved in the regulation of all essential cell functions, especially in response to all types of stresses a cell could encounter (e.g., DNA damage, metabolism, cell division, oxidative stress, oncogenic pressure). Numerous reviews have described in detail all of these functions as well as the up- and downregulation of each factor under stress conditions in normal cells [2,4]. These regulations involve gene expression, alternative splicing, protein translation, protein modification and localization. In non-tumor cells, intense and permanent stresses lead to acute and prolonged activation of the p53 pathway resulting in cell cycle arrest, followed by senescence and/or cell death. Malignant cells, which actively proliferate, display abnormalities in the p53 pathway with reversible or irreversible alterations of either p53 or other factors that are upstream or downstream of *TP53*. In hematological malignancies, deregulation of the pathway at the protein level mainly involves a loss of function in p53, ATM, and p14^{ARF} and a gain of function in Ras, Myc, and Mdm2 (Fig. 1). Regarding *USP7* and *USP10*, no genomic abnormalities have been reported yet. Loss- and gain-of-functions are the consequence of chromosomal deletions (*TP53*, *ATM*, and *ARF*), inactivating or activating point mutations (*TP53*, *ATM*, and *RAS*), translocation or chromosomal amplification (*MYC* and *MDM2*), and overexpression concurrent with the loss of a negative regulator of either protein or miRNA origin. For instance, *MDM2* mRNA expression is increased by gene amplification, trisomy of chromosome 12 (tri(12)) or decrease in the expression of p53-induced miRNA192, 194 and 215 [5, 6]. Two deubiquitinases, *USP7*/HAUSP and *USP10* [7], are important regulators of the p53 pathway following ATM/CHK2 activation. *USP10* directly interacts with p53 to remove Ub, while *USP7* seems to preferentially target MDM2 [2,7,8]. Although both deubiquitinases play a major role at the protein level, their expression and regulation have not been thoroughly investigated in cancer cells. However, these proteins may be viable drug targets despite the limited data available. Ras and Myc activate ARF via ARF-BP1, thus leading to cell cycle arrest

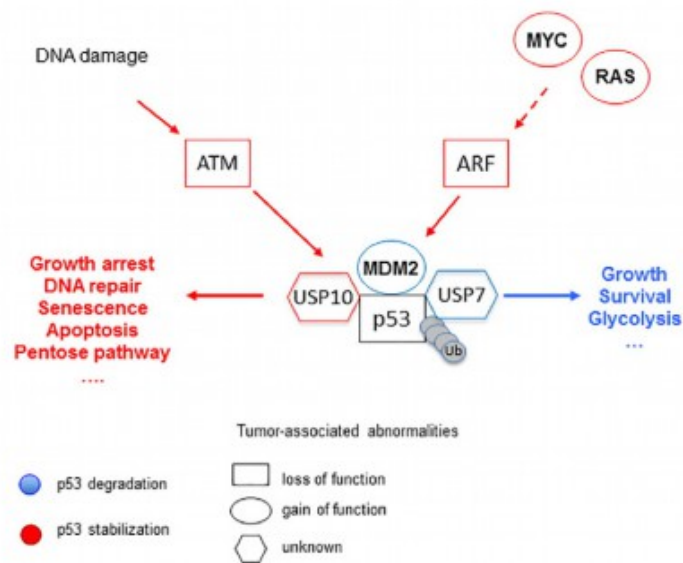


Fig. 1. Schematic representation of the p53 pathway including frequent hits in tumor cells. Proteins favoring the activation (stabilization) or silencing (degradation) of p53 are represented in red or blue, respectively. Loss or gain of function is represented by rectangle or circle shape, respectively. RAS and MYC can indirectly or directly induce the expression of ARF, which inhibits p53 degradation and favors growth arrest and apoptosis. In response to DNA damage, ATM phosphorylates USP10, which counteracts p53 ubiquitination by MDM2 and leads to p53 stabilization. USP7 interacts with the MDM2/p53 complex and favors MDM2-mediated ubiquitination of p53. Pharmacological inhibitors targeting either MDM2 or USP7 favor p53 stabilization.

and either senescence or death in cells with a preserved p53 pathway [3,4,9]. This adds oncogenic pressure for tumor cells to abrogate their p53 signaling [4].

3. Abnormalities in the p53 pathway highly differ among malignancies of B-cell origin

B-cell malignancies were classified according to the 2008 WHO classification [10]. Abnormalities involving genes of interest were restricted to genomic alterations: under or overexpression data were not taken into account because data were not available for all malignancies, or difficult to interpret by the lack of information in the respective normal counterpart, or involved too few samples. We first analyzed incidence of abnormalities in each gene for all malignancies, see Table 1 and Fig. 2.

RAS mutations (detected by Sanger direct sequencing, Whole Exome Sequencing [WES], Whole Genome sequencing [WGS] or targeted resequencing [t-NGS]) are very rare in most lymphoid malignancies as they particularly cluster in B-Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) and in neoplasms of memory plasma cell origin i.e., in Multiple Myeloma (MM), primary and in secondary Plasma Cell Leukemia (sPCL, pPCL). Regarding Hairy Cell Leukemias (HCL), no *RAS* mutations were found, but *BRAF*, whose protein is downstream in the MAPK pathway, is almost always mutated in this malignancy [11].

MYC overexpression is related to recurrent duplications, translocations (with either super enhancers [i.e., with IgH promoters, FOXO3, etc.], conventional or unknown partners). *MYC* abnormalities have been investigated through karyotype, FISH analysis [locus 8q14], array-comparative genomic hybridization [a-CGH], SNP-array and Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments [QMPFSF]. *MYC* overexpression related to genomic alterations is frequent (>10%) in 6 out of 14 B-cell malignancies i.e., in B-Prolymphocytic Leukemia (B-PLL), Mantle Cell Lymphoma (MCL), Burkitt Lymphoma (BL), MM, pPCL and in sPCL. Regarding Burkitt Lymphoma (BL), *MYC* abnormalities are part of diagnosis in classical cases. PCLs harbor a particularly high rate of *MYC* deregulation. Although a few cases have been assessed, it appears that B-PLL displays the highest incidence of *MYC* abnormalities apart from BL.

Loss of *ARF* (as reported by FISH analysis [CDKN2 locus, 9p21.3], SNP-Array detection, a-CGH, QMPFSF, multiplex ligation-dependent probe amplification [MLPA]), as an indirect regulator of the interaction between MDM2 and p53, is found in 4 out of 13 malignancies (B-ALL, MCL, MM and DLBCL (Diffuse Large B Cell Lymphoma)) without particular unbalanced distribution among the cell of origin classification (COO) [10].

MDM2 gain (evaluated by a-cGCH, SNP-array, karyotype [tri(12)] and/or FISH analysis [12q15]) is found with a low incidence (3–12%) in 8 out of 13 malignancies i.e., MCL, MALT (Mucosa-Associated Lymphoid tissue lymphomas), SMZL (Splenic Marginal Zone Lymphomas), FL (Follicular Lymphoma), BL, CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia), WM (Waldenström Macroglobulinemia) and MM.

ATM deletion (identified by FISH analysis [locus 11q22–q23], SNP-arrays, a-CGH, karyotypic findings, QMPFSF, MLPA, and WES), is frequent (>10%) in 3 out of 12 malignancies i.e., B-ALL, MCL, CLL, DLBCL, MALT, SMZL, WM and MM, is particularly high in MCL, DLBCL and CLL.

ATM mutations (detected by WGS, WES, direct sequencing or t-NGS) are present in 6 out of 12 malignancies (ALL, MCL, CLL, DLBCL, HCL and PCL) and are highly frequent in MCL (40%). A simultaneous assessment of *ATM* deletion and mutation showed that deletions in the *ATM* locus were found in 24% to 100% out of the mutant cases, indicating a bi-allelic loss of function of *ATM*, which is in line with its “tumor suppressor” status.

TP53 deletion (analyzed by FISH[17p13], karyotype and SNP-arrays, a-CGH, WGS and WES) is widely found in 8 out of 14 malignancies (>10%) and is present in >50% of B-PLL and sPCL cases.

TP53 mutations (evaluated by direct sequencing, WES, WGS, t-NGS) are found in 10 out of 14 malignancies and are particularly frequent in

Table 1
Frequency of hits of p53 pathway.

Cell of origin classification	BCR (+/-)	RAS		MYC		ARF		MDM2		ATM		TP53		Survival % at 5 y
		Mutation	Gain	Loss	Gain	Deletion	Mutation	Deletion	Mutation	Deletion	Mutation	Mutation	Mutation	
PreB, unclassified														
B-ALL	-	21% (313) [41]	2% (736) [42]	34% (338) [43,44]	0% (123) [44]	5% (784) [42,45]	20% (66) [45,46]	5% (784) [42,45]	20% (66) [45,46]	5% (748) [42]	15% (267) [47]	5% (748) [42]	15% (267) [47]	53 [44,48]
B-PLL	+	83% (6) [49,50]	83% (6) [49,50]							59% (29) [49,51]	46% (35) [51,52]	70% (10) [51]	70% (10) [51]	50 [52]
Pre-CC														
MCL	+	0% (85) [53,54]	18% (233) [55,56]	29% (235) [55,56]	9% (215) [55,56]	29% (323) [54-59]	40% (178) [53,54,60,61]	29% (323) [54-59]	40% (178) [53,54,60,61]	22% (695) [54-58,61-65]	18% (575) [53,54,61,63-69]	24% (46) [61,64]	24% (46) [61,64]	45 [70,71]
CLL	+	4% (538) [72]	3.7% (161) [73]	0% (161) [73]	12% (161) [73]	24% (1149) [74-79]	21% (411) [74,75,80,81]	24% (1149) [74-79]	21% (411) [74,75,80,81]	9% (1678) [74-80,82]	10% (1173) [83]	75% (95) [74,77,78,80,82]	75% (95) [74,77,78,80,82]	79 [84]
GC														
FL	+	0% (151) [85]	2% (160) [86,87]	8% (369) [88-91]	12% (208) [92]	0% (198) [90]	0% (56) [59,60,93]	0% (198) [90]	0% (56) [59,60,93]	12% (198) [90]	8% (242) [16,94,95]			87.4 [96]
BL	+	0% (70) [97]	100% [97]	4% (119) [98-101]	4% (79) [101,102]	9% (79) [101,102]	0% (59) [97]	9% (79) [101,102]	0% (59) [97]	10% (28) [100]	26% (167) [97,99,100,103-106]			80 [107]
DLBCL	+	3% (61) [108,109]	8.9% (574) [13]	32% (174) [98,110,111]	0.8% (364) [28]	55% (18) [112,113]	20% (114) [108,112,114]	55% (18) [112,113]	20% (114) [108,112,114]	12% (440) [115]	22% (506) [115]	32% (69) [115,116]	32% (69) [115,116]	75 [117]
Post-CC														
MALT	+	0% (4) [118]	3% (57) [119]	0% (57) [119]	7% (57) [119]	12.5% (80) [120,121]		12.5% (80) [120,121]		0% (38) [120]	5% (38) [122,123]			80 [124]
SMZL	+	0% (190) [125,126]	4% (373) [119,127]	0% (373) [119,127]	3% (373) [119,127]	11% (35) [120]	0% (175) [126]	11% (35) [120]	0% (175) [126]	14% (172) [128,129]	14% (382) [126,129,130]			81 [131]
HCL	+	0% (36) ^a [11,132]	0% (53) [133,134]	0% (24) [132,134]	0% (19) [134]	0% (24) [132,134]	3% (31) [132,135,136]	0% (24) [132,134]	3% (31) [132,135,136]	0% (31) [132,135,136]	26% (66) [132,135,136]			95 [138]
WM	+	0% (30) [139]	0% (174) [140]	0% (42) [141]	3% (182) [140,141]	7% (226) [140,141]	0% (30) [142]	7% (226) [140,141]	0% (30) [142]	8% (140) [140]	7% (30) [142]			67 [143]
Plasma cell														
MM	-	46% (132) [144,145]	49% (218) [146]	10% (82) [30]	8% (82) [30]	1.3% (463) [145]	3% (508) [145,147]	1.3% (463) [145]	3% (508) [145,147]	8% (1611) [148-150]	3% (463) [145]	37% (54) [151]	37% (54) [151]	65 [151]
pCL	-	29% (45) [144,152,153]	29% (77) [154-157]	10% (10) [155]	0% (18) [153]	0% (17) [156]	26% (23) [158]	0% (18) [153]	26% (23) [158]	32% (72) [156-159]	32% (60) [153,156-158]	67% (31) [156,158,160]	67% (31) [156,158,160]	<20 [153,156,161,162]
sPL	-	29% (31) [144,153]	37% (41) [153,155]	0% (2) [155]	0% (18) [153]		15% [13] ^b	0% (18) [153]	15% [13] ^b	50% (18) [153,159,160]	27% (260) [153,160]	40% (20) [153]	40% (20) [153]	<10 [153,162]

The percentage of abnormalities was calculated after compiling cases reported in literature (total number is indicated in bracket). Surface expression of B-Cell Receptor (BCR) is indicated (+/-). B-ALL: B-Acute lymphoblastic Leukemia, B-PLL: B-Prolymphocytic Leukemia, MCL: Mantle Cell Lymphoma, CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia, FL: Follicular Lymphoma, BL: Burkitt Lymphoma, DLBCL: Diffuse Large B Cell Lymphoma, MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue, SMZL: Splenic Marginal Zone Lymphoma, HCL: Hairy Cell Leukemia, WM: Waldenström Macroglobulinemia, MM: Multiple Myeloma, pCL: Plasma Cell Leukemia (p: primary, s: secondary). Association Mut & del: % of mutation in deleted samples or % of deletion in mutated samples.

^a = BRAF ≈ 100% mutated in HCL.

^b Frequency in MM cell lines derived from sPLs (COSMIC Database).

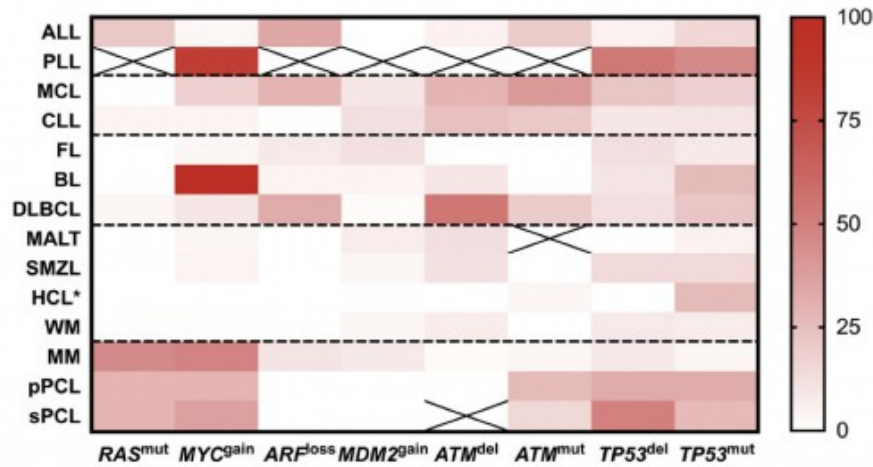


Fig. 2. Heat-map of frequency of hits in the p53 pathway. The heat-map represents the percentage of each abnormality. * = BRAF ≈ 100% mutated in HCL.

B-PLL, BL, HCL and PCLs. *TP53* mutations and deletion are strongly associated within malignancies (especially in B-ALL, B-PLL, DLBCL, CLL and MM), suggesting a particularly strong inactivation of the p53 pathway in these particular entities.

We next analyzed abnormalities distribution among each COO group of malignancies. In the preB/unclassified group, B-PLL has a very high incidence of *MYC* and *TP53* abnormalities. B-ALL displays a significant abnormality incidence in oncogenes, regulators and *TP53* itself. In the pre-GC group, MCL displays abnormalities in all genes except *RAS*. CLL has a significant rate of mutation and/or deletion in both *ATM* and *TP53*.

In the GC group, DLBCL is the most affected histology when considering every type of abnormality. Considering the DLBCL subtypes according to COO (GC vs non-GC/Activated B-Cell [ABC], the first being associated with more Bcl-2 and Myc deregulations while the latter is associated with more Bcl-6 deregulations [12,13]), non-GC/ABC have a frequent loss of *ARF* (30%) compared to GC (4%), while *MDM2* gain is associated with the GC phenotype (12.5% vs 0%) [14,15]. Considering FL, most of *TP53* abnormalities are associated with disease transformation and reflect a more aggressive phenotype in line with “high grade” (rather than indolent) lymphomas [16].

In the post-GC group, most of malignancies (WM, FL, MALT and SMZL) do not harbor frequent abnormalities (<15% of patients) in any genes, and the most frequent abnormality incidence involves *TP53* itself. HCL harbors a permanent *BRAF* mutation and a significant mutation rate in the *TP53* gene only (26%) but without an associated deletion.

The plasma cell group (MM, PCL) is characterized by a high rate of both oncogenic abnormalities (*RAS*, *MYC*) and *TP53* abnormalities (PCL). Compared to MM, PCLs display a decreased rate in *ARF* and *MDM2* incidences while an increased rate in both *ATM* and *TP53* genes.

In summary, B-PLL, MCL, DLBCL and PCLs display a high incidence of mutation/deletion of *ATM* and/or *TP53*. These four malignancies are known to have a poor response rate and an impaired overall survival.

4. Cell of origin classification and Multiple Factorial Analysis of p53 pathway abnormalities overlap

To provide a global representation and note all correlations between variables, a Multiple Factorial Analysis (MFA) on the rate of abnormalities was performed [17]. MFA is an extension of Principal Component Analysis (PCA) used for analysis of grouped variables. We thus defined 2 groups of variables, oncogenes and tumor suppressor genes.

Fig. 3A and B represent the projection of the variables on plane 1 (Dim 1 ∩ Dim 2) and plane 2 (Dim 1 ∩ Dim 3). The vectors are fairly represented when they are well projected on the plane, i.e., near the correlation circle. If two vectors are well projected along the same axis they

are considered to be associated, conversely if they are orthogonal vectors, they are independent.

4.1. Association between p53 pathway hits and MFA planes details

Approximately 71.5% of the information held by the 8 abnormalities (*TP53^{del}*, *TP53^{mut}*, *ATM^{del}*, *ATM^{mut}*, *ARF^{loss}*, *MDM2^{gain}*, *MYC^{gain}* and *RAS^{mut}*) is explained by the first 3 dimensions of the MFA. Dimensions 1, 2, 3 explain 32.2%, 23.7%, and 15.6% of the variation held by the abnormalities, respectively. As shown in Fig. 3A, *TP53* mutation and *TP53* deletion correlate well together and participate to the construction of this Dim 1 axis. *MDM2* gain is inversely correlated to *TP53* mutation. Regarding dimension 2, *ATM* status and *ARF* loss segregate together, being well projected and independently of *MDM2*, *TP53*, *RAS* and *MYC* statuses. As shown in Fig. 3B (2nd plane), *MYC* gain, *RAS* mutation and *TP53* mutation built up the 3rd axis. While *RAS* mutation isn't associated with *TP53* status, *MYC* gain is associated with *TP53* mutation.

4.2. Distribution of p53 pathway hits among B-cell malignancies and association with survival

In Fig. 3A, *TP53* mutation, *TP53* loss, and to a lesser extent *RAS* mutation and *MYC* gains are inversely related with 5-year overall survival rates. In Fig. 3C, the entities are projected according to their coordinates in dimensions 1 & 2. An unsupervised ascendant hierarchical clustering was performed on the MFA coordinates (5 dimensions) of all but B-PLL malignancies. Of note, they mainly but imperfectly cluster according to their COO classification, especially for pre-GC, post-GC and PCL malignancies. BL and MM are isolated regarding their p53 dysregulation motifs and *MYC* abnormalities, they don't cluster with any other histology. B-PLL, which did not take part of the clustering set-up and was projected after, is isolated, being the sole entity with very high level of both *TP53* abnormalities and *MYC* gain. In Fig. 3D, the entities are projected according to their coordinates in dimensions 1 and 3 and are colored according to the previous ascendant hierarchical clustering results. This latter projection separates entities according to their *MYC* and *RAS* status, especially MM and BL. Malignancies with *RAS* abnormalities, which are found in histologies negative for BCR expression, segregate together on the upper right part of the individual factor map (Fig. 3D).

5. Summary and future directions

While many efforts have been made to uncover *TP53*, *MYC*, and *ATM* abnormalities, far less has been done to understand their regulation and

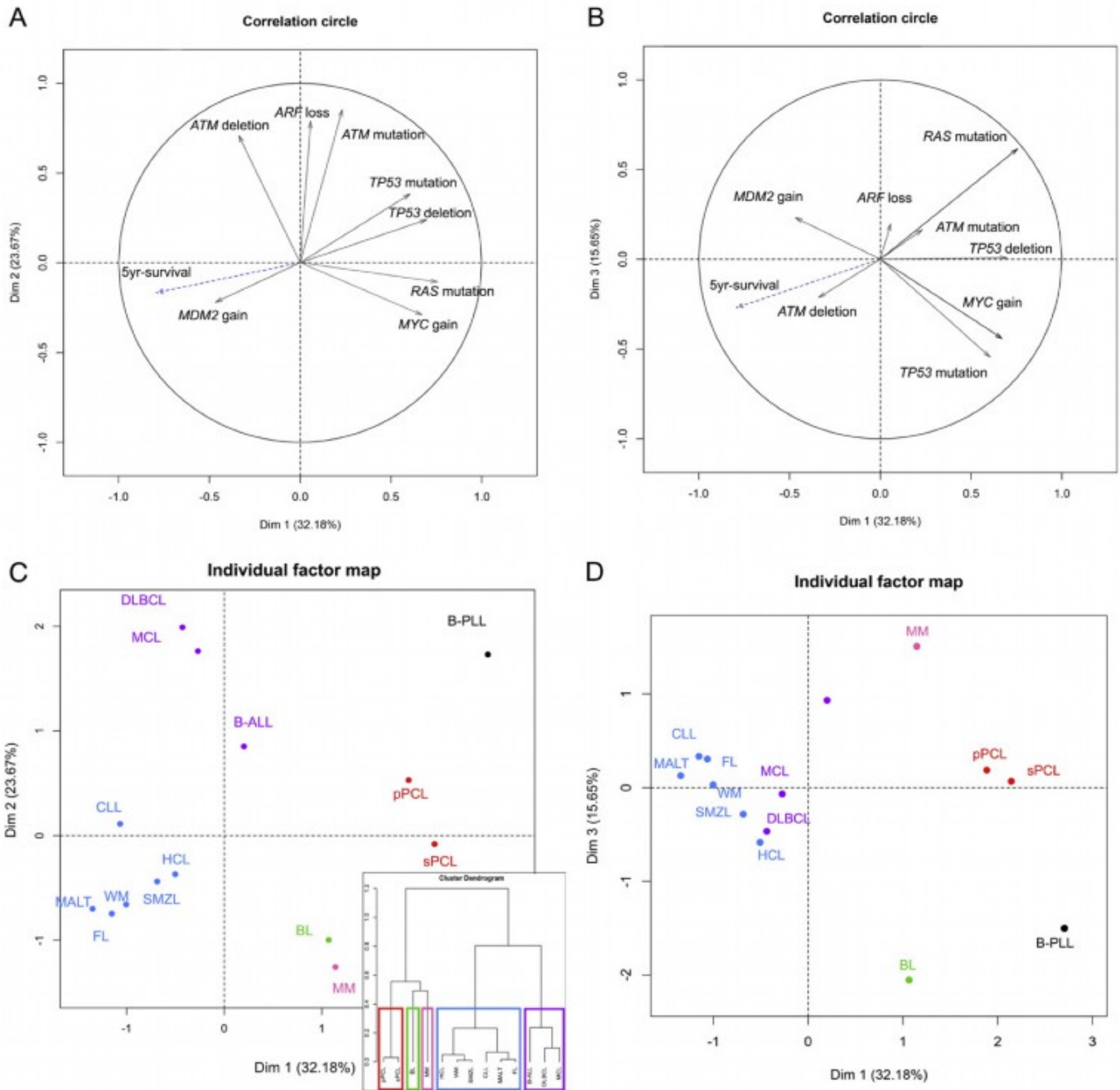


Fig. 3. A–B. Correlation circle of the first and second planes in the Multi Factorial Analysis. MFA is a multidimensional reduction strategy (based on PCA) for grouped sets of variables (oncogenes and tumor suppressor genes in our study). MFA permits to study the link between sets of variable and balance the influence of each set. PCA is a statistical strategy used to obtain new and uncorrelated variables (i.e., principal components or dimensions), these latter having a decreasing variance for each new component i.e., the very first components will resume most of the variance of the full matrix. This strategy sums the information in a concise fashion, a few new variables representing the whole data set. A regularized iterative MFA/PCA was used to impute the missing variables rather than attributing the default mean value, not to induce bias in axis constructions [40]. B-PLL was not included in the dimension construction because of the lack of many data. The five-year survival rate was projected afterward, independently of the construction of the axes. *MYC*, *TP53*^{del}, *TP53*^{mut}, *RAS* and survival rates are correlated with the 1st dimension (correlation coefficients of 0.67, 0.7, 0.6, 0.76 and -0.8 , respectively). *ATM*^{del}, *ATM*^{mut}, and *ARF*^{loss} rates are correlated with the 2nd dimension (correlation coefficients of 0.71, 0.85 and 0.79). *RAS* mutation rate correlated with the 3rd dimension (correlation coefficient of 0.62). C. Representation of the individual factor map and clustering on first plan. MFA components coordinates of the different entities were used to construct an ascendant hierarchical clustering with complete linkage of Euclidian distance. The number of clusters was selected according to inertia gain and consolidated by k-means. The colors are related to the hierarchical clustering procedure. The classification was conducted without B-PLL and B-PLL point was projected after axes construction. D. Representation of the individual factor map and clustering on the dimensions 1 and 3. These two dimensions enable for a better separation of MM and BL, especially regarding their *RAS* status.

dysregulation or the implications of other abnormalities on the p53 pathway, either upstream or downstream of the p53 protein.

If p53 pathway interruption by *TP53* mutations is a major dominant event severely impacting prognosis, several other alterations of the pathway, such as *RAS* mutations, *MYC* copy number abnormalities and/or translocations, *MDM2* gains and *ARF* loss, may play important roles. As reported in Fig. 2 and Table 1, every entity was embedded

with *TP53* abnormalities, while *RAS* and *MYC* abnormalities were absent in some malignancies. Of note, abnormalities reported in our review are minor *ARF* promoter hypermethylation in DLBCL, or *TP53* promoter hypermethylation in CLL [14,18]. Our MFA analysis notes that *MYC* and *TP53*^{status} were associated, suggesting that *MYC* pressure favors p53 pathway abrogation. However, this association was not found in

MM that displays a high *MYC* but a low *TP53* incidence (incidence of *TP53* abnormalities increases during MM transition into sPCL). Nevertheless, loss or gain of *ARF* and *MDM2* might substitute for the lack of *TP53* loss of function in this entity. This significant *MYC/TP53* association was also found in human carcinoma, whatever their tissue origin, and appears to be “universal” in human cancer cells [19]. Across the histologies, *MYC* and *TP53* abnormalities are inversely associated with the overall survival rate at 5 years, reflecting aggressiveness of such histologies with *MYC* and/or *TP53* deregulations. Of note, these results are reminiscent of alteration of p53 pathway in the Eμ-Myc mouse model of lymphoma [20], and suggest that Myc is a major potent target in aggressive human B-Cell malignancies. A recent publication identified that inhibition of Aurora kinase A is efficient in reducing Myc expression and inducing cell death, especially in p53-deficient liver cancer cells [21]. If these findings are confirmed in other malignancies and in a large number of patients or cell lines, they would appear to be of particular interest for malignancies such as B-PLL and sPCL. The *MYC*, *TP53* and survival association was clearly not found in BL, which has a very good outcome despite high rate of both *MYC* and *TP53* abnormalities. By contrast to the other malignancies, *MYC* deregulation in BL is the unique abnormality driving the emergence of Burkitt lymphoma, which might be favored by *TP53* mutation, in a context of a global normal karyotype. This exception suggests that simultaneous deregulations in *MYC* and *TP53* genes are not the only responsible actors of adverse outcome.

RAS mutations were also both associated with *TP53* abnormalities and with survival (inversely). The malignancies harboring *RAS*, *TP53* and *MYC* abnormalities are PCLs, which have the worse survival among B-cell malignancies. Cells harboring *KRAS* activating mutations were reported to be addicted to the NFκB pathway and thus to be particularly sensitive to NFκB inhibitors [22]. Bortezomib, the first clinical proteasome inhibitor that can inhibit the NFκB pathway, is highly efficient against MM and MCL. Two clinical reports recently assessed patient response to bortezomib with regard to *RAS* mutations in MM [23, 24]. Although it is difficult to provide a definitive conclusion regarding *RAS* mutations and responses to bortezomib, we can underline that some patients with *RAS* mutations had a good response rate upon retreatment with bortezomib. Strikingly, *RAS* mutations only occur in three malignancies, all of which are characterized by a lack of BCR (B-ALL, MM and PCLs) [25]. This might suggest that *RAS* mutations could provide a substitution signaling for tonic/chronic BCR signaling, which is absent in these malignancies. HCLs are affected by *BRAF*^{V600E} mutation in almost all cases. Although Raf and Ras contribute to the MAPK pathway activation, we cannot consider that *BRAF* and *RAS* gain of functions are fully identical. Indeed, Ras signaling does not only involve Raf/MAPK pathway, but also PI3K/Akt and PLC (AKT and Ca⁺⁺ signaling) [26].

MDM2 overexpression is of particular interest for targeted therapies as it is a pharmacological target [27]. Indeed, several *MDM2/p53* interaction inhibitors are under clinical investigation, yet in solid and hematological tumors such as MM. Targeting *MDM2* in DLBCL and MM should be of interest as *MDM2* is overexpressed in both pathologies despite a lack of chromosomal abnormalities [28–30]. An alternative p53/ubiquitin-related regulator such as USP7 might also be of interest in p53 naïve malignancies, several USP7 inhibitors being under development.

Regarding p53 deficient cells, several strategies might be applied. On the one hand, drugs inducing DNA damage are known not to be highly efficient in cells harboring many abnormalities in the DNA damage response pathway but their combination with inhibitors of DNA repair is highly efficient in vitro [31]. Indeed, targeting critical proteins involved in p53-independent DNA repair in combination with DNA damaging drugs might be of particular interest for pathologies with frequent *TP53* abnormalities, which embodies the concept of “synthetic lethality”. Of note, it was recently reported that p53 represses the Fanconi anemia DNA repair pathway (after interstrand cross-linking damage), making it a major target in p53-deficient diseases [32]. On the other hand, strategies that aim to induce p53-independent cell death are of major interest. The so-called “p53-reactivating drugs”, which were

initially described as p53 mutant reactivating molecules, could be efficient in *TP53* abnormal cells as their efficacies are p53-independent. Indeed, the small molecules RITA and PRIMA-1^{Met}, which efficiently kill tumor cells, target the p53-independent DNA repair pathway and glutathione synthesis, respectively [33,34]. Another strategy is to bypass the p53 pathway by directly targeting either mitochondrial priming or glutathione metabolism using BH3-mimetics (e.g., Venetoclax [35–37]) or thioredoxin reactive molecules [38], respectively. The last emerging approach is the targeting of the associated deficiencies in p53 and type I IFN pathways in tumors by oncolytic viruses such as the vaccine strain of Measles Virus ([39]).

These alternative new treatments could be of interest in pathologies with frequent *TP53* deficiencies such as MCL, B-PLL or PCLs.

In conclusion, deep knowledge of hits in the p53 pathway for each malignancy allows the identification of therapeutic vulnerabilities, including in p53-deficient cells, that could be targeted with novel drugs or new drug regimens.

Research Agenda

- Improve the knowledge in the B-PLL p53 pathway hits
- Perform a systematic screen of the p53 pathway actors in patients' samples

Practice Points

- Deubiquitinases status should be investigated in newly diagnosed patients with wild-type *TP53*
- Myc inhibition drug development is warranted, MYC dysregulation appearing as an early and driver event.
- p53-pathway by-passing strategies may lead to high response rate, disregarding p53 pathway abnormalities accumulation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Benoît Tessoulin is the recipient for a fellowship from Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer, through INSERM poste-accueil status.

References

- [1] Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* Dec 2006;6(12):909–23.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* Mar 4 2011;144(5):646–74.
- [3] Zindy F, Eisen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* Jan 8 1998;12(15):2424–33.
- [4] Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* Nov 18 2004;432(7015):307–15.
- [5] Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* Oct 19 2010;18(4):367–81.
- [6] Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* Sep 2012;12(9):613–26.
- [7] Yuan J, Luo K, Zhang L, Chevillat JC, Lou Z. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* Feb 5 2010;140(3):384–96.
- [8] Khoronenkova SV, Dianova II, Temette N, Kessler BM, Parsons JL, Dianov GL. ATM-dependent downregulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. *Mol Cell* Mar 2012;45(6):801–13.
- [9] Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W. ARF-BP1/mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* Jul 1 2005;121(7):1071–83.
- [10] Swerdlow SH. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- [11] Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. *BRAF* mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* Jun 16 2011;364(24):2305–15.

- [12] Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd H-W, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* Mar 21 2013;121(12):2253–63.
- [13] Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* Nov 26 2015;126(22):2466–74.
- [14] Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* Sep 9 2008;105(36):13520.
- [15] Pasqualucci L, Dalla Favera R. The genetic landscape of diffuse large B cell lymphoma. *Semin Hematol* Apr 2015;52(2):67–76.
- [16] Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br J Haematol* Jan 2007;136(2):286–93.
- [17] Escofier B, Pagès J. Multiple factor analysis (AFMULT package). *Comput Statist Data Anal* Aug 1 1994;18(1):121–40.
- [18] Valgañón M, Giraldo P, Agirre X, Larráyoz MJ, Rubio-Martinez A, Rubio-Felix D, et al. p53 Aberrations do not predict individual response to fludarabine in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia in advanced stages Rai III/IV. *Br J Haematol* Apr 2005;129(1):53–9.
- [19] Ulz P, Heitzer E, Speicher MR. Co-occurrence of MYC amplification and TP53 mutations in human cancer. *Nat Genet* Feb 2016;48(2):104–6.
- [20] Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 1999 Oct 15;13(20):2658–69.
- [21] Dauch D, Rudalska R, Cossa G, Nault J-C, Kang T-W, Wuestefeld T, et al. A MYC-aurora kinase A protein complex represents an actionable drug target in p53-altered liver cancer. *Nat Med* May 2016;23.
- [22] Bommi-Reddy A, Kaelin WG. Slaying RAS with a synthetic lethal weapon. *Cell Res* Feb 2010;20(2):119–21.
- [23] Mulligan G, Lichter DJ, Di Bacco A, Blakemore SJ, Berger A, Koenig E, et al. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood* Jan 30 2014;123(5):632–9.
- [24] Smith D, Armenteros E, Percy L, Kumar M, Lach A, Herledan G, et al. RAS mutation status and bortezomib therapy for relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* Jun 2015;169(6):905–8.
- [25] Cobaleda C, Sánchez-García I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. *Bioessays* Jun 2009;31(6):600–9.
- [26] Downing J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* Jan 2003;3(1):11–22.
- [27] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* Feb 6 2004;303(5659):844–8.
- [28] Xu-Monette ZY, Möller MB, Tzankov A, Montes-Moreno S, Hu W, Manyam GC, et al. MDM2 phenotypic and genotypic profiling, respective to TP53 genetic status, in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP immunochemotherapy: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* Oct 10 2013;122(15):2630–40.
- [29] Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* Sep 15 2006;108(6):2020–8.
- [30] Elnenaï MO, Gruszka-Westwood AM, A'Hern R, Matutes E, Sirohi B, Powles R, et al. Gene abnormalities in multiple myeloma: the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* Jan 1 2003;88(5):529–37.
- [31] Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GL, D'Andrea AD. Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov* Nov 2015;5(11):1137–54.
- [32] Jaber S, Toufektchan E, Lejour V, Bardot B, Toledo F. p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Bull Commun* 2016;7:11091.
- [33] Tessoulin B, Descamps G, Moreau P, Maïga S, Lodé L, Godon C, et al. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* Sep 4 2014;124(10):1626–36.
- [34] Wanzel M, Viscchedyk JB, Gittler MP, Gremke N, Seiz JR, Hefter M, et al. CRISPR-Cas9-based target validation for p53-reactivating model compounds. *Nat Chem Biol* Jan 2016;12(1):22–8.
- [35] Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, Dousset C, Descamps G, Maïga S, et al. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* Oct 6 2011;118(14):3901–10.
- [36] Touzeau C, Dousset C, Bodet L, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Moreau A, et al. ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a bcl-2high/mcl-1low profile and synergizes with other antineoplastic agents. *Clin Cancer Res* Sep 15 2011;17(18):5973–81.
- [37] Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J, et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood* Jun 23 2016;127(25):3215–24.
- [38] Kiebała M, Skalska J, Casulo C, Brookes PS, Peterson DR, Hilchey SP, et al. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione antioxidant systems in malignant B cells: a novel synergistic therapeutic approach. *Exp Hematol* Feb 2015;43(2):89–99.
- [39] Lok A, Pellat-Deceunynck C. Abstract N 310: the oncolytic measles virus preferentially infects p53 abnormal myeloma cells [Internet]. San Diego, CA: American Society of Hematology; Dec 2016 (cited 2016 Nov 8). Report No.: Abstract N 310. Available from: <https://ash.confex.com/ash/2016/webprogram/Paper89312.html>.
- [40] Husson F, Josse J. Handling missing values in multiple factor analysis. *Food Quality and Preference* Dec 2013;30(2):77–85.
- [41] Liang D-C, Shih L-Y, Fu J-F, Li H-Y, Wang H-I, Hung I-J, et al. K-Ras mutations and N-ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* Feb 15 2006;106(4):950–6.
- [42] Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* Apr 15 2007;109(8):3189–97.
- [43] Xu N, Li Y-L, Zhou X, Cao R, Li H, Lu Q-S, et al. CDKN2 gene deletion as poor prognosis predictor involved in the progression of adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients. *J Cancer* 2015;6(11):1114–20.
- [44] Forero-Castro M, Robledo C, Benito R, Abáigar M, Martín AA, Arefi M, et al. Genome-wide DNA copy number analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new genetic markers associated with clinical outcome. *PLoS One* Feb 12 2016;11(2):e0148972.
- [45] Haidar MA, Kantarjian H, Manshour T, Chang C-Y, O'Brien S, Freireich E, et al. ATM gene deletion in patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* Mar 1 2000;88(5):1057–62.
- [46] Gumy Pause F, Wacker P, Maillet P, Betts D, Sappino A-P. ATM gene alterations in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mutat* May 2003;21(5):554.
- [47] Stengel A, Schnitter S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood* Jul 10 2014;124(2):251–8.
- [48] DeAngelo DJ, Stevenson KE, Dahlberg SE, Silverman LB, Couban S, Supko JG, et al. Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18–50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* Mar 2015;29(3):526–34.
- [49] Del Giudice I, Osuji N, Dexter T, Brito-Babapulle V, Parry-Jones N, Chiaretti S, et al. B-cell prolymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia have distinctive gene expression signatures. *Leukemia* Jul 30 2009;23(11):2160–7.
- [50] Flatley E, Chen AI, Zhao X, Jaffe ES, Dunlap JB, Pitaluga S, et al. Aberrations of MYC are a common event in B-cell prolymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* Sep 2014;142(3):347–54.
- [51] Lens D, Schouwer PJJCD, Hamoudi RA, Abdul-Rauf M, Farahat N, Matutes E, et al. p53 Abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* Mar 15 1997;89(6):2015–23.
- [52] Hercher C, Robain M, Davi F, Garand R, Flandrin G, Valensi F, et al. A multicentric study of 41 cases of B-prolymphocytic leukemia: two evolutive forms; the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire. *Leuk Lymphoma* Jan 1 2001;42(5):981–7.
- [53] Zhang J, Jima D, Moffitt AB, Liu Q, Czader M, Hsi ED, et al. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* May 8 2014;123(19):2988–96.
- [54] Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-García D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov 5 2013;110(45):18250–5.
- [55] Sander S, Bullinger L, Leupolt E, Benner A, Kienle D, Katzenberger T, et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* May 1 2008;93(5):680–7.
- [56] Delfau-Lauze M-H, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood* Jul 30 2015;126(5):604–11.
- [57] Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martín-Suero J, Niélander I, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* Jun 1 2005;105(11):4445–54.
- [58] Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* Feb 2003;3(2):185–97.
- [59] Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G. Absence of ATM hypermethylation in mantle cell and follicular lymphoma. *Leukemia* Mar 3 2005;19(5):880–2.
- [60] Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, Chan WC, Vose JM, Smith LM, et al. Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr 29 2003;100(9):5372–7.
- [61] Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* Feb 14 2006;103(7):2352–7.
- [62] Solenthaler M, Matutes E, Brito-Babapulle V, Morilla R, Catovsky D. p53 and mdm2 in mantle cell lymphoma in leukemic phase. *Haematologica* Jan 1 2002;87(11):1141–50.
- [63] Stefancikova I, Moulis M, Fabian P, Ravukhova B, Vasova I, Muzik J, et al. Loss of the p53 tumor suppressor activity is associated with negative prognosis of mantle cell lymphoma. *Int J Oncol* Mar 1 2010;36(3):699–706.
- [64] Halkósdóttir AM, Lundin A, Murray F, Mansouri I, Knuutila S, Sundström C, et al. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* Dec 2011;25(12):1904–8.
- [65] Dong H-J, Zhou L-T, Fang C, Fan L, Zhu D-X, Wang Y-H, et al. TP53 mutation is not an independent prognostic factor in patients with mantle cell lymphoma at advanced stage. *Med Oncol* Nov 6 2011;29(3):2166–73.
- [66] Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* May 15 1996;87(10):4302–10.
- [67] Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* Apr 15 1996;87(8):3351–9.

- [68] Hartmann E, Fernández V, Stoecklein H, Hernández L, Campo E, Rosenwald A. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* Apr 1 2007;92(4):574–5.
- [69] Slotta-Huspenina J, Koch I, Leval L de, Keller G, Klier M, Bink K, et al. The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index. *Haematologica* Sep 1 2012;97(9):1422–30.
- [70] Leux C, Maynadié M, Troussard X, Cabrera Q, Herry A, Le Guyader-Peyrou S, et al. Mantle cell lymphoma epidemiology: a population-based study in France. *Ann Hematol* Aug 2014;93(8):1327–33.
- [71] Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C, et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet* Aug 6 2016;388(10044):565–75.
- [72] Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* Oct 22 2015;526(7574):525–30.
- [73] Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM, et al. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* Jul 15 2012;18(14):3791–802.
- [74] Guiéze R, Robbe P, Clifford R, Guibert S de, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood* Oct 29 2015;126(18):2110–7.
- [75] Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom leukemia research fund chronic lymphocytic leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 2012 Dec 20;30(36):4524–32.
- [76] Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* Dec 6 2012;120(24):4783–94.
- [77] Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* Oct 10 2010;28(29):4473–9.
- [78] Trbusek M, Malcikova J, Smardova J, Kuhrova V, Mentzlova D, Francova H, et al. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* Mar 30 2006;20(6):1159–61.
- [79] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* Dec 28 2000;343(26):1910–6.
- [80] Vollbrecht C, Mairinger FD, Koitzsch U, Peifer M, Koenig K, Heukamp LC, et al. Comprehensive analysis of disease-related genes in chronic lymphocytic leukemia by multiplex PCR-based next generation sequencing. *PLoS One* Jun 8 2015;10(6) (Internet, cited 2015 Nov 3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459702/>.
- [81] Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AMR, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* Aug 1 2001;98(3):814–22.
- [82] Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* Oct 15 2008;112(8):3322–9.
- [83] Guiéze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* Jul 23 2015;126(4):445–53.
- [84] Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herfling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* Jan 14 2016;127(2):208–15.
- [85] Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* Sep 2015;16(9):1111–22.
- [86] Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* Aug 1 1992;80(3):758–67.
- [87] Christie L, Kernohan N, Levison D, Sales M, Cunningham J, Gillespie K, et al. C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: an adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma* Mar 2008;49(3):470–6.
- [88] Pinyol M, Hernández L, Martínez A, Cobo F, Hernández S, Beà S, et al. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol* Jun 2000;156(6):1987–96.
- [89] Alhajjaily A, Day AG, Feilother HE, Baetz T, Lebrun DP. Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res* Mar 15 2014;20(6):1676–86.
- [90] Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE, Lachel C, Wright GW, Iqbal J, et al. Genome-wide copy number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* Mar 13 2014;123(11):1681–90.
- [91] Ross CW, Ouillette PD, Saddler CM, Shedden KA, Malek SN. Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res* Aug 15 2007;13(16):4777–85.
- [92] Johnson NA, Al-Tourah A, Brown CJ, Connors JM, Gascoyne RD, Horsman DE. Prognostic significance of secondary cytogenetic alterations in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* Dec 1 2008;47(12):1038–48.
- [93] Lossos IS, Thorstenson YR, Wayne TL, Oefner PJ, Levy R, Chu G. Mutation of the ATM gene is not involved in the pathogenesis of either follicle center lymphoma or its transformation to higher-grade lymphoma. *Leuk Lymphoma* May 2002;43(5):1079–85.
- [94] Bellido M, Capello D, Altes A, Estivill C, Gaidano G, Pujol R, et al. Bcl-6 p53 mutations in lymphomas carrying the bcl-2/Jh rearrangement. *Haematologica* Jan 1 2002;87(9):908–17.
- [95] O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, MacDougall F, et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* Oct 15 2008;112(8):3126–9.
- [96] Seymour JF, Feugier P, Offner F, Lopez-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Updated 6 year follow-up of the PRIMA study confirms the benefit of 2 year rituximab maintenance in follicular lymphoma patients responding to frontline immunochemotherapy. *Blood* Nov 15 2013;122(21):509.
- [97] Love C, Sun Z, Jima D, Li G, Zhang J, Miles R, et al. The genetic landscape of mutations in burkitt lymphoma. *Nat Genet* Dec 2012;44(12):1321–5.
- [98] Taniguchi T, Chikatsu N, Takahashi S, Fujita A, Uchimaru K, Asano S, et al. Expression of p16INK4A and p14ARF in hematological malignancies. *Leukemia* Nov 1999;13(11):1760–9.
- [99] Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A, et al. Inactivation of the ARF-MDM2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* Dec 18 2003;18(3):584–8.
- [100] Leventaki V, Rodic V, Tripp SR, Bayerl MG, Perkins SL, Barnette P, et al. TP53 pathway analysis in paediatric Burkitt lymphoma reveals increased MDM4 expression as the only TP53 pathway abnormality detected in a subset of cases. *Br J Haematol* Sep 1 2012;158(6):763–71.
- [101] Forero-Castro M, Robledo C, Lumbreras E, Benito R, Hernández-Sánchez JM, Hernández-Sánchez M, et al. The presence of genomic imbalances is associated with poor outcome in patients with burkitt lymphoma treated with dose-intensive chemotherapy including rituximab. *Br J Haematol* Feb 1 2016;172(3):428–38.
- [102] Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, Burkhardt B, Feller AC, Hummel M, et al. Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* Dec 1 2010;95(12):2047–55.
- [103] Sánchez-Beato M, Sáez AI, Navas JC, Algara P, Sol Mateo M, Villuendas R, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol* Jul 2001;159(1):205–13.
- [104] Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun 15 1991;88(12):5413–7.
- [105] Toujani S, Dessen P, Ichzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, et al. High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One* 2009;4(9):e7089.
- [106] Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, Haake A, Weniger MA, Bergmann AK, et al. DNA methylation analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet* 2015 Nov;47(11):1316–25.
- [107] Hoelzer D, Walewski J, Döhner H, Viardot A, Hiddemann W, Speikermann K, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood* Dec 18 2014;124(26):3870–9.
- [108] Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun 3 2012;109(10):3879–84.
- [109] Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* Jul 31 2011;43(9):830–7.
- [110] Möller MB, Ino Y, Gerdes AM, Skjoldt K, Louis DN, Pedersen NT. Aberrations of the p53 pathway components p53, MDM2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* Mar 1999;13(3):453–9.
- [111] Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, Parmentier F, Picquetot J-M, Ruminy P, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* Aug 19 2010;116(7):1092–104.
- [112] Grønbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldborg P. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* Aug 15 2002;100(4):1430–7.
- [113] Zhu Y, Monni O, Franssila K, Elonen E, Vilpo J, Joensuu H, et al. Deletions at 11q23 in different lymphoma subtypes. *Haematologica* Jan 1 2000;85(9):908–12.
- [114] Mareschal S, Dubois S, Vially P-J, Bertrand P, Bohers F, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* March 2016;55(3):251–67.
- [115] Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC, Tzankov A, Liu W, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* Nov 8 2012;120(19):3986–96.
- [116] Koduru PRK, Raju K, Vadmal V, Menezes G, Shah S, Susin M, et al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* Nov 15 1997;90(10):4078–91.
- [117] Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene

- expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* May 16 2013;121(20):4021–31.
- [118] Hiyaori T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Masuda H, Miyamoto M, et al. Helicobacter pylori eradication therapy for high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas of the stomach with analysis of p53 and K-ras alteration and microsatellite instability. *Int J Oncol* Jun 2001;18(6):1207–12.
- [119] Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, Arcaini L, Bhagat G, Novak U, et al. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* Feb 3 2011;117(5):1595–604.
- [120] Braggio E, Dogan A, Keats JJ, Chng WJ, Huang G, Matthews JM, et al. Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Mod Pathol* May 1 2012;25(5):651–60.
- [121] Zhang G-P, Cao P-F, Feng L-J. Detection and clinical significance of genes in primary gastrointestinal MALT lymphoma. *Tumour Biol* Nov 23 2013;35(4):3223–8.
- [122] Sol Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sánchez-Beato M, Martínez-Delgado B, et al. Analysis of the frequency of microsatellite instability and p53 gene mutation in splenic marginal zone and MALT lymphomas. *Mol Pathol* Oct 1998;51(5):262–7.
- [123] Chen P-M, Chiou T-J, Yu I-T, Fan FS, Chu C-J, Kao S-C, et al. Molecular analysis of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma of ocular adnexa. *Leuk Lymphoma* Jan 1 2001;42(1–2):207–14.
- [124] Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Cavalli F. The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* Jul 15 2000;96(2):410–9.
- [125] Martínez N, Almaraz C, Vaqué JP, Varela I, Derdak S, Beltran S, et al. Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia* Jun 2014;28(6):1334–40.
- [126] Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Walewska R, et al. Genetics and prognostication in splenic marginal zone lymphoma: revelations from deep sequencing. *Clin Cancer Res* Sep 15 2015;21(18):4174–83.
- [127] Salido M, Baró C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* Sep 2 2010;116(9):1479–88.
- [128] Fresquet V, Robles EF, Parker A, Martínez-Useros J, Mena M, Malumbres R, et al. High-throughput sequencing analysis of the chromosome 7q32 deletion reveals IRF5 as a potential tumour suppressor in splenic marginal-zone lymphoma. *Br J Haematol* Sep 1 2012;158(6):712–26.
- [129] Piva R, Deaglio S, Famà R, Buonincontri R, Scarfò I, Brusca A, et al. The Krippel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia* Feb 2015;29(2):503–7.
- [130] Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Brusca A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med* Aug 27 2012;209(9):1537–51.
- [131] Liu L, Wang H, Chen Y, Rustveld L, Liu G, Du XL. Splenic marginal zone lymphoma: a population-based study on the 2001–2008 incidence and survival in the United States. *Leuk Lymphoma* Jul 1 2013;54(7):1380–6.
- [132] Weston-Bell NJ, Tapper W, Gibson J, Bryant D, Moreno Y, John M, et al. Exome sequencing in classic hairy cell leukaemia reveals widespread variation in acquired somatic mutations between individual tumours apart from the signature BRAF V(600)E lesion. *PLoS One* 2016;11(2):e0149162.
- [133] Haglund U, Juliusson G, Stellan B, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood* May 1 1994;83(9):2637–45.
- [134] Rinaldi A, Kwee I, Young KH, Zucca E, Gaidano G, Forconi F, et al. Genome-wide high resolution DNA profiling of hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* Aug 2013;162(4):566–9.
- [135] Forconi F, Sozzi E, Cencini E, Zaja F, Intermesoli T, Stelitano C, et al. Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. *Blood* Nov 19 2009;114(21):4696–702.
- [136] Dierlamm J, Stefanova M, Wlodarska I, Michaux L, Hinz K, Penas EM, et al. Chromosomal gains and losses are uncommon in hairy cell leukemia: a study based on comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* Jul 15 2001;128(2):164–7.
- [137] König EA, Kusser WC, Day C, Porzolt F, Glickman BW, Messer G, et al. p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia* Apr 2000;14(4):706–11.
- [138] Cornet E, Tomowiak C, Tanguy-Schmidt A, Lepretre S, Dupuis J, Feugier P, et al. Long-term follow-up and second malignancies in 487 patients with hairy cell leukemia. *Br J Haematol* Aug 2014;166(3):390–400.
- [139] Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* Aug 30 2012;367(9):826–33.
- [140] Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grelier A, Mould S, Barin C, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* Apr 2013;98(4):649–54.
- [141] Braggio E, Keats JJ, Leleu X, Van Wier S, Jimenez-Zepeda VH, Valdez R, et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappa B signaling pathways in Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer Res* Apr 15 2009;69(8):3579–88.
- [142] Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* Mar 13 2014;123(11):1637–46.
- [143] Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood* Apr 30 2009;113(18):4163–70.
- [144] Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, Agnelli L, Marzotati S, Fabris S, et al. Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation. *Oncotarget* Sep 15 2015;6(27):24205–17.
- [145] Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* Nov 20 2015;33(33):3911–20.
- [146] Affer M, Chesi M, Chen WD, Keats JJ, Demchenko YN, Tamizhmani K, et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* Aug 2014;28(8):1725–35.
- [147] Austen B, Barone G, Reiman A, Byrd PJ, Baker C, Starczynski J, et al. Pathogenic ATM mutations occur rarely in a subset of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* Sep 2008;142(6):925–33.
- [148] Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* Apr 15 2007;109(8):3489–95.
- [149] Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, et al. Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia* Mar 2016;30(3):633–9.
- [150] Kazmi SM, Nusrat M, Gunaydin H, Cornelison AM, Shah N, Kebriaei P, et al. Outcomes among high-risk and standard-risk multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* Nov 2015;15(11):687–93.
- [151] Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* Oct 9 2015;33(26):2863–9.
- [152] Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Penarun E, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* Sep 2001;18(3):212–24.
- [153] Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* Jan 24 2008;22(5):1044–52.
- [154] Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau J-L, Bataille R. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* Nov 15 2001;98(10):3082–6.
- [155] Chiecchio L, Dagrada GP, White HE, Townsend MR, Protheroe RKM, Cheung KL, et al. Frequent upregulation of MYC in plasma cell leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* Jul 2009;48(7):624–36.
- [156] Mosca L, Musto P, Todoerti K, Barbieri M, Agnelli L, Fabris S, et al. Genome-wide analysis of primary plasma cell leukemia identifies recurrent imbalances associated with changes in transcriptional profiles. *Am J Hematol* Jan 1 2013;88(1):16–23.
- [157] Royer B, Minvielle S, Diouf M, Roussel M, Karlin L, Hulin C, et al. Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, dexamethasone induction followed by stem cell transplantation for primary plasma cell leukemia: a prospective phase II study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol* Jun 20 2016;34(18):2125–32.
- [158] Cifola I, Lionetti M, Pinatel E, Todoerti K, Mangano E, Pietrelli A, et al. Whole-exome sequencing of primary plasma cell leukemia discloses heterogeneous mutational patterns. *Oncotarget* Jul 10 2015;6(19):17543–58.
- [159] Chang H, Sloan S, Li D, Patterson B. Genomic aberrations in plasma cell leukemia shown by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* Jan 15 2005;156(2):150–3.
- [160] Lionetti M, Barbieri M, Manzoni M, Fabris S, Bandini C, Todoerti K, et al. Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* Feb 8 2016;7(16):21353–61.
- [161] Gonsalves WL, Rajkumar SV, Go RS, Dispenzieri A, Gupta V, Singh PP, et al. Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis. *Blood* Aug 7 2014;124(6):907–12.
- [162] Katodritou E, Terpos E, Kelaïdi C, Kotsopoulou M, Delimpasi S, Kyrtsonis M-C, et al. Treatment with bortezomib-based regimens improves overall response and predicts for survival in patients with primary or secondary plasma cell leukemia: analysis of the Greek myeloma study group. *Am J Hematol* Feb 1 2014;89(2):145–50.

Article 2. Human myeloma cell lines display mutations related to myeloma patients at relapse and harbor major hits in the DNA repair

Tessoulin et al, Soumis

Résumé :

Les lignées humaines de myélome multiple (HMCLs) sont largement utilisées pour la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le MM. Cependant, si les HMCLs sont représentatives de la diversité cytogénétique des patients, elles ne la recouvrent pas totalement, en particulier les clones hyperdiploïdes purs n'existent pas. Nous avons réalisé le séquençage des exons de 33 HMCLs, établies au cours des 50 dernières années dans une douzaine de laboratoires internationaux. En absence d'ADN non-tumoral une stratégie de filtre, en particulier basé sur l'ethnicité, a été réalisée permettant de réduire drastiquement le nombre de variants par lignée (307 à 916 / lignée). Les mutations faux-sens sont les plus fréquentes (92%) et *TP53* est le gène le plus altéré (67%). Les anomalies bi-alléliques touchent les gènes de régulation du cycle cellulaire (*RB1*, *CDKN2C*), de la voie NFκB (*TRAF3*, *BIRC2*) et de la voie p53 (*TP53*, *CDKN2A*). La proportion d'inactivation par mutation/délétion dans les HMCLs est similaire à celle des patients pour certains gènes comme *DIS3*, *PRDM1* ou *KRAS*, alors que d'autres sont beaucoup plus impactés dans les HMCLs (*TP53*, *CDKN2C*, *NRAS*, *PRKD2*). Compte-tenu du faible nombre de patients porteurs de PCL séquencés à ce jour, nous n'avons pas pu confronter notre modèle HMCLs aux données de ces patients, dont nous supposons cependant qu'ils se rapprochent le plus, au vu de leurs transcriptomes respectifs. Au sein des voies de signalisation, la voie MAPK est la plus altérée (82% des HMCLs), principalement par des mutants de *RAS*. De façon inattendue, les HMCLs présentent de très nombreuses anomalies génomiques des gènes régulant l'épigénétique (73%) et de ceux de la voie de l'anémie de Fanconi (54%), tandis que peu d'anomalies concernent la machinerie apoptotique. Nous mettons en évidence les liens d'association/exclusion entre différents mutants, entre autres dans les voies MAPK et p53, ainsi que dans la régulation chromatinienne. Finalement, nous avons combiné les données d'expression génique, de mutations/délétions et de réponses aux drogues, mettant en évidence la dépendance de certains traitements à des activités biologiques, ainsi que les possibilités de contournement des anomalies.

Human myeloma cell lines display mutations related to myeloma patients at relapse and harbor major hits in the DNA repair

Benoît Tessoulin^{1,2}, Agnès Moreau-Aubry¹, Géraldine Descamps¹, Patricia Gomez-Bougie¹, Sophie Maïga¹, Alban Gaignard³, David Chiron¹, Emmanuelle Ménoret⁴, Steven Le Gouill^{1,2}, Philippe Moreau^{1,2}, Martine Amiot¹ and Catherine Pellat-Deceunynck¹

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France. ² Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU, Nantes, France. ³ Bird Platform, Inserm 1087, Nantes, France. ⁴ Myelomax SAS, Nantes, France

Running title: HMCLs harbor mutations related to refractory MM patients

Keywords: myelomas, WES, Tumor Suppressors, DNA repair, Fanconi pathway

Corresponding Authors: Benoit Tessoulin, MD and Catherine Pellat-Deceunynck, PhD; INSERM, UMR 1232, CNRS, ERL 6001, CRCINA, IRS-UN, 8, quai Moncoussu, Nantes, BP70721 F-44007 France. Ph 33 2 28 08 02 98,

benoit.tessoulin@univ-nantes.fr, catherine.pellat-deceunynck@univ-nantes.fr

Authorship

BT designed the project, performed bioinformatics analyses and wrote the paper

AG participated in the bioinformatics analyses

AMA, GD, PGB, SM, DC and EM performed experiments

SLG, PM and MA participated in the design of the project

CPD designed the project and wrote the paper

Competing Interests

Authors declare no conflicts of interest with the presented data.

Abstract

Human myeloma cell lines (HMCLs) are widely used for their representation of primary myeloma cells because they cover patient diversity, although not fully. We performed whole-exon sequencing of 33 HMCLs, which were established over the last 50 years in 12 laboratories. Missense mutations were the most frequent hits in genes (92%). HMCLs harbored between 307 and 916 mutations per sample, with *TP53* being the most mutated gene (67%). Recurrent bi-allelic losses were found in genes involved in cell cycle regulation (*RB1*, *CDKN2C*), the NFκB pathway (*TRAF3*, *BIRC2*) and the p53 pathway (*TP53*, *CDKN2A*). Frequency of mutations/deletions in HMCLs were either similar to that of patients (e.g. *DIS3*, *PRDM1*, *KRAS*), or highly increased (e.g. *TP53*, *CDKN2C*, *NRAS*, *PRKD2*). MAPK was the most altered pathway (82% of HMCLs), mainly by *RAS* mutants. Surprisingly, HMCLs displayed alterations in epigenetic (73%) and Fanconi anemia (54%) and few alterations in apoptotic machinery. We further identified mutually exclusive and associated mutations/deletions in genes involved in the MAPK and p53 pathways as well as in chromatin regulator/modifier genes. Finally, by combining the gene expression profile, gene mutation, gene deletion and drug response, we demonstrated that several targeted drugs overcome or bypass some mutations.

Introduction

Human myeloma cell lines (HMCLs) are widely used for their representation of primary myeloma cells because they cover patient diversity, although not fully¹. HMCLs are mainly derived from refractory patients, mostly presenting with extramedullary disease and having thus received numerous classes of drugs inducing DNA damage, proteasome inhibition, immunomodulation and anti-inflammation (e.g., melphalan, bendamustine, Velcade, Revlimid, and dexamethasone). However, HMCLs harbor the 14q32 abnormality, which occurs early at the MGUS stage, and display frequent mutations in *NRAS* and *KRAS*, as observed in patients at diagnosis (approximately 50% of patients)^{2,3}. By contrast, HMCLs display very frequent deletion and mutation in the *TP53* gene that are associated with resistance to treatments⁴. Indeed, it is well known that hits in the *TP53* gene (deletion and/or mutation) at diagnosis are associated with resistance and shortened survival and that their frequency increases with relapse^{4,5}. Thus, HMCLs are a mixture of abnormalities occurring both early and late in the time course of disease. Besides hits in the *TP53* and *RAS* genes, HMCLs have not been widely characterized for their global mutation profile and gene deletion. In the present work, using whole-exon sequencing (WES) in 33 HMCLs, we report common gene mutations and deletions. We analyzed the frequency of mutations/deletions in comparison with patients at diagnosis and relapse. We further identified hits preferentially associated with 14q32 translocations and analyzed responses to conventional and nonconventional drugs in relation to a mutation and/or deletion profile.

Materials and Methods

HMCLs and primary MM cells

HMCLs were previously characterized^{1,6,7}. HMCLs were cultured in RPMI-5% fetal calf serum with or without 3 ng/ml of IL6^{1,6,7}. Gene expression profile of HMCLs has been previously published¹. The gene expression profile of primary MM cells was assessed from 414 patients (Arkansas) as previously described^{1,8}.

Whole-Exome Sequencing

DNA sample processing was performed according to Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) using the SURESELECT TARGET ENRICHMENT SYSTEM kit (Human all exon v6, library version 1.6). Sequencing was performed on HiSeq 2500, High Output in paired-end 2*100 bp. The reads were aligned (BWA-v0.7.10-r789) to the GRCh37 human reference genome. Duplicated reads were marked by the Picard tool (v1.119), indels were realigned around capture (+/-500 bp), and base quality recalibration was finally performed (Genome Analysis Toolkit [GATK-v3.2.2]). In the absence of germline DNA, variants were called by the GATK unified genotyper. Variants were processed through vcf2maf-1.6.15 to obtain a final Mutant Annotation File (maf). The variants' biological effects predictions were carried out using Ensembl's VEP-annotator-v.86. Variant annotation database versions were as follows: ExAC-r0.3.1 [likely germline variants], dbSNP-v.144 [known variants], COSMIC-71 and ClinVar-v.201507 [clinical significance of known variants].

Variants that were present more than 3 times were removed, as well as variants with Global Allele Frequency in ExAC databases over 1% (with respect to ethnicity frequencies when known). Finally, clinically benign mutants, as annotated by ClinVar, were removed ("benign" or "likely benign"). Only protein-coding variants were used for subsequent analyses, and structural protein coding genes (actin, myosin, collagen, fibronectin, vitronectin, tenascin, laminin, titin, obscurin, plectin, aggrecan, and mucins) were removed.

Exon loss was estimated from the read depth using ExomeCOPY and CANOES. The results were validated by visual inspection of the BAM read depth in Integrative Genomics Viewer (IGV; Broad Institute). Genes with frequent variants were selected, and were assessed by direct Sanger sequencing on cDNA.

Functional assays

The cell count and viability were measured using the MTT assay. The cell cycle distribution was assessed by propidium iodide incorporation. Rb phosphorylation was assessed by western blotting (Cell Signaling; 4H1 and S807-811). The area under the curve (AUC) was estimated using Graphpad Prism v7.0 for palbociclib (0-1 μ M), CX5461 (0-1 μ M) and trametinib (0-25 nM). The responses to melphalan, bendamustine, FAS and TRAIL-R agonist antibodies, PRIMA-1^{Met}, dexamethasone, RITA, ABT-737 and ABT-199 were previously reported^{6,9-14}. Results were scaled (mean-centered and standardized) to provide a z-score.

Statistical analyses

Analyses were performed under R 3.4.4. Fisher's test was carried out with the resampling of parameters for robustness. The somatic interaction plot code was adapted from Gerstung *et al.*¹⁵. Enrichment analyses were carried out by ReactomePA and clusterProfiler^{16,17}, p-values were adjusted for multiple testing by the false discovery rate ($q=0.05$). For the Reactome determination, KEGG and GO annotations were used. MAF manipulation was performed using the maftools packages¹⁸. Oncoprints, heatmaps and Chord-Diagrams were performed with ComplexHeatmap R-package. Considering the number of samples, the linear regressions between scores and drug responses were calculated by robust a linear regression using a M-estimator (rlm, MASS package) in order to discard outliers. Coefficients were further bootstrapped by Boot function (car package), with 5000 replicates (seed= 22062016) and considered significant if the 95% Confidence Interval (95%CI) didn't overlap with zero, only β_1 coefficients are presented in the text.

Results

Metrics and variant filtering

WES was performed in 33 HMCLs of European, American or Asian origin, 19 having been derived in the presence of exogenous IL6 (Table S1). After global SNP enrichment analysis on 609585 bi-allelic SNPs (SNPRelate package¹⁹), 3 groups of HMCLs were identified: a group gathering HMCLs of Pacific/Japanese origin (AMO-1, KMM1, KMS12PE, KMS11, NAN8, OPM2) and a cluster encompassing all other HMCLs except MM1S, which was individualized as African ethnicity (Figure S1). To remove ethnic-related SNPs, HMCLs were filtered with Global Allele Frequencies, plus East Asian frequencies for the Pacific/Japanese cluster and African frequencies for MM1S. Because of the lack of normal DNA from patients from whom the HMCLs were derived, we could not easily discriminate the constitutive SNPs from the tumor-associated mutations. Thus, we excluded variants shared by more than 3 HMCLs of the 33: indeed, the most mutated genes in HMCLs and myeloma patients²⁰ *i.e.*, *RAS* and *TP53* never displayed more than 3 identical variants across the HMCL collection. For *NRAS*, the most frequent variant was c.38G-A (Gly12Asp) in JJN-3, Karpas620 and Nan7, while the only *TP53* shared variant was 406G-A (Karpas620, XG11). Variant effect predictions were carried out as described in the Materials and Methods section. We further removed variants of genes uniformly low expressed across the collection (maximum of the considered gene inferior to the 1st quartile mean expression of the microarray). After filtering, we retained 15 602 variants, spanning over 7 641 genes (Maf file, Supplemental Information 2). Most mutated samples were KMM1 and KMS12PE with 916 and 755 variants, respectively. The most frequent variant was missense (n=14 309; 92%), while frameshifts occurred in 273 variants (1.7%), insertions or deletions without frameshifts occurred in 226 cases (1.4%), and 482 variants (3.1%) were nonsense mutations Figure S2. Single mutations were mainly C>T transitions (63%, Figure S3), corresponding to spontaneous deamination of 5-methyl cytosine. HMCLs age wasn't associated with a particular mutation (Fisher test, FDR >0.05), but younger cell lines displayed a lower mutation load ($\beta=4.29$, 95% CI=[1.07;9.47]). Mutations were confirmed in 18 genes by direct sequencing of RT-PCR products as previously reported for *RAS* and *TP53*^{1,9} (Table S2). Although amplification of genes was not assessed because of the high number of chromosome abnormalities across the HMCL collection, exon losses were reported as described in the Materials and Methods section.

HMCLs display alterations similar to those in MM cells

Figure 1 shows the most frequently altered genes across the collection and recurrent in MM²⁰⁻²². Residues modified by mutants are provided in Figure S4. Five genes *i.e.*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *CDKN2C* and *PRKD2* were altered in at least 21% and up to 67% of HMCLs.

HMCLs shared a similar mutations rate with MM patients, either at diagnosis (DMM) or relapse (RMM): *DIS3* (12% in HMCLs, 10% in DMM and 13% in RMM), *PRDM1* (3%, 2% and 5%, respectively), *BIRC3* (3%, 2 and 3%, respectively) and *EGR1* (3%, 4% and 4%, respectively) , Figure 2. Of note, these very similar rates among HMCLs, DMM and RMM were in favor of early pathogenic mutations, poorly affected by subsequent treatment selection or cell culture. *KRAS* mutation rates were roughly shared between HMCLs, DMM and RMM (21%, 24.7% and 27%, respectively). By contrast, the *NRAS* mutation rate increased from DMM (19%), to RMM (24%) and HMCLs (30%). Similarly, *TP53* (67%), *CDKN2C* (33%), *PRKD2* (18%), *FAM46C* (15%) and *BRAF* (15%) mutation rates displayed a dramatically increased frequency in HMCLs compared with those in primary myeloma cells, either in DMM or RMM^{2,20-24} (Figure 2). These high frequencies in the *FAM46C*, *TP53*, *BRAF*, and *NRAS* rates might be in line with either successive relapses or secondary plasma cell leukemia (PCL), from which HMCLs are mostly derived and as recently shown for secondary PCL with 46% of *TP53*^{Deletion25-29}.

WES revealed that HMCLs displayed frequent mutations in Fanconi anemia genes (*PALB2* [12%], *FANCI* [12%], *FANCA* [9%], *FANCD2* [9%], *BRCA2* [9%]) as well as in helicases (*such as RECQL4*, 15%, and *BLM*, 15%) and epigenetic modifiers (*e.g.*, *TET2*, 15% and *SETD2*, 6%). FANC family genes were recently reported to be mutated mostly in patients at relapse^{24,30,31}, suggesting that these mutations did not occur *in vitro* in continuously replicating cells but *in vivo*. While mutations in helicases were not frequently found in patients at diagnosis or at relapse^{20,22,24}, the extent of mutations increases with treatment among epigenetic modifiers³², especially histone methyltransferases (6.9% vs 17%, in DMM and RMM, respectively) and DNA methylation modifiers (1.9% vs 8.3%, respectively). On the other hand, genes involved in apoptotic pathways (extrinsic, intrinsic, execution) displayed few mutations or deletions, showing

that cell death resistance was not associated with major defects in the apoptotic machinery.

These data collectively showed that HMCLs displayed mutations/deletions related to myeloma cells from patients at diagnosis (*KRAS*, *DIS3*, *EGR1*, *PRDM1* and *BIRC3*) and relapse/progression to PCL (*TP53*, *NRAS*, *BRAF*, *FANC* genes).

We further analyzed mutually exclusive and co-occurring mutations/deletions, as well as their associations with IgH translocation (Figures S5). Abnormalities in the Ras/MAPK pathway were mutually exclusive: *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *FGFR3* (and to a lesser extent *BRAF*) displayed mutually exclusive mutations ($p < 0.05$), and *FGFR3* mutations were exclusively found in t(4;14) HMCLs overexpressing *FGFR3* ($p = 0.003$, Figure S5). This result suggested that one hit was sufficient to deregulate the MAPK pathway. *TP53* hits were mutually exclusive to mutations in *ATM* ($p = 0.03$), as previously reported in all B-cell malignancies³³. By contrast, several co-occurring mutations were found in DNA damage/repair/epigenetic modifiers for instance, in *BLM* and *FANCD2*, *RECQL5* and *ATM*, *HDAC7* and *DOT1L* ($p < 0.05$). *CDKN2A* deletion was found in HMCLs with *CDKN2C* mutations/deletions. *RECQL4* and *BLM* mutations were significantly associated with t(11;14), $p = 0.03$ and $p = 0.002$, respectively.

To provide a comprehensive landscape of mutations/deletions, we next performed global analysis of altered pathways based on the whole data of the mutated genes.

HMCLs harbor the signatures of dysregulation in Rho GTPase, the cell cycle and DNA replication

Gene Ontology (GO) enrichment analysis showed that most of the dysregulated biological processes were related to Rho GTPase signal transduction, Cell cycle/DNA replication and DNA damage (check-points before replication, DNA repair, DNA unwinding), Figure S6A. GO molecular functions such as helicase activity, nuclease activity, and Rho GTPase activity were also highly enriched (Figure S6B-C).

Reactome Pathway Enrichment analysis revealed oncogenic MAPK signaling. After relaxing the q-value at 0.1, pathways involved in DNA repair, p53 regulation of activity and DNA double helix-modifying pathways were highlighted, as well as defects in the SUMOylation of DNA replication proteins, DNA damage response and repair proteins,

cell cycle regulation by p53, resolution of D-loop structures through Holliday junction intermediates, and DNA repair (Figure S6D).

Among cancer-associated pathways, the main KEGG-enriched pathways were the Fanconi anemia pathway (q-value=0.006), cell cycle (q=0.01), prostate cancer (q=0.02), chronic myeloid leukemia (q=0.03), non-small cell lung cancer (q=0.02), bladder cancer (q-value=0.02) and hepatocellular carcinoma (q=0.02) (Figure 6E). Non-homologous End joining (q=0.04), platinum resistance (q=0.04), base-excision-repair (q=0.04) and mismatch-repair (q=0.04) were also enriched in KEGG pathways. The prostate cancer, bladder cancer, non-small lung cancer and non-cancer related pathways revealed by KEGG enrichment analysis were mostly due to the high *RAS/BRAF* mutation rates. The hepatocellular carcinoma signature was also enriched by Wnt signaling mutations, while Breast cancer signature displayed Notch, Wnt and PI3K altered signaling.

Figure S7 summarizes hits in the most dysregulated pathways. While pathway dysregulations were globally well balanced among the recurrent translocation subgroups, genes encoding helicases were more frequently encountered in t(11;14) cell lines (p=0.006). On the other hand, intrinsic apoptosis mutants were more frequent in t(4;14), 66% vs 12% (p=0.004).

The extrinsic, intrinsic and executive pathways of apoptosis are mostly unaltered in HMCLs

Thirteen HMCLs displayed one or several mutations in the apoptotic pathway (extrinsic, intrinsic and executive), which were heterozygous (except in LP1 that displayed a bi-allelic *BCL2L11/BIM* deletion), Figure 3. To assess the impact of mutations, we analyzed the cell death response through either the extrinsic *i.e.*, response to Fas/Trail-R agonist receptors (CH11, mapatumumab, or lexatumumab⁹) or the intrinsic pathway of apoptosis *i.e.*, response to BH3-mimetics (ABT-199, A-1210477 or A-1155463)^{10,11,34,35}, Table S3. Pathway hit scores were calculated according to the number of hits in each pathway. No correlation could be drawn between the sensitivity to Trail-R agonists or Fas ligands and extrinsic apoptosis hits. Similarly, ABT-199/-737 responses did not correlate with intrinsic apoptosis hits. Moreover, intrinsic pathway hits were not associated with BH3-profiling *i.e.*,

cytochrome C release in response to BIM peptide (Table S3), confirming that the heterozygous mutations did not affect the apoptotic responses, Figure S8.

HMCLs with RAS mutation are highly sensitive to trametinib

Eighty-two percent of HMCLs displayed at least one variant of the MAPK pathway, with 60% of HMCLs bearing a *K/H/N-RAS* variant (Figure 3 and S9). *FGFR3* mutations were present in 12% of HMCLs but in 50% of t(4;14) HMCLs with *FGFR3* overexpression (KMS11, LP1, OMP2). Five HMCLs expressed a *BRAF* mutation with BCN displaying 6 non-silent mutations in the PKc-like domain (without evidence of a frameshift). *BRAF* mutations mostly occurred in the PKc-like domain (4 of 5 mutants), outside of the V600 codon. Two samples displayed both *NRAS* and *BRAF* mutations (NAN10 and NAN3). As shown in Figure 4A, *RAS*-mutated HMCLs displayed hypersensitivity to the MEK-1/2 inhibitor trametinib (Mann-Whitney test, $p=0.02$), while *FGFR3*- or *BRAF*-mutated HMCLs did not display significant sensitivity. Finally, the MAPK pathway hit score was associated with an increased sensitivity to trametinib ($\beta_1 = -1.28$, 95% CI = [-1.75;-0.7]), which was related to *RAS* mutations, Figure 4B.

Abnormalities in cell cycle genes do not favor the response to CDK inhibition

Approximately half (55%) of HMCLs showed impaired cell cycle regulation, mostly bi-allelic deletion of the *CDKN2C* locus (33% of HMCLs), *RB1* alterations (12%) or *CDKN2A* alterations (9%), Figure S3 & S5-“CellCycle”. Because deletions in *CDKN2A* or *CDKN2C*, by contrast to *RB1* deletion/mutation, were reported to favor cell cycle inhibition by the CDK4/CDK6 inhibitor palbociclib, we assessed whether altered HMCLs were sensitive to the inhibitor³⁶. Palbociclib induced an inhibition of cell cycle that was correlated to pRb inhibition ($\beta = -25$, 95% CI = [-33.8;-2.9]), Figure 5A-C. However, no correlation could be found between palbociclib sensitivity and the *CDKN2C* ($p=0.17$), *CDKN2A* ($p=0.47$) or *RB1* ($p=0.33$) status (Mann-Whitney test, Figure 5D). HMCLs overexpressing *CCND1* with an unaltered *RB1* showed a trend for better sensitivity than that of other HMCLs ($p=0.1$), Figure 5E. Conversely, no correlation was found between palbociclib sensitivity and either the cell cycle pathway score ($\beta = -0.123$, 95% CI = [-0.89;0.53]) or *CDK4/CDK6* expression levels ($\beta = 0.49$, 95% CI = [-1.47;1.97] and $\beta = -0.02$, 95% CI = [-0.46;0.5]), respectively).

Overactivation of NFκB by genomic alterations does not confer oversensitivity to proteasome inhibitors

The NFκB pathway was altered in 45% of HMCLs, mostly by inactivating *TRAF3* (frame-shift, non-sense mutation, insertion or deletion) or *BIRC2/BIRC3* (homozygous deletion) as previously reported in primary myeloma cells^{20,23}. Alterations in the NFκB pathway were associated with the overexpression of *NFκB* signature genes³⁷ (i.e., *CD74*, *TNFAIP3*, *IL2RG*, *BIRC3* and *PLEK*), and we further identified that *NFE2L3* (a downstream target of TNF-α signaling displaying a NFκB site in the promoter) was highly expressed in samples harboring NFκB pathway hits, Figure 6. We found no correlations between NFκB pathway dysregulation and sensitivity to proteasome inhibitors ($\beta=0.2$, 95% CI= [-0.25; 0.65] for bortezomib and $\beta=-0.09$, 95%CI= [-0.5; 0.16] for carfilzomib, Figure S8).

p53 and DNA damage pathways are associated with shifts in response to myeloma alkylating drugs

We previously reported that the sensitivity to alkylating drugs was impaired by p53 deficiency¹². We further assessed whether hits in pathway(s) were associated with the response to drugs reported to be related to p53 deficiency. As shown in Figure 7, p53 pathway alterations were associated with a lesser response to melphalan ($\beta=0.58$, 95% CI= [0.08-0.9]) and bendamustine ($\beta=0.63$, 95% CI= [0.1-1]). Of note, HMCLs harboring a high DNA damage kinase sensor score had high sensitivity to melphalan ($\beta=-0.83$, 95% CI= [-1.38, -0.27]) and bendamustine ($\beta=-0.93$, 95% CI= [-1.52, -0.28]), which was related to *TP53* status.

On the other hand, hits in the p53 pathway were also associated with reduced sensitivity to lexatumumab ($\beta=0.71$, 95% CI= [0.01,1.95]) and with a trend for increased sensitivity to mapatumumab ($\beta=-0.79$, 95% CI= [-1.24, -0.08]). These correlations were related to the direct and indirect p53-mediated regulation of *TNFRSF10B* and *TNFRSF10A* expression, as previously reported⁹.

Correlations between other drugs and pathways are displayed in Figure S8.

Deficiency in the DNA repair pathway does not predict the responses to RITA or CX-5461

We assessed whether efficacy of DNA targeting drugs could be related to specific alterations. We analyzed sensitivity to RITA and CX-5461, which induce DNA crosslinking and stabilize DNA G-quadruplex, respectively, and are known to involve DNA repair during DNA replication^{13,38,39}. Since p53 is involved in DNA repair, we analyzed drug responses according to *TP53*^{status} of HMCLs. Sensitivity to RITA in *TP53*^{wt} HMCLs was enhanced by mutations in helicases ($\beta=-0.59$, 95% CI= [-1.04, -0.01]), Figure 7. HMCL sensitivity to CX-5461 was not associated with any genes or pathway alterations, Figure S8, although XG11, which displayed a homologous *BRCA2* mutation, showed the highest sensitivity to CX-5461.

Discussion

WES was performed in 33 HMCLs, including 19 that had not been reported yet. HMCLs selected in this study were established between 1965 and 2015 in Europe, USA or Japan, and in the presence or absence of added recombinant IL6. While HMCLs' ages spanned from ~55 years to 3 years old, mutation load was similar among those, even if more recent HMCLs display lower mutation load. Our analysis showed that mutated genes were shared between HMCLs and primary myeloma cells, whatever the organ origin of samples that gave rise to the cell lines. Although HMCLs always emerged from patients with extra-medullary disease, no strong comparison could be made with primary or secondary PCL because of the very low number of sequenced PCLs yet. We thus compared mutation frequency with primary cells at diagnosis and at relapse (without any indication of medullary or extramedullary disease). The frequency of mutated "myeloma" genes in HMCLs was identical, lower or higher when compared to primary cells at diagnosis or relapse²⁰⁻²². While mutation rate in *KRAS* was similar between HMCLs and primary myeloma cells, the frequencies of *TP53* (67%), *CDKN2C* (33%), *PRKD2* (21%), *FAM46C* (15%) and *BRAF* (15%) dramatically increased compared to primary myeloma cells, either in DMM or RMM. The high *TP53* abnormality frequency (67%) in HMCLs identified by WES in our study (and confirmed by direct RT-PCR sequencing¹) was not in good agreement with a previous WES study reporting a rate of 21% in HMCLs⁴⁰.

Our results clearly confirmed a major alteration in both proliferation control, with either loss of suppressor (*TP53*, *CDKN2C*, *RB1*) or acquisition of activator (*BRAF*, *RAS*) and in tumor suppression/drug response (*TP53*, *FAM46C*), as in most if not all cancers⁴¹. Because the loss of function of *TP53*, *FAM46C* or *CDKN2C* are not directly targetable, drugs bypassing these proteins or exploiting their loss consequences are required. Indeed, as shown in Figure 5, cells lacking *CDKN2C* expression were sensitive to the CDK4/6 inhibitor palbociclib, especially in the *CCND1* group. This *CCND1* impact was surprising because palbociclib is efficient against all CDK-CCND complexes *i.e.*, CDK4/*CCND1*, CDK4/*CCND3* and CDK6/*CCND2*⁴². Of note, *CCND2* myeloma cells overexpress *CDK6* and *CDK4* while *CCND1* myeloma cells overexpress *CDK4* but not *CDK6*, suggesting that CDK4 is empty of cyclin D in *CCND2* myeloma cells (Figure S10). This free CDK4 pool might explain the low efficiency of palbociclib in *CCND2* HMCLs. Palbociclib has shown no global efficiency in MM patients without indication

of their subgroup origin and their *CCND1* expression⁴³. However, since it is efficient (in combination) in patients with tumors overexpressing *CCND1* such as mantle cell lymphoma or HR⁺ breast cancer, we can hypothesize that it should be efficient in t(11;14) patients (without Rb deficiency)^{44,45}. Concerning *TP53*, we previously described p53 independent drugs, which were efficient whatever *TP53* status, such as PRIMA-1Met that targets glutathione or BH3 mimetics that target anti-apoptotic proteins^{6,11}. We also reported that loss of p53 function favors Measles virus replication and cell death in myeloma cells⁴⁶. *FAM46C* was recently been shown to encode for a non-canonical poly(A) polymerase and its over expression in MM cells induced cell death⁴⁷. *FAM46C* is a type I IFN-stimulated gene and it might modulate virus replication such as the Yellow Fever Virus (YFV) and the Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)⁴⁸. Of note, anti-viral type I IFN pathway appeared highly impaired, suggesting defects in infection defense that might be exploited using oncolytic viruses such as Measles virus^{46,49}.

Concerning mutations with gain of function such as *RAS* mutations, we showed that sensitivity of HMCLs to MEK1/2 inhibitor trametinib was associated to *RAS* mutations but not to *FGFR3* or *BRAF* mutations, which also impaired MAPK pathway. This surprising result suggests that mutations in *RAS*, *BRAF* and *FGFR3* do not similarly deregulate MEK1/2 and MAPK pathway and requires further investigations. The *RAS* impact will be assessed in an ongoing clinical trial (NCT03091257) evaluating dabrafenib and/or trametinib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma patients according to their *BRAF/RAS* mutation.

The high percentage of altered genes in DNA/chromatin repair/regulation, Fanconi pathway and chromatin/DNA modification, might be related to the frequency in relapsing patients³². Because of the lack of specific drugs, we could not directly assess the functionality/vulnerability of these pathways, which require a deep investigation. Of note, mutations in Fanconi genes were recently reported in patients at relapse, suggesting that drug escape might involve this pathway. HCLMs exhibiting such “BRCAness” will be a good model for assessing efficiency of drugs like USP1 and/or PARP inhibitors^{23,31,50}.

On the other hand, no major alteration was found in apoptosis pathway, either extrinsic/intrinsic or executive, showing that resistance to cell death was rather

upstream of the mitochondria. In good agreement with the low number of alterations in apoptosis pathway, HMCLs were highly primed for death as shown by their BH3-profiling and their high response rate to BH3 mimetics^{11,51}, Table S2. Considering the huge difference between cell responses to DNA damaging drugs and BH3 mimetics, loss of response was not on the mitochondrial side, and BH3 mimetics appear thus of major interest to target MM cells whatever their genomic alterations or responses to classical myeloma drugs.

In summary, WES suggests that HMCLs harbor enriched mutations and defects in cell cycle, p53, DNA recombination, NFκB, and epigenetic genes. Importantly, some very early pathogenic events such as IgH translocations and MAPK pathway mutants are stable over time and are not enriched by *in vitro* long-term culture, thus making HMCLs a reliable drug screening model for refractory patients at diagnosis or relapse. What's more, detection at diagnosis of mutations/deletions in genes associated with progression and HMCLs (*i.e.*, *CDKN2C*, *FAM46C*, *TRAF3*, *PRKD2*) might identify particularly aggressive sub-clones warranting adapted treatment strategies and surveillance. WES results suggest that in addition to target apoptosis using BH3 mimetics and the antiviral deficiency using oncolytic viruses, targeting DNA damage, DNA recombination and epigenetic modifiers should be further investigated and might offer significant options for high-risk and refractory patients, including extramedullary diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grant from FFRMG, Action Cancer 44, DHU Oncogreff, Ligue Grand Ouest contre le Cancer, SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558). BT was supported by INSERM (poste d'accueil) and Fondation ARC. AG was supported by the SyMeTRIC project, funded by the Région Pays de la Loire Connect Talent research call. We are grateful to the BiRD bioinformatics facility for providing support and computing resources. We thank Antoine Lamothe for performing MTT assays.

References

- 1 Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D *et al.* A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011; **96**: 574-582.
- 2 Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; **14**: 100-113.
- 3 Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC *et al.* Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; **127**: 2955-2962.
- 4 Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, Rosinol L, Attal M, Pezzi A *et al.* Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014; **32**: 2173-2180.
- 5 Sonneveld P, De Wit E, Moreau P. How have evolutions in strategies for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma translated into improved outcomes for patients? *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; **112**: 153-170.
- 6 Tessoulin B, Descamps G, Moreau P, Maïga S, Lodé L, Godon C *et al.* PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* 2014; **124**: 1626-1636.
- 7 Maïga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D *et al.* A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2015; **87**: 285-288.
- 8 Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 2020-2028.
- 9 Surget S, Chiron D, Gomez-Bougie P, Descamps G, Ménoret E, Bataille R *et al.* Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer Res* 2012; **72**: 4562-4573.
- 10 Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, Dousset C, Descamps G, Maïga S *et al.* ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* 2011; **118**: 3901-3910.
- 11 Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Levenson JD, Souers AJ *et al.* The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* 2014; **28**: 210-212.
- 12 Surget S, Lemieux-Blanchard E, Maïga S, Descamps G, Le Gouill S, Moreau P *et al.* Bendamustine and melphalan kill myeloma cells similarly through reactive oxygen species production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**: 2165-2173.
- 13 Surget S, Descamps G, Brosseau C, Normant V, Maïga S, Gomez-Bougie P *et al.* RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway. *BMC Cancer* 2014; **14**: 437.
- 14 Kervoëlen C, Ménoret E, Gomez-Bougie P, Bataille R, Godon C, Marionneau-Lambot S *et al.* Dexamethasone-induced cell death is restricted to specific molecular subgroups of multiple myeloma. *Oncotarget* 2015; **6**: 26922-26934.

- 15 Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, Giagounidis A, Porta MGD, Jädersten M *et al.* Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* 2015; **6**: 5901.
- 16 Yu G, He Q-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst* 2016; **12**: 477-479.
- 17 Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS J Integr Biol* 2012; **16**: 284-287.
- 18 Mayakonda A, Koeffler HP. Maftools: Efficient analysis, visualization and summarization of MAF files from large-scale cohort based cancer studies. *bioRxiv* 2016; : 052662.
- 19 Zheng X, Levine D, Shen J, Gogarten SM, Laurie C, Weir BS. A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 2012; **28**: 3326-3328.
- 20 Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM *et al.* Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; **33**: 3911-3920.
- 21 Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011; **471**: 467-472.
- 22 Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D *et al.* Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Cell* 2014; **25**: 91-101.
- 23 Chavan SS, He J, Tytarenko R, Deshpande S, Patel P, Bailey M *et al.* Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying RB1 as an independent prognostic marker. *Blood Cancer J* 2017; **7**: e535.
- 24 Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW *et al.* Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* 2016; **128**: 1735-1744.
- 25 Barbieri M, Manzoni M, Fabris S, Ciceri G, Todoerti K, Simeon V *et al.* Compendium of FAM46C gene mutations in plasma cell dyscrasias. *Br J Haematol* 2016; **174**: 642-645.
- 26 Cifola I, Lionetti M, Pinatel E, Todoerti K, Mangano E, Pietrelli A *et al.* Whole-exome sequencing of primary plasma cell leukemia discloses heterogeneous mutational patterns. *Oncotarget* 2015; **6**: 17543-17558.
- 27 Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, Agnelli L, Marzorati S, Fabris S *et al.* Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation. *Oncotarget* 2015; **6**: 24205-24217.
- 28 Lionetti M, Barbieri M, Manzoni M, Fabris S, Bandini C, Todoerti K *et al.* Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* 2016; **7**: 21353-21361.
- 29 Jurczynszyn A, Castillo JJ, Avivi I, Czepiel J, Davila J, Vij R *et al.* Secondary plasma cell leukemia: a multicenter retrospective study of 101 patients. *Leuk Lymphoma* 2018; **0**: 1-6.
- 30 Lagana A, Melnekoff D, Beno I, Leshchenko V, Perumal D, Keats JJ *et al.* Clonal Evolution in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients: A Follow-up Study from the Mmrf Compass Genomics Project. *Blood* 2017; **130**: 325-325.

- 31 Lehners N, Toprak UH, Xu J, Paramasivam N, Hübschmann D, Fröhlich M *et al.* Comprehensive Genomic Characterization of Refractory Multiple Myeloma Reveals a Complex Mutational and Structural Landscape Associated with Drug Resistance. *Blood* 2017; **130**: 266-266.
- 32 Pawlyn C, Kaiser MF, Heuck C, Melchor L, Wardell CP, Murison A *et al.* The spectrum and clinical impact of epigenetic modifier mutations in myeloma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; **22**: 5783-5794.
- 33 Tessoulin B, Eveillard M, Lok A, Chiron D, Moreau P, Amiot M *et al.* p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev* doi:10.1016/j.blre.2017.03.001.
- 34 Tao Z-F, Hasvold L, Wang L, Wang X, Petros AM, Park CH *et al.* Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. *ACS Med Chem Lett* 2014; **5**: 1088-1093.
- 35 Leveson JD, Zhang H, Chen J, Tahir SK, Phillips DC, Xue J *et al.* Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1590.
- 36 Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ *et al.* PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res BCR* 2009; **11**: R77.
- 37 Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F *et al.* Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 2007; **12**: 115-130.
- 38 Nieves-Neira W, Rivera MI, Kohlhagen G, Hursey ML, Pourquier P, Sausville EA *et al.* DNA protein cross-links produced by NSC 652287, a novel thiophene derivative active against human renal cancer cells. *Mol Pharmacol* 1999; **56**: 478-484.
- 39 Lee HC, Wang H, Baladandayuthapani V, Lin H, He J, Jones RJ *et al.* RNA Polymerase I Inhibition with CX-5461 as a Novel Therapeutic Strategy to Target MYC in Multiple Myeloma. *Br J Haematol* 2017; **177**: 80-94.
- 40 Bolli N, Li Y, Sathiaselan V, Raine K, Jones D, Ganly P *et al.* A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2016; **6**: e467.
- 41 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-674.
- 42 Klein ME, Kovatcheva M, Davis LE, Tap WD, Koff A. CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell* 2018. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.023.
- 43 Niesvizky R, Badros AZ, Costa LJ, Ely SA, Singhal SB, Stadtmauer EA *et al.* Phase 1/2 study of cyclin-dependent kinase (CDK)4/6 inhibitor palbociclib (PD-0332991) with bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2015; **56**: 3320-3328.
- 44 Leonard JP, LaCasce AS, Smith MR, Noy A, Chirieac LR, Rodig SJ *et al.* Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 2012; **119**: 4597-4607.

- 45 Kwapisz D. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in hormone receptor-positive early breast cancer: preliminary results and ongoing studies. *Breast Cancer Tokyo Jpn* 2018. doi:10.1007/s12282-018-0864-6.
- 46 Lok A, Descamps G, Tessoulin B, Moreau P, Gouill SL, Tangy F *et al.* The Oncolytic Measles Virus Preferentially Infects p53 Abnormal Myeloma Cells. *Blood* 2016; **128**: 310-310.
- 47 Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, Gewartowska O, Gruchota J, Cysewski D *et al.* The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun* 2017; **8**: 619.
- 48 Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011; **472**: 481-485.
- 49 Dispenzieri A, Tong C, LaPlant B, Lacy MQ, Laumann K, Dingli D *et al.* Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 2791-2798.
- 50 Christofferson A, Nasser S, Aldrich J, Penaherrera D, Legendre C, Benard B *et al.* Integrative Analysis of the Genomic Landscape Underlying Multiple Myeloma at Diagnosis: An Mmrf Commpass Analysis. *Blood* 2017; **130**: 326-326.
- 51 Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G *et al.* The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 2016; **538**: 477-482.

Figure Legends

Figure 1. Oncoprint of the most frequently mutated and/or deleted genes in HMCLs. HMCLs were ranked according to the most frequent abnormalities. Several events affecting the same cell line (mutations and deletion) were represented in the same slot. The number of cumulative events per HMCL is indicated on the top of the graph.

Figure 2. Comparison of the gene mutation/deletion frequency in HMCLs with MM patients at diagnosis and relapse. The frequency of mutation/deletion at diagnosis (x-axis) was plotted against that at relapse (y-axis, blue). HMCL hit frequencies are represented in red dots. The dashed line represents the theoretical identical ratio between diagnosis and relapse.

Figure 3. Oncoprint of altered pathways in HMCLs

Oncoprint of frequently altered pathways was performed as described in the Materials and Methods section. Oncoprint was performed with ComplexHeatmap R-package.

Figure 4. The sensitivity to trametinib is associated with *RAS* mutation.

A: Cells were cultured for 4 days with increasing concentrations of trametinib, and the sensitivity was determined by the area under the curve (AUC) using the MTT assay and expressed as z-score. Analysis was performed as a function of mutations in the MAPK pathway (Mann-Whitney test).

B: Trametinib response associated with dysregulation in the MAPK pathway. Robust linear regression is displayed; regression line was drawn according to coefficients obtained after 5000 bootstrapped replicates. Points were jittered for clarity.

Figure 5. The sensitivity to palbociclib is associated with the lack of *RB1* deletion/mutation in CCND1+ HMCLs.

A. Cells were cultured for 24 hours with palbociclib (500nM), and the cell cycle (A) and Rb phosphorylation (B) were assessed by propidium iodide staining and Western blotting, respectively.

B Cells were cultured for 24 hours with 500 nM palbociclib, and Rb phosphorylation was assessed by western blotting.

C-D-E. Cells were cultured for 4 days with increasing concentrations of palbociclib, and sensitivity was determined by the area under the curve (AUC) using the MTT assay.

C: Correlation between S/G2 phase inhibition and palbociclib sensitivity (AUC z-score), bootstrapped robust linear regression. D,E: Palbociclib sensitivity according to either the *CDKN2A/CDKNC* status or MM molecular classification. *RB1* abnormal HMCLs are indicated.

Figure 6. Mutations/deletions in the NFκB pathway genes are correlated with the overexpression of NFκB target genes.

A. The expression of genes significantly associated with mutation/deletion in NFκB pathway genes was identified using the limma algorithm. Clustering was performed with the most significant genes.

B. Representation of the NFκB pathway hits according to HMCL classification in A.

Figure 7. Significant associations between dysregulated pathways and drug responses.

The number of hits in each pathway was plotted against the drug z-score. Robust linear regression is displayed; regression line was drawn according to coefficients obtained

after 5000 bootstrapped replicates. Only significant associations of tested drugs with the pathways of interest are displayed.

A. Drug responses associated with dysregulation in the p53 pathway.

B. Drug responses associated with dysregulation in the DNA damage pathway.

C. Drug responses associated with dysregulation in the MAPK pathway.

D. RITA sensitivity correlated with the helicase hit scores in *TP53^{wt}* HMCLs. *TP53^{wt}* and *TP53^{Abn}* HMCLs are represented by black and red dots, respectively. The LD₅₀ of RITA was determined as previously described¹³. *: Not statistically significant.

Figures

Figure 1

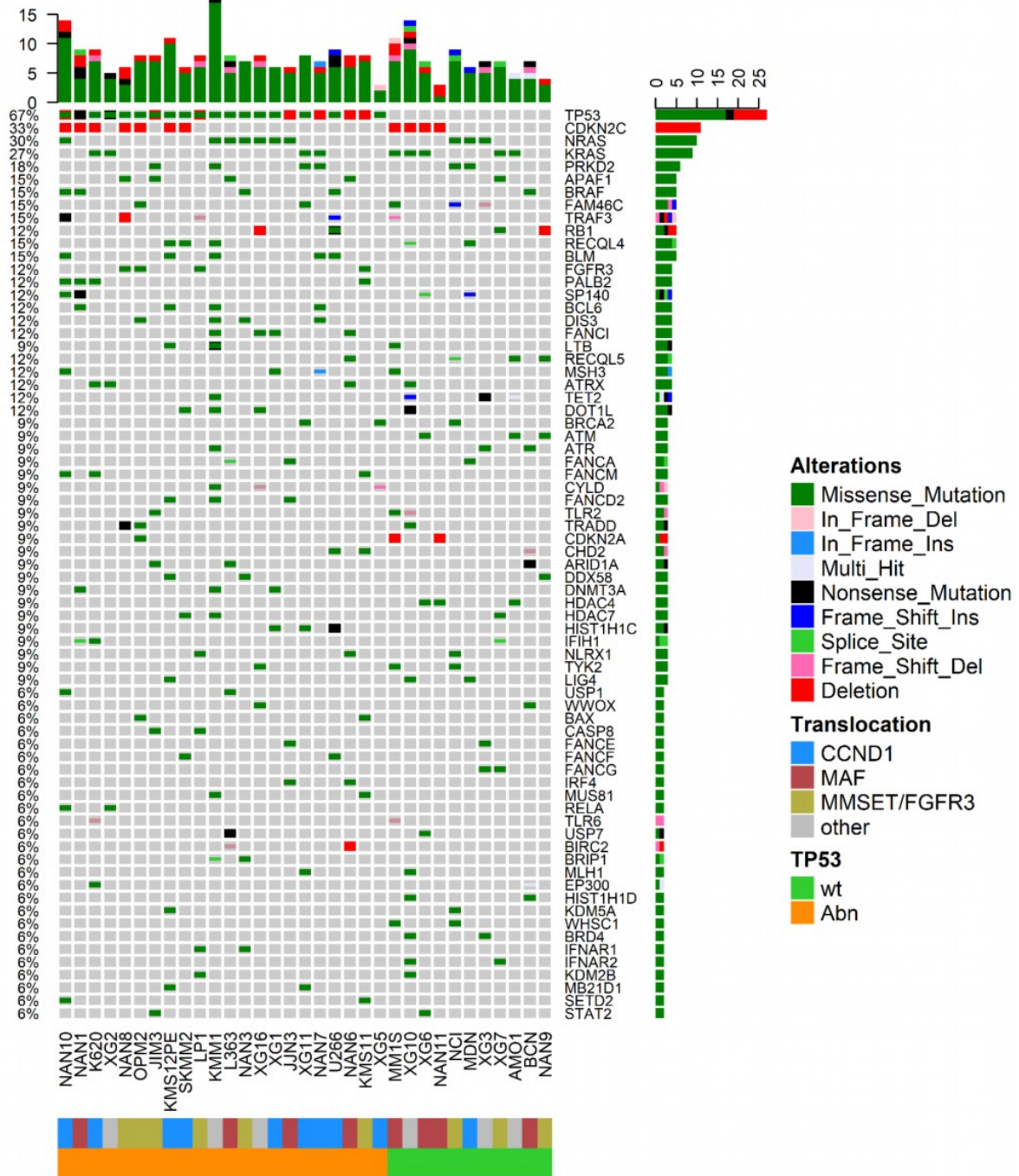


Figure 2



Figure 3

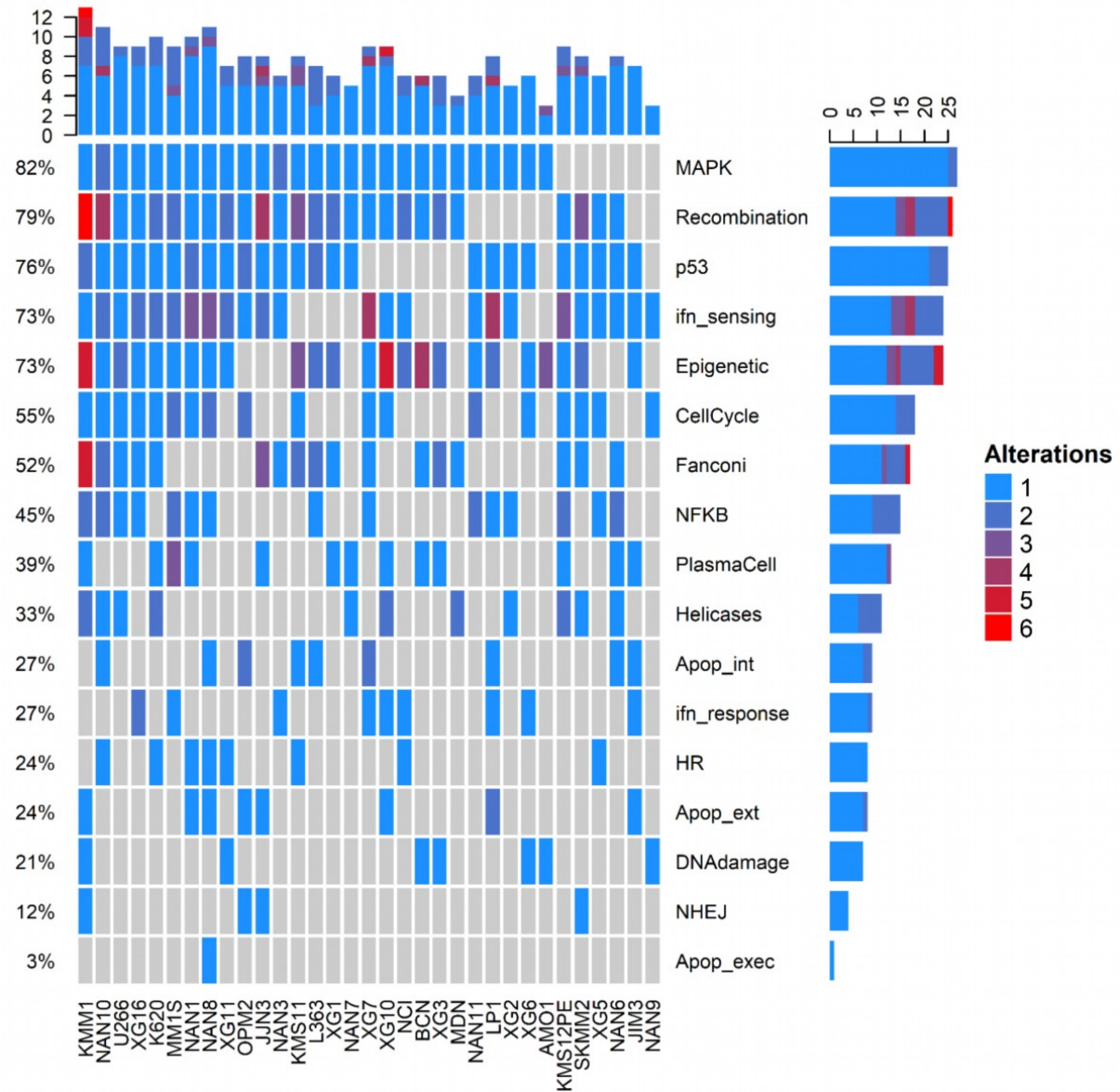


Figure 4

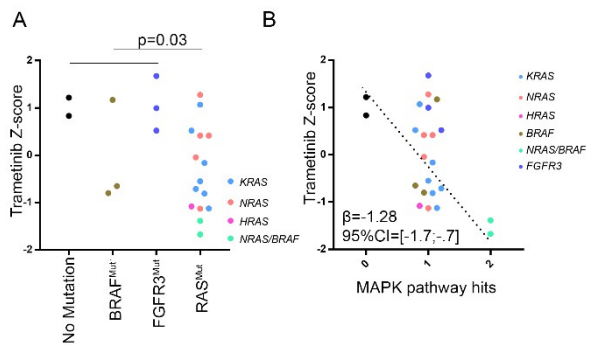


Figure 5

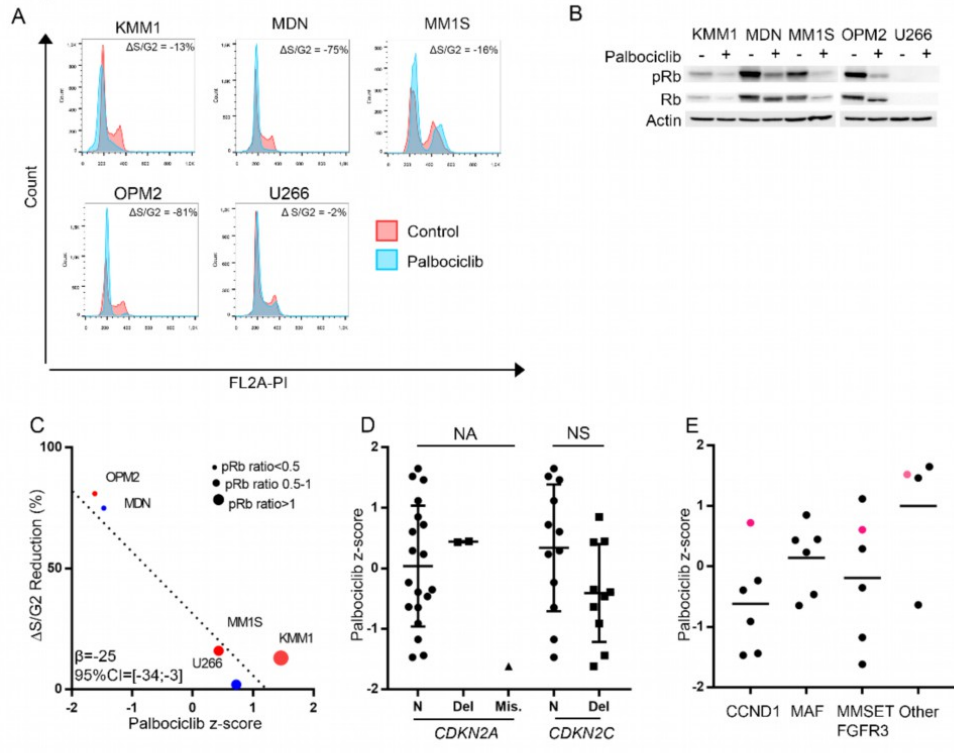


Figure 6

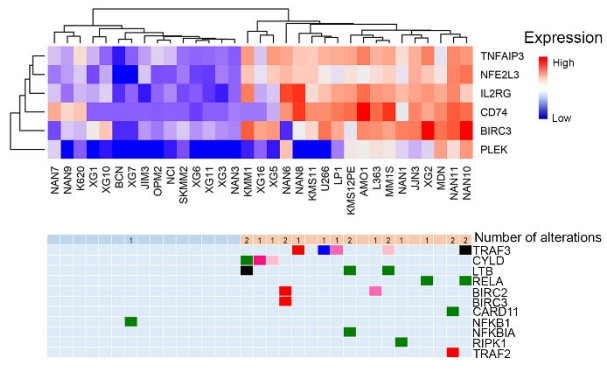
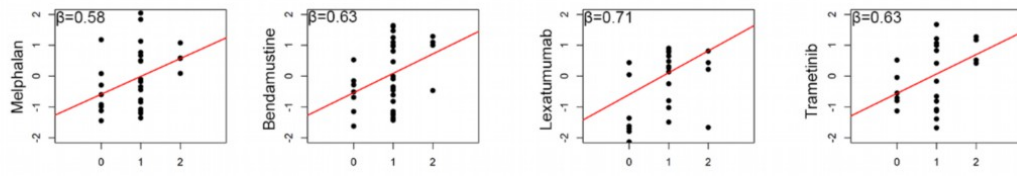
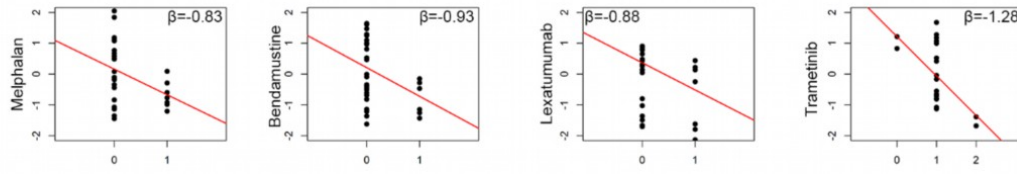


Figure 7

A) TP53

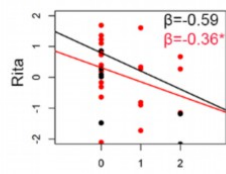


B) DNA damage



C) MAPK

D) Helicases



Supplementary Information

Supplementary Methods

Cell Lines

Whole exome Sequencing

Copy Number estimation from WES

Variants validations

Functional assays

Statistical Analyses

Supplementary Tables

Table S1: HMCLs characteristics

Table S2: Direct Sequencing Primers

Table S3: HMCLs' main characteristics and drug screenings

Supplementary Figures

Figure S1: SNP analysis of 33 HMCLs

Figure S2: Mutants Classification

Figure S3: Genomic Signatures

Figure S4: Lollipop Plots

Figure S5: Co-occurrence plot (Somatic Interaction plot)

Figure S6: GO, Reactome and Kegg pathway enrichments

Figure S7: Chord Diagram of pathway hits relative to recurrent translocation subgroup

Figure S8: Drugs responses according to pathway hits

Figure S9: Major Hits classified in their respective pathways

Figure S10: CDK4/6 expression according to CCND1 expression

Supplementary Methods

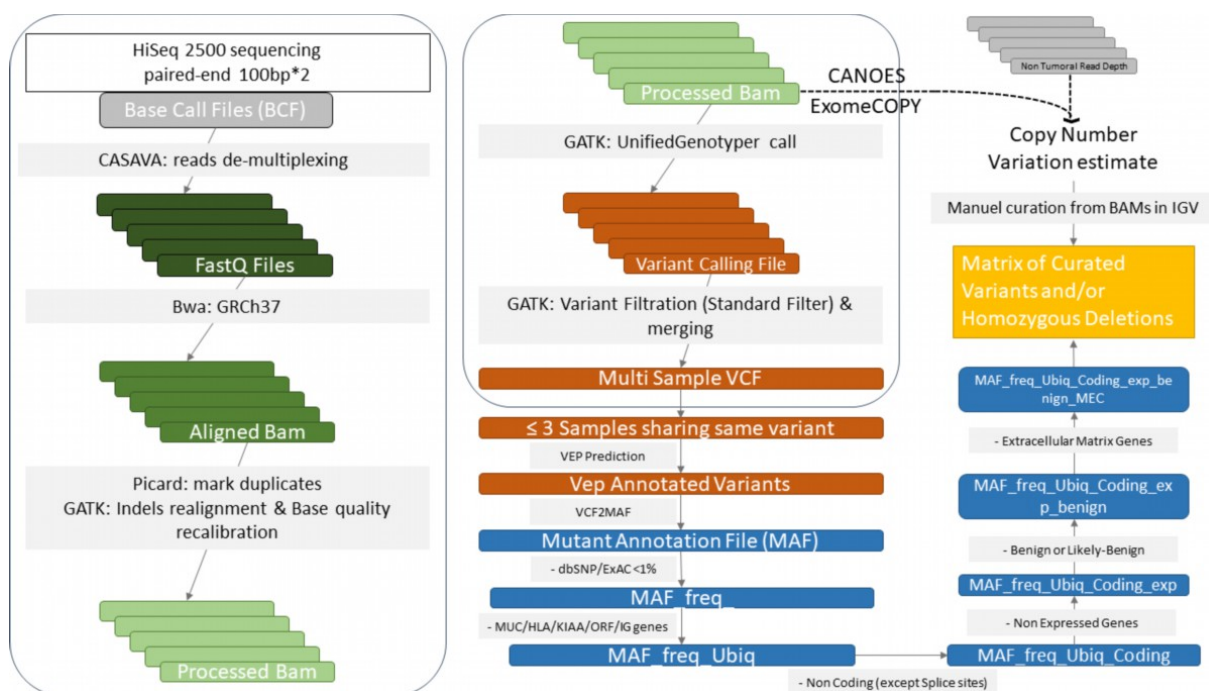
Cell Lines

Gene expression profile of HMCLs has been previously published¹. Expression levels were processed from CEL files by GCRMA² and further normalized (inter-batch) by quantile-normalization^{3,4}.

Whole Exome Sequencing

DNA was extracted from cell lines and sheared, degradation was controlled by migration on agarose gel (1%), purity was assessed by NANODROP (260nm/280nm ratio between 1.7-2 and 260nm/230nm ratio superior to 1.4). Double stranded DNA was dosed by PicoGreen and 3µg of DNA was further processed. After sequencing, for sakes of parallelization, samples were processed individually. Reads were aligned to the GRCh37 human reference genome using BWA (v0.7.10-r789)⁵. Duplicated reads were marked by Picard tool (v1.119), indels were realigned around capture (+/- 500bp) and base quality recalibration was finally performed (Genome Analysis Toolkit, (GATK, v3.2.2).

Copy Number Variation (CNV) calling was performed with two techniques: ExomeCOPY using Hidden Markov Model ⁶ and CANOES ⁷ which used a negative binomial regression. Briefly, read counts were obtained by bedtools on a bed list of ensemble canonical exon regions. Only regions with a mapping quality >20 were retained. GC content was assessed by GATK (GCContentByInterval) on the intervals. CANOES was executed with a probability of CNV event of 1e-6. Exome Copy was executed with the following parameters: goto.cnv=1e-3, expected CNVs (S): n=0-4, init.phi="counts", goto.normal=1/20. Results were validated by visual inspection of BAM read depth in Integrative Genomics Viewer⁸.



Functional assays

Cell count and viability were measured using MMT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, SIGMA) assay. Briefly, cells were incubated in 96-well microplates (triplicate wells) for 48 hours (Bortezomib, Carfilzomib, CX4615), 72 hours (Pomalidomide, Bortezomib, Carfilzomib) or 120 hours (Trametinig, Palbociclib) before MTT reaction. Wells were submitted to lysate and absorbance was measured at 550nm. Results were expressed as the percentage of control wells. All experiments were replicated 4 times. Response to Melphalan, Bendamustine, FAS and TRAIL-R agonist antibodies, PRIMA-1^{Met}, RITA, nutlin3a, dexamethasone, ABT-737 and ABT-199 were previously reported⁹.

Statistical Analyses

For Reactome, KEGG and GO annotations, only genes with at least 2 mutants after filtering were considered. MAF manipulation was performed by maftools packages¹⁰, oncoprints, heatmaps and circular diagrams were generated by ComplexHeatmap package. Area Under the Curve was estimated with Graphpad Prism v7.0 for Palbociclib (0-1μM), CX5461(0-1μM) and Trametinib (0-25nM). Pathway scores were calculated as the sum of all genes in the considered pathway. Regarding low number of samples, regression between scores and drug responses were calculated by robust linear regression using a M estimator (rlm, MASS package). Coefficients were further

bootstrapped by Boot function (car package), with 5000 replicates (seed= 22062016) and considered significant when 95% Confidence Interval (95%CI) didn't overlap with zero, only β_1 coefficients are presented in the text. If matrix was singular for rlm regression, a neglectable amount of noise was added to pathway hits scores (noise from a normal distribution, with mean of zero and variance of $1e-5$). Patients microarray data were obtained from NIH Gene Expression Omnibus under accession number GSE2658¹¹, as raw data were not provided, MAS5 were simply normalized by quantiles and log2 transformed.

Supplementary Tables

HMCL Name	IL-6 dependence ¹	Year ²	Disease ³	Patient sample ⁴	Gender	Isotype	t(14q32 or 22q11 ;)	Target genes	Number of genes mutated/deleted
U266	-	1965	MM	PB	M	EI	t(11;14)	<i>CCND1</i>	427
L363	-	1977	PCL	PE	F	NS	t(20;22)	<i>MAF-B</i>	429
MM1S	-	1980	PCL	PB	F	AI	t(14;16)	<i>c-MAF</i>	520
KMM1	-	1980	MM	SC	M	I	t(6;14)	<i>CCND3</i>	843
AMO1	-	1981	PCT (D)	AF	F	Ak	t(12;14)	unknown	473
NCI-H929	-	1984	MM	PE	F	Ak	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	412
OPM2	-	1985	MM	PB	F	GI	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	496
LP1	-	1986	MM	PB	F	GI	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	369
Karpas620	-	1987	P-PCL(D)	PB	F	Gk	t(11;14)	<i>CCND1</i>	346
KMS11	-	1987	MM	PE	F	Gk	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	508
KMS12PE	-	1987	MM	PE	F	NS	t(11;14)	<i>CCND1</i>	686
JJN3	-	1987	MM	PE	F	Ak	t(14;16)	<i>c-MAF</i>	429
SKMM2	-	1989	PCL	PB	M	Gk	t(11;14)	<i>CCND1</i>	389
JIM3	-	<1990	MM	PE	F	A	t(4;14)	<i>MMSET</i>	428
XG1	++	1990	MM	PB	M	Ak	t(11;14)	<i>CCND1</i>	448
XG2	++	1990	MM	PE	F	GI	t(12;14)	unknown	473
XG3	++	1990	P-PCL (D)	PE	F	I	t(14 ;?)	<i>unknown</i>	374
XG5	++	1990	MM	PB	F	I	t(11;14)	<i>CCND1</i>	431
XG6	++	1990	MM	PB	F	GI	t(16;22)	<i>c-MAF</i>	565
XG7	+	1990	MM	PB	F	Ak	t(4;14)	<i>MMSET</i>	399
XG10	+	>1990	PCT	AF	F	Ak	t(14;?)	<i>unknown</i>	490
XG11	++	>1990	PCL	PB	F	I	t(11;14)	<i>CCND1</i>	355
XG16	+	>1990	PCL	PB	M	k	none	<i>none</i>	374
BCN	+	1996	MM	PB	F	Gk	t(14;16)	<i>c-MAF</i>	503
MDN	+	1997	PCL	PB	M	Gk	t(11;14)	<i>CCND1</i>	385
NAN1	+	2000	MM	PE	M	Ak	t(14;16)	<i>c-MAF</i>	430
NAN3	+	2001	MM	PE	F	Ak	t(4;14)	<i>MMSET</i>	341
NAN6	+	2005	MM	PB	F	Ak	t(14;20)	<i>MAF-B</i>	428
NAN7	+	2007	P-PCL	PB	F	k	t(11;14)	<i>CCND1</i>	308
NAN8	+	2010	P-PCL (D)	PB	F	A	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	483
NAN9	+	2011	PCL	PB	F	A	t(4;14)	<i>MMSET/FGFR3</i>	351
NAN10	+	2012	PCL	PB	M	I	t(11;14)	<i>CCND1</i>	388
NAN11	+	2015	P-PCL	PB	M	GI	t(14;16)	<i>c-MAF</i>	290

Table S1. Characteristics of the 33 HMCLs. 1: IL6 derived HMCLs, -: IL6-independent, *: autocrine stimulation, +/++: IL6-dependency, 2: year of generation of HMCL, 3: Plasma Cell disorder classification: MM: Multiple Myeloma, PCL: Plasma cell Leukemia, PCT : plasmacytoma, D : Diagnosis, P-PCL : Primary Plasma Cell Leukemia, 4: Patient sample origin: PB: Peripheral Blood, PE: Pleural Effusion, AF: Ascite Fluid, SC: Sub-Cutaneous.

Gene	Forward primer	Reverse primer	HMCLs	AMO1	BCN	JIM3	JJN3	K620	KMM1	KMS11	KMS12PE	LP1	MDN	MM1S	NAN1	NAN10	NAN11	NAN3	NAN6	NAN8	NCI-H929	OPM2	U266	XG1	XG10	XG11	XG16	XG3	XG5	XG6	XG7		
HRAS	aggagaccctgtagggaggac	CAGGATGTCCAACAGGCACG	NAN11																														
BRAF	ACACTTGGTAGACGGGACTC	GAGCGGAGAATTTGGGGAAAG	NAN10	U266	NAN1	BCN	h								H	h						h											
FGFR3	CTGTTCGAGCCACCAATTTCA	GGATGAACAGGAAAGGCC	KMS11								H																						
FANCA	TCAGATACTCACTCACAGCCC	ACCAACTCCTCTGCACTCAG	MDN										h																				
FANCD2	GAAGGGGAAGGTGCTCACTC	GGAGGATGCTTGTCTGCCAT	KMM1	KMS12					h	h																							
FANCE	ACTGGGGTTCGCTTGTCTCG	ATCCCTTCGCAGCAATTCCC	XG3																														
FANCG	CTTGGAGCTGACTGTACCT	CTCAATGAGAACTGCGGGG	XG3	XG7																													
FANCI	CCTGTCATCTCTCAGTGCA	CCAGCTGAGAGTTCCTTCCA	XG1	XG16	NAN6														h				h			h							
FANCL	TCATCTCGGCTCAGGAAGA	GAAGTGGGAGGAGGAGTA	BCN						h																								
FANCM-PCR1	AAAGACCTTTATTGCCGCCG	CCTGTCAATTCGGCCATGTG	K620					h																									
FANCM-PCR2	TGCGTAGTCCAATGATGAACA	CCTCCTCACTTGAATCATCTGGT	KMS12PE								H																						
ATM-PCR1	GGCTATTCACTGTGCGAGAC	ATGTCGCTGTTGGGGTAGAA	AMO1		H																												
ATM-PCR2	TGATGCACTTCCATTGACAAGAC	AGGACCCACTTCTCCAAGC	XG6																														h
ATR-PCR1	ACTCTCAGCCAACCTCCGTG	TCATGACCACTGGCCATTCC	KMS11							h																							
ATR-PCR2	TTCCCTTGAATACAGTGGCCT	GACAGTCTTGAAGTACGGC	BCN				h																										
ATR-PCR3	CAGCATCTGTCTCTGGAGCA	TCTTGTTCGACGTCAGCA	KMM1						h																								
BRCA1	TGCAGTGTGGGAGATCAAGAATT	ACACAGGGGATCAGCATTCA	NAN8																		h												
BRCA2	CTGGCAGCTATGGAATGTGC	GAAAGGGATGACACAGCTGC	NCI-H929																			H											
TRAF3-PCR1	CTGCTGAAGGAGTGGAGCAA	CGCTGCTCTTCATGCTGTCT	LP1								H																						
TRAF3-PCR2	AGATGTGTGCCAGGGTCTAC	ACTTATCAGGGATCGGGCAG	NAN10	MM1S	U266									H	h							H											
BAX	CGCGGACCCGGCGAGAG	CACAGTCCAAGGCAGCTGGG	KMS11	OPM2						h											h												
BAK1	CCGACGCTATGACTCAGAGT	ATGCTGGTAGACGTGTAGGG	XG7																														h
APAF1-PCR1	GAGAAGCTCTGAAAAGGACA	ATGGAGAAGGGCAGCAAGAT	NAN8																	h													
APAF1-PCR2	CAGTCCAGTTTCAGCACAA	CCATCAATGACCAAGAAAGC	JIM3	L363	NAN6	XG7																											

Table S2: Direct Sequencing Primers. h: heterozygous; H: Homozygous

	Melphalan (LD50)	Bendamustine (LD50)	Nutlin-3a(LD50)	PRIMA-1 ^{Me} (LD50)	Lexatumumab (CD)	Mapatumumab (CD)	CH11 (CD)	Dexamethasone (LD50)	Bortezomib (LD50)	Carfilzomib (LD50)	Pomalidomide (I)	CX-5461 (I)	Palbociclib (I)	Trametinib (I)	ABT-737 (LD50)	ABT-199 (LD50)	A-1210477 (CD)	BIM-peptide (MP)
AMO1	-0,29	-0,28	-1,34	0,35	-1,62	0,92	1,22	0,67	3,04	2,99	1,47	NA	1,65	0,52	0,67	0,41	-0,47	0,38
BCN	-0,98	-1,15	-1,34	0,46	0,44	1,36	0,60	-2,50	-1,35	-0,39	-0,38	NA	0,23	-0,80	0,47	0,53	1,35	0,26
JIM3	2,05	0,97	0,70	4,42	0,87	1,23	-0,03	-0,69	1,28	0,03	1,47	0,17	1,12	1,22	1,44	-0,02	1,32	0,51
JJN3	0,77	1,00	0,70	-0,74	0,87	1,36	-1,43	0,21	-0,15	-0,53	-0,68	NA	NA	NA	-0,07	0,14	0,97	0,14
K620	0,49	-0,09	0,70	-0,60	0,82	-1,22	0,53	0,33	1,36	0,60	NA	0,51	-1,44	-0,16	-1,41	-2,12	1,58	0,49
KMM1	0,09	-0,47	0,70	1,05	0,22	-0,81	-0,68	0,67	-0,10	-0,01	1,47	-0,07	1,46	1,28	0,82	0,62	-1,20	0,17
KMS11	-0,18	1,47	0,70	-0,24	0,48	-1,06	-1,68	0,04	-0,45	2,99	-0,22	NA	NA	NA	-0,07	0,25	0,74	0,17
KMS12PE	2,05	1,25	0,70	1,10	0,31	-1,03	-0,90	0,67	1,69	-0,53	-0,41	-0,04	-0,91	0,83	-1,41	-1,68	0,74	0,35
L363	0,59	1,10	0,70	0,13	0,44	0,41	0,91	-0,97	0,44	-0,53	-0,75	-1,09	-0,65	0,42	0,42	0,41	-0,28	-0,13
LP1	1,13	-0,39	0,70	-0,24	0,87	0,10	0,25	0,61	0,29	0,69	-0,22	NA	-1,18	1,68	0,55	0,69	1,03	-0,58
MDN	-1,44	-1,62	-1,43	0,79	-1,70	-1,09	-1,33	0,67	-0,94	-1,11	-0,87	NA	-1,47	-1,13	-0,95	-2,32	0,04	0,64
MM1S	-1,07	-0,01	-1,34	-1,04	-0,80	0,92	1,09	-1,31	-0,15	-0,34	1,47	-0,91	0,43	-0,81	1,44	0,53	0,55	0,59
NAN1	0,58	1,29	0,70	0,07	0,82	-1,60	0,35	0,27	0,64	-0,34	-0,87	-0,36	0,85	1,17	-0,07	-0,11	-0,63	0,52
NAN10	-0,84	-1,14	0,70	-0,71	0,91	0,22	0,13	0,61	0,06	-0,53	1,47	2,71	-0,39	-1,67	-0,79	-0,50	0,11	0,59
NAN11	-0,34	-0,82	-1,45	-1,08	-1,49	-0,31	-1,61	0,50	0,23	-0,62	-0,87	0,53	0,45	-1,08	-0,26	0,53	-0,28	NA
NAN3	-0,10	-0,34	0,70	-0,65	0,87	0,00	-0,21	-0,58	-0,79	-0,53	-0,44	0,38	NA	-1,39	0,52	0,62	-0,57	0,38
NAN6	-1,13	-1,21	0,70	-0,04	0,78	-0,31	-0,12	-0,18	-1,09	-1,28	-0,58	NA	NA	NA	-0,53	0,39	-1,27	0,45
NAN7	-0,44	0,47	0,70	-0,18	0,65	0,82	-1,21	0,67	-0,73	-0,41	1,47	NA	NA	NA	-1,94	-1,57	-0,60	0,52
NAN8	0,51	-0,45	0,70	1,07	0,91	0,92	1,22	-2,61	-0,61	0,48	-0,80	0,02	-0,35	1,00	0,47	0,44	0,87	-0,03
NAN9	-0,92	-0,28	-1,42	-1,04	-1,79	1,39	1,19	0,67	-1,53	0,48	-0,65	NA	NA	NA	0,29	1,17	-1,30	0,45
NCI	0,08	-0,51	-1,34	-0,57	-1,36	0,85	1,28	0,38	-0,79	-0,53	-0,87	-0,32	0,29	-0,04	0,43	0,62	-1,24	0,51
OPM2	1,08	1,00	0,70	-0,43	-1,66	-1,22	-0,09	-2,83	-1,07	-0,79	-0,87	1,12	-1,62	0,52	0,36	0,62	-1,24	0,54
SKMM2	-0,16	1,61	0,70	0,02	0,27	-1,38	-1,52	0,16	1,74	0,01	-0,43	NA	NA	NA	-2,24	-2,12	1,22	-2,39
U266	1,84	1,64	0,70	0,13	0,87	0,29	1,00	0,33	0,16	1,98	1,47	-0,11	0,72	-0,65	1,44	0,80	1,51	0,12
XG1	-0,84	-1,36	0,70	0,24	0,78	-0,22	1,13	0,67	-0,05	-0,53	-0,87	NA	NA	NA	1,44	0,75	-0,18	-0,32
XG10	-1,12	-0,69	-1,51	-0,18	0,05	-1,50	-1,27	0,67	0,16	-0,46	NA	0,00	-0,64	-0,55	0,47	0,46	-0,85	0,55
XG11	-1,20	-1,43	0,70	-0,29	0,14	-0,78	-0,03	0,67	0,13	0,36	1,47	-2,23	-0,23	-1,13	-0,95	0,34	0,97	-3,47
XG16	-1,35	-0,61	0,70	-0,75	-1,02	-0,69	-0,99	0,55	0,00	0,57	NA	NA	1,52	0,42	-0,95	0,34	-0,76	NA
XG2	0,67	0,81	0,70	-0,26	0,87	-0,56	-1,02	-0,58	-0,10	-0,53	-0,75	NA	NA	NA	0,09	0,41	-0,12	0,31
XG3	-0,60	-0,15	-1,30	-0,90	-2,13	1,36	0,44	0,44	-1,42	-1,11	-0,87	NA	NA	NA	0,29	0,47	-1,36	0,59
XG5	0,67	1,10	0,70	0,15	0,14	-0,75	0,91	0,67	0,64	-0,36	1,47	0,31	NA	NA	-1,57	-2,12	1,48	0,16
XG6	-0,77	-1,26	-1,43	-0,54	-0,25	1,23	0,78	0,50	0,08	-0,18	-0,60	-0,61	-0,46	1,07	0,34	0,41	-0,92	0,24
XG7	1,18	0,53	-1,41	0,52	0,44	1,17	1,09	0,67	-0,63	0,46	-0,29	NA	0,61	-0,71	1,30	0,62	-1,24	-2,70

Table S3: HMCLs' main characteristics and drug screenings. Results are expressed as z-scores of sensitivity (mean-centered). LD50: Lethal Dose 50, I: Inhibition, CD: Cell Death at fixed dosing, MP: Mitochondrial Priming

Supplementary Figures

Figure S1

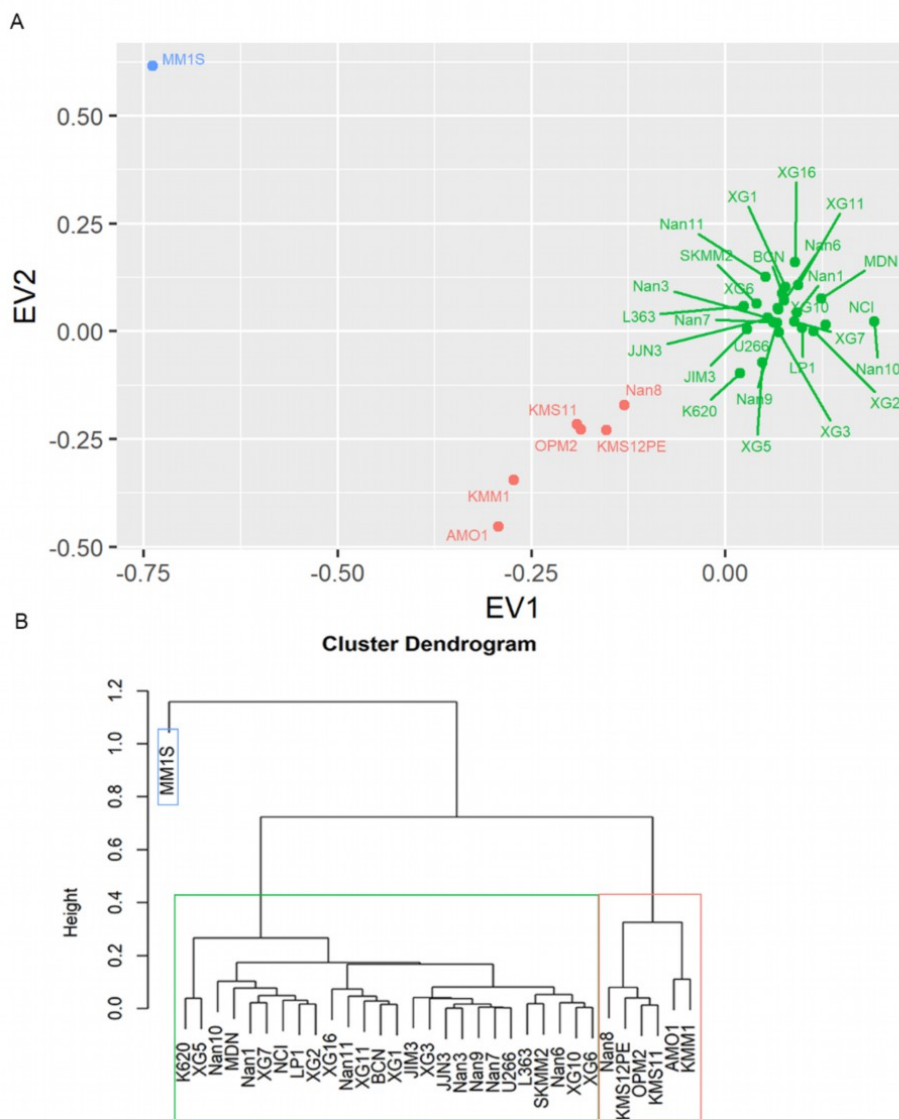


Figure S1: SNP analysis of 33 HMCLs. Samples SNPs (n= 609585) were analyzed by SNPRelated package. A: Principal Component Analysis was conducted on 6513 SNPs (475289 SNPs were kept after filtering of 10258 non-autosomes and 124038 monomorphic SNPs, this set of SNPs was further pruned to a reduced set of SNPs in order to limit strong influence of SNPs clusters). B: Hierarchical clustering of distance between points (PCA coordinates), groups were determined by k-means (k=3).

Figure S2

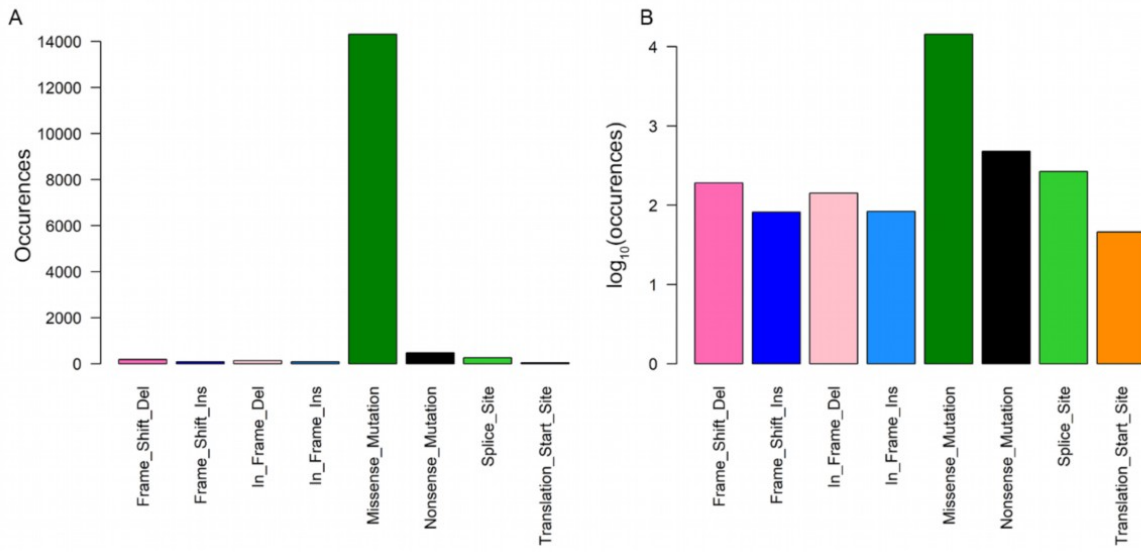


Figure S2: Mutants Classification according to Variant Effect Predictor. A: absolute count of abnormalities. B: Log₁₀ transformation of absolute count of abnormalities.

Figure S3

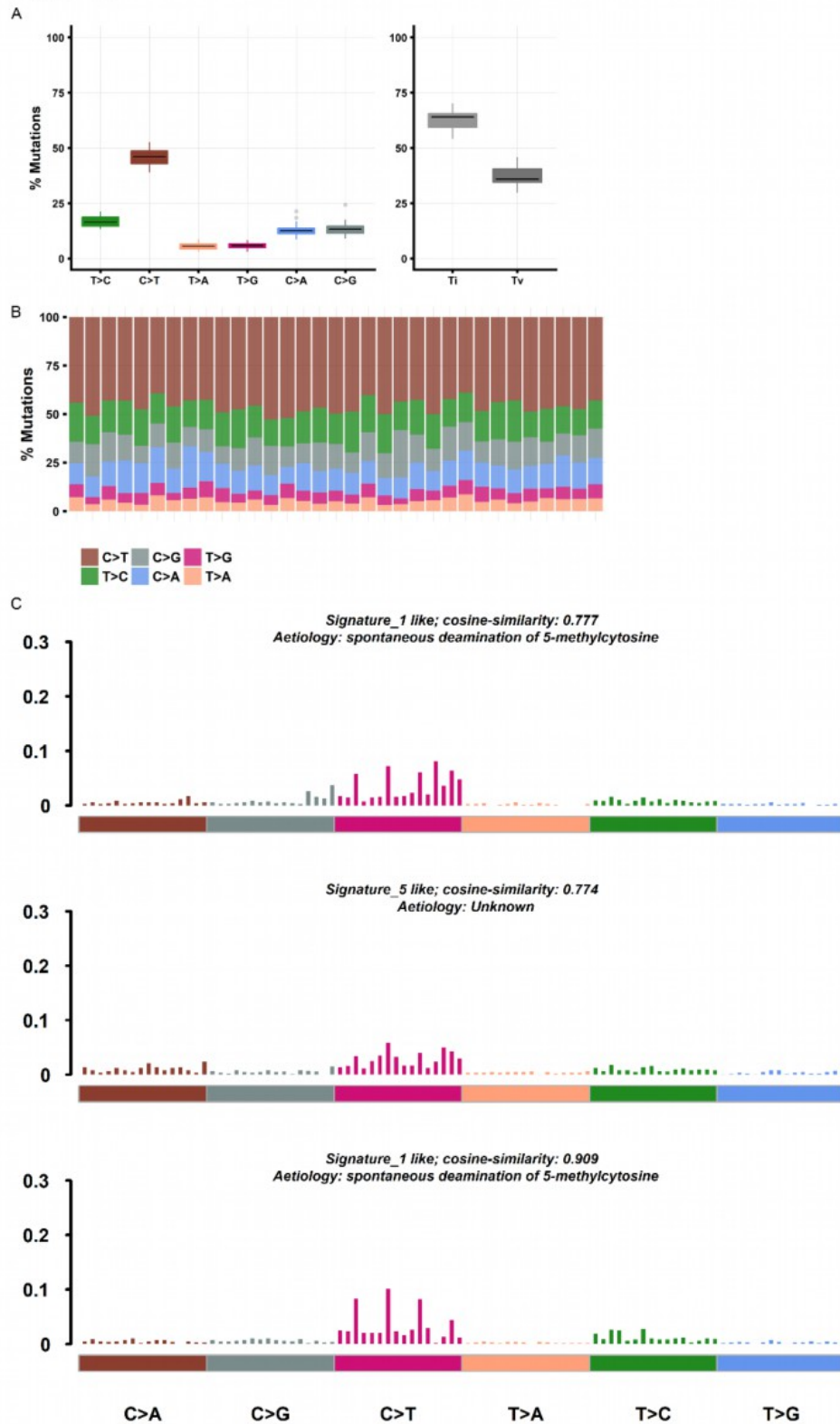


Figure S3: Genomic signatures. A: base change and global ratio of Transitions and Transversions. B: Base-change by HMCL. C: Mutation signature as assessed by non-

negative Matrix Factorization, signature profiles were correlated with known signatures (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>) derived from Alexandrov *et al.*¹².

Figure S4: Lollipop Plots.

Lollipop plots of considered variants are available online.

Lollipop plots were drawn from maftools R package. Height of lollipop indicates occurrence of variants. Only amino-acid variants are represented.

Figure S5

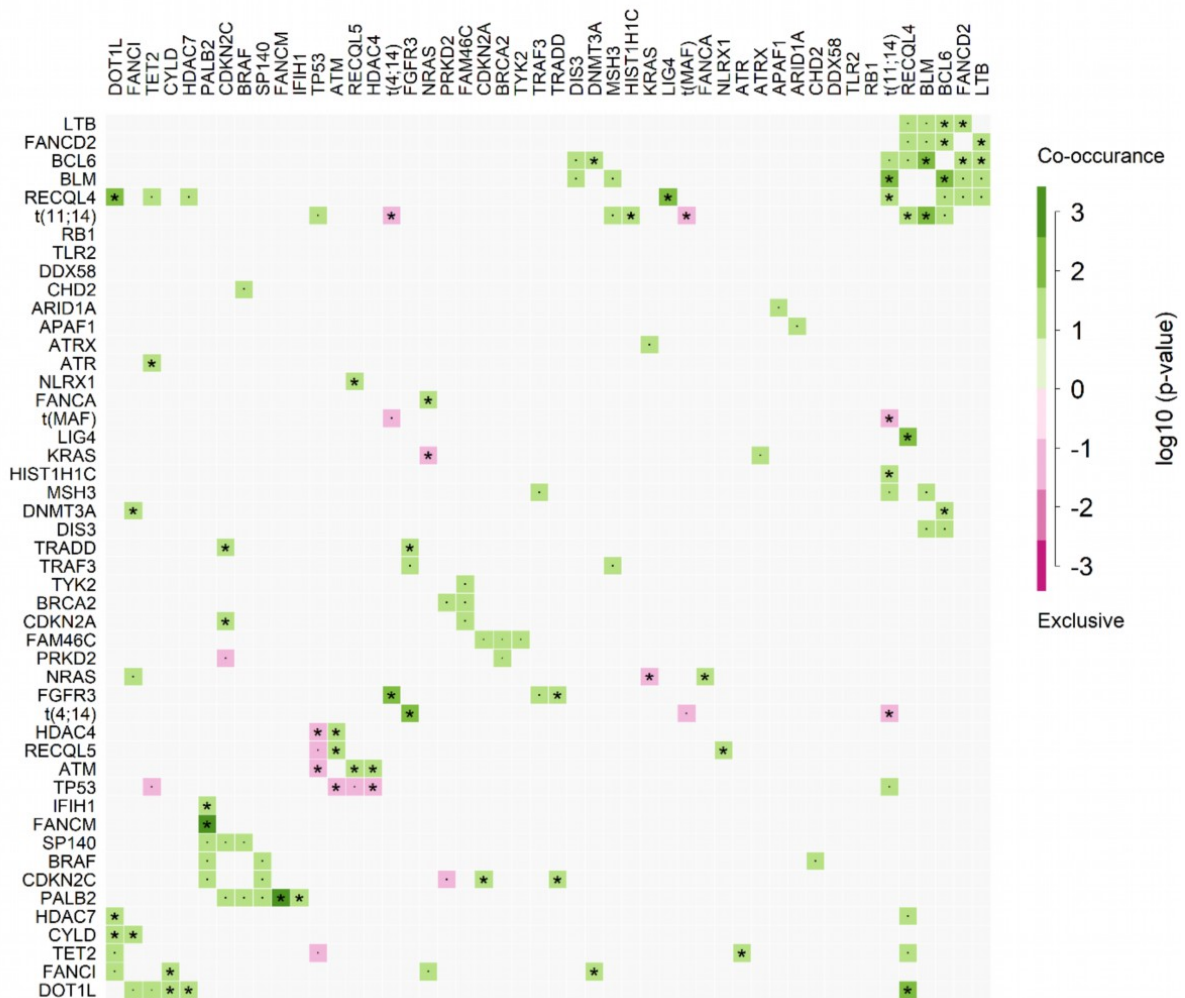
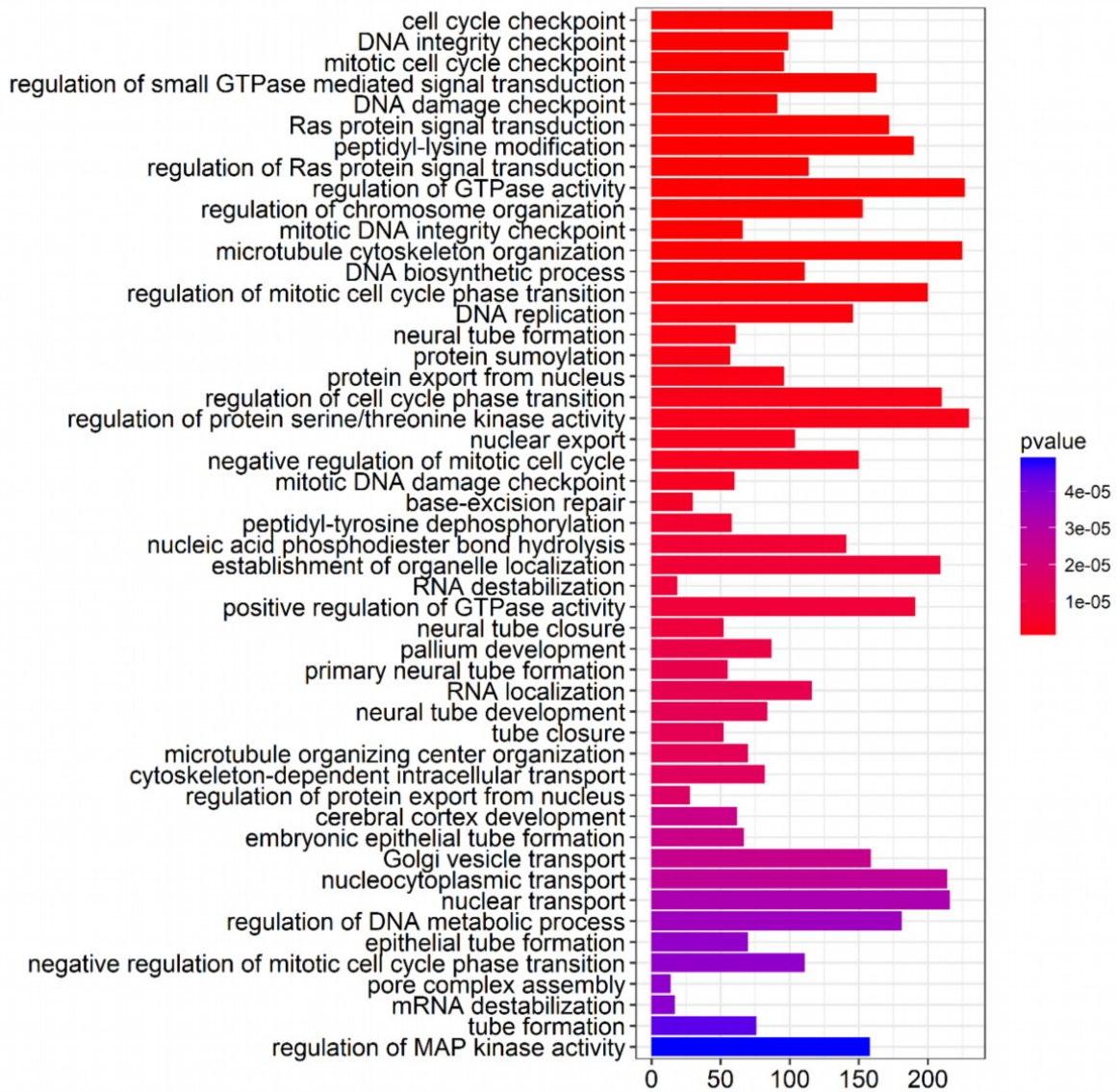


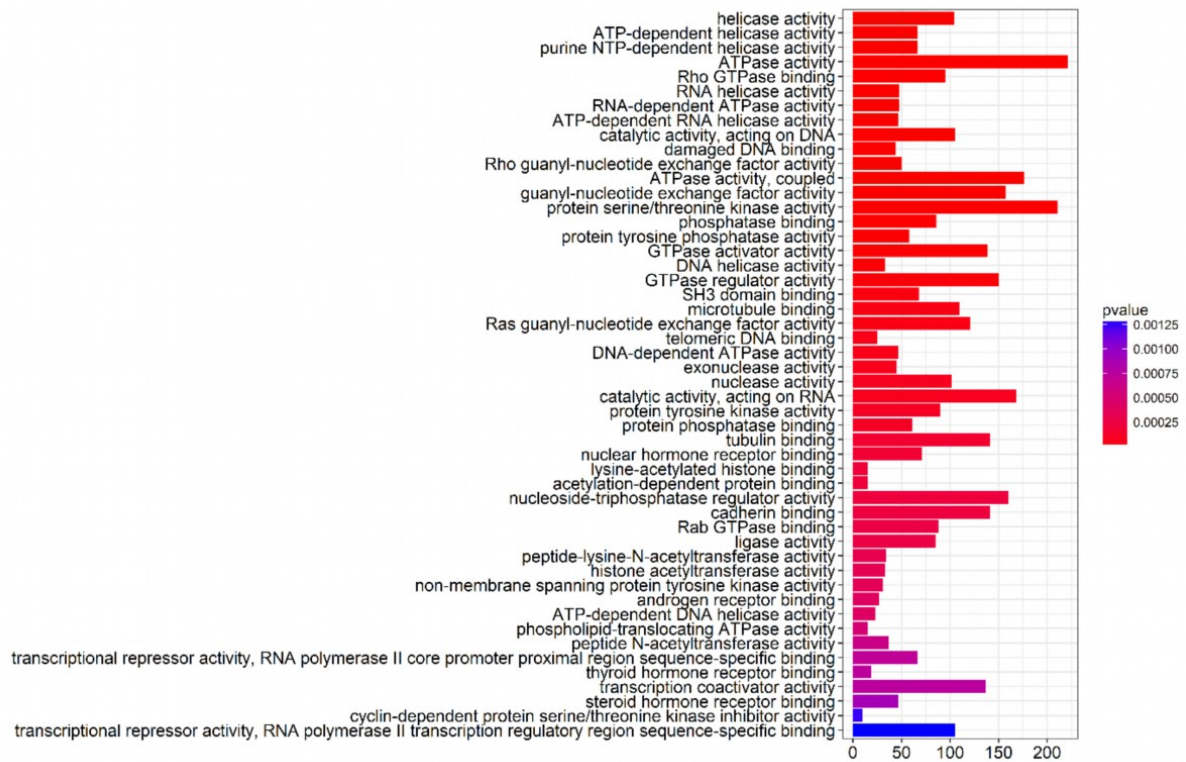
Figure S5: Somatic Interaction Plot. Fisher test was performed on most frequent variants ($n > 2$). Only significant associations or exclusivity are displayed. Genes were sorted according to interactions between genes among HMCLs (adapted from Gerstung *et al.*¹³).

Figure S6: GO, Reactome and Kegg pathway enrichments.

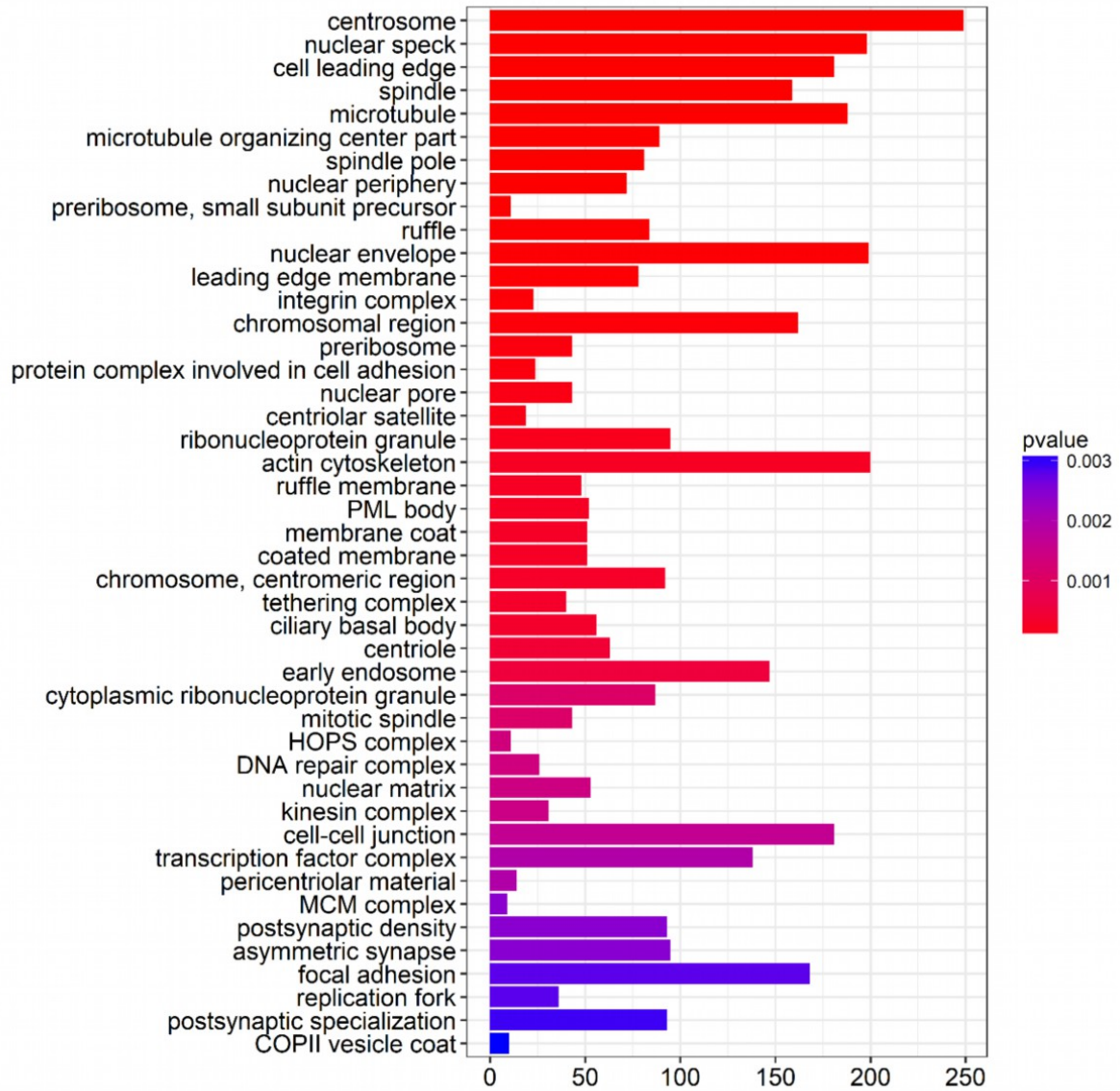
A) GO Biological Processes Enrichment



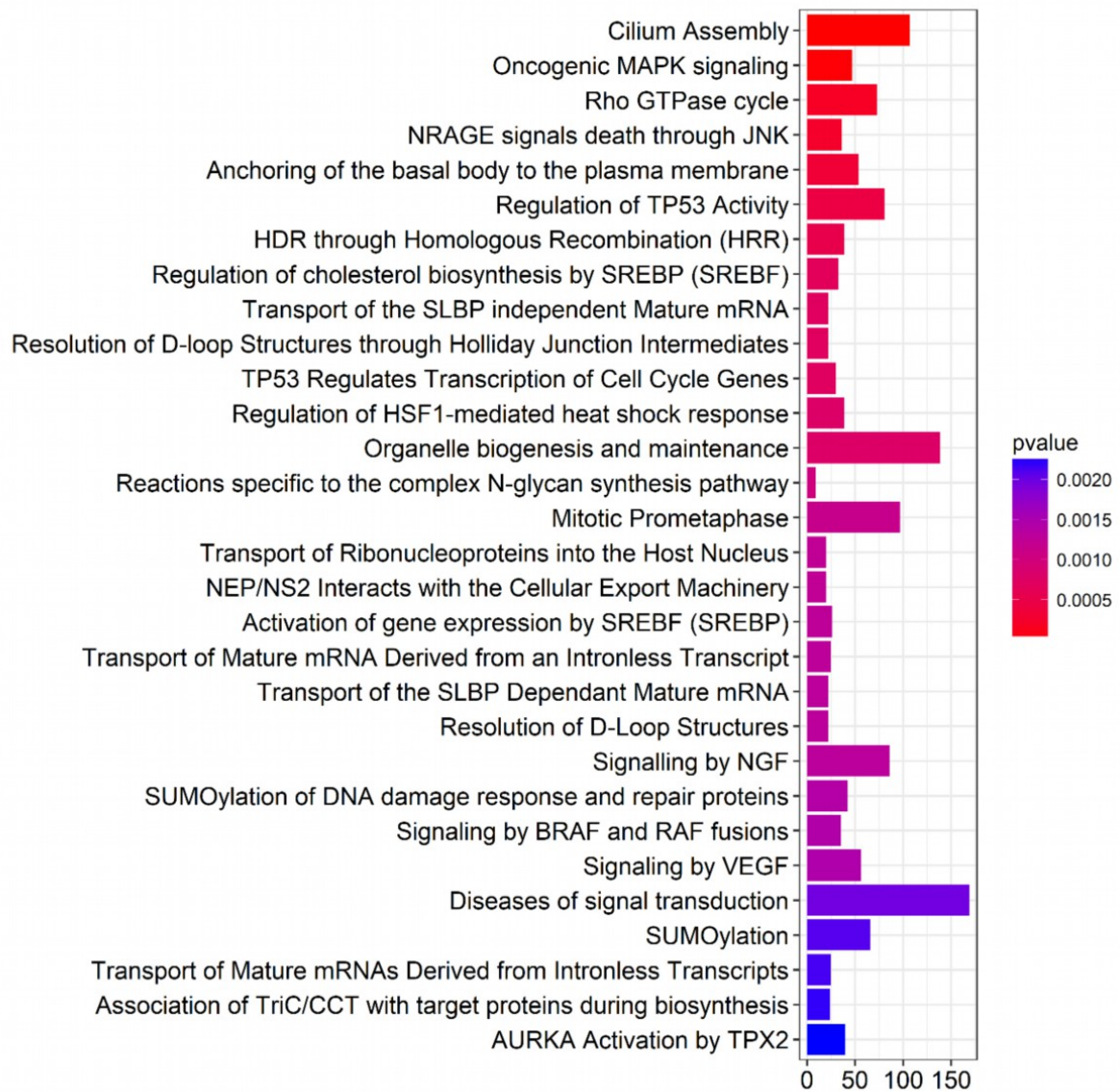
B) GO Molecular Function Processes Enrichment



C) GO Cellular Component Enrichment



D) Reactome Pathway Enrichment



E) Kegg Enrichment

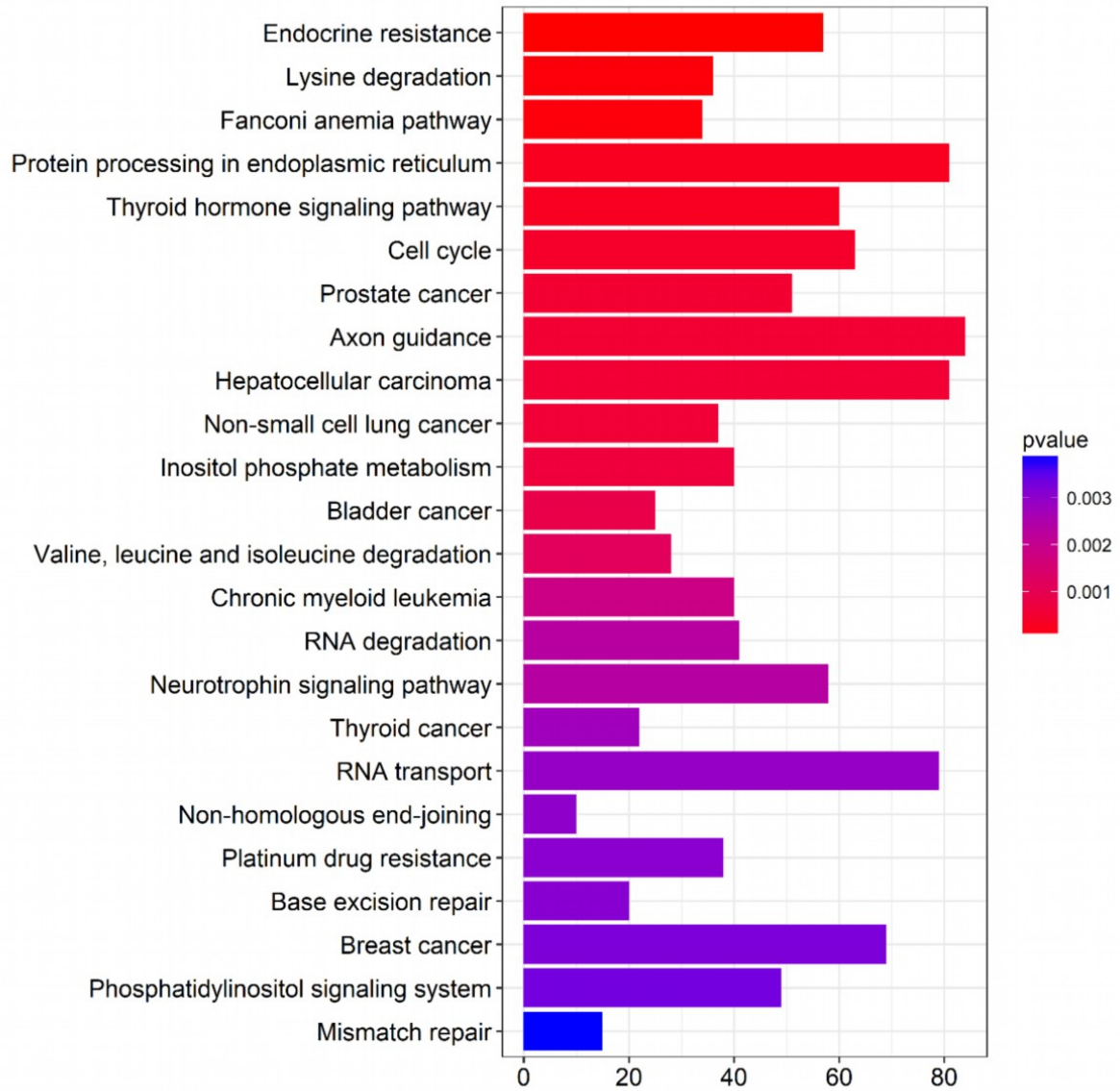


Figure S7

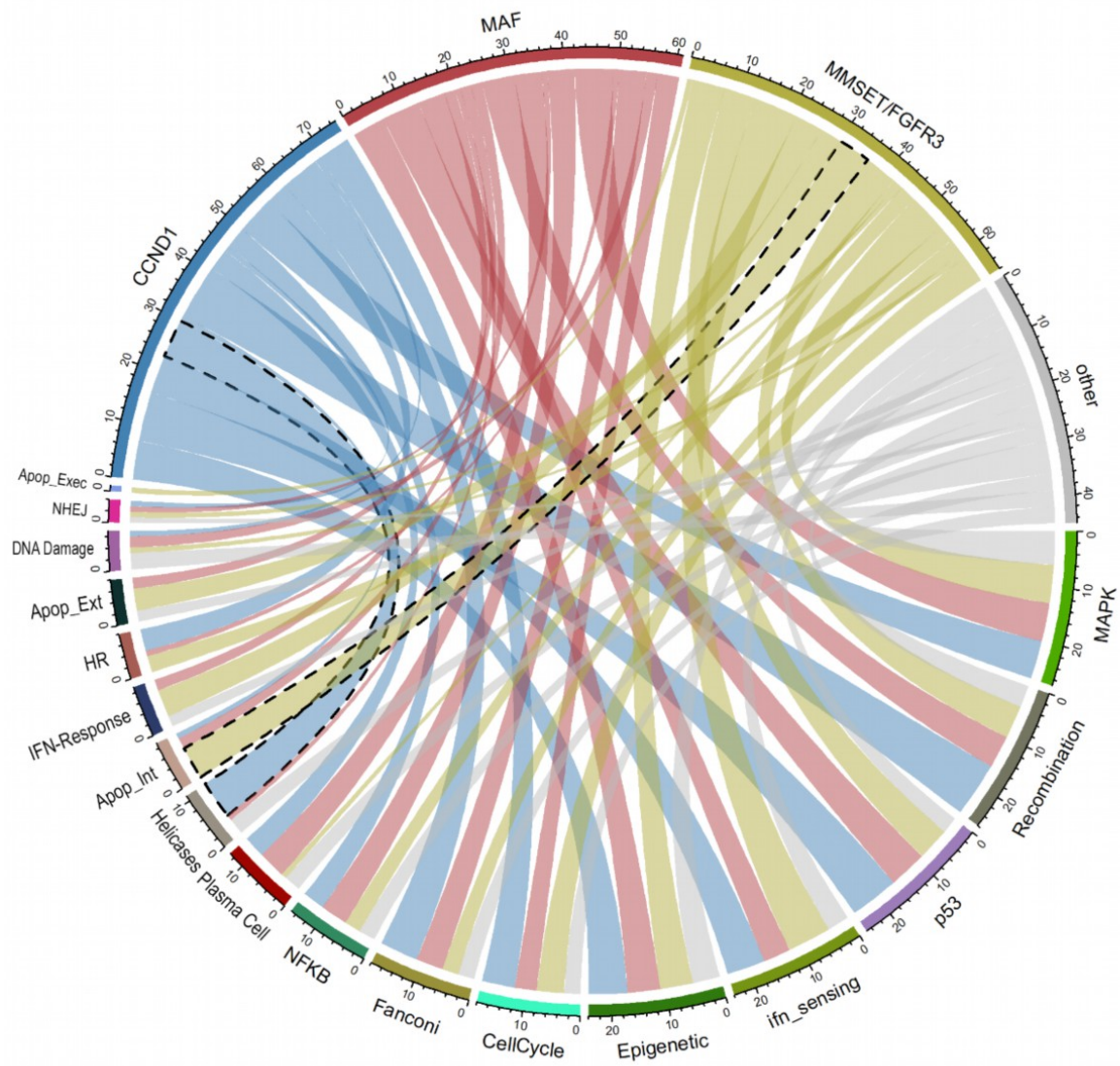
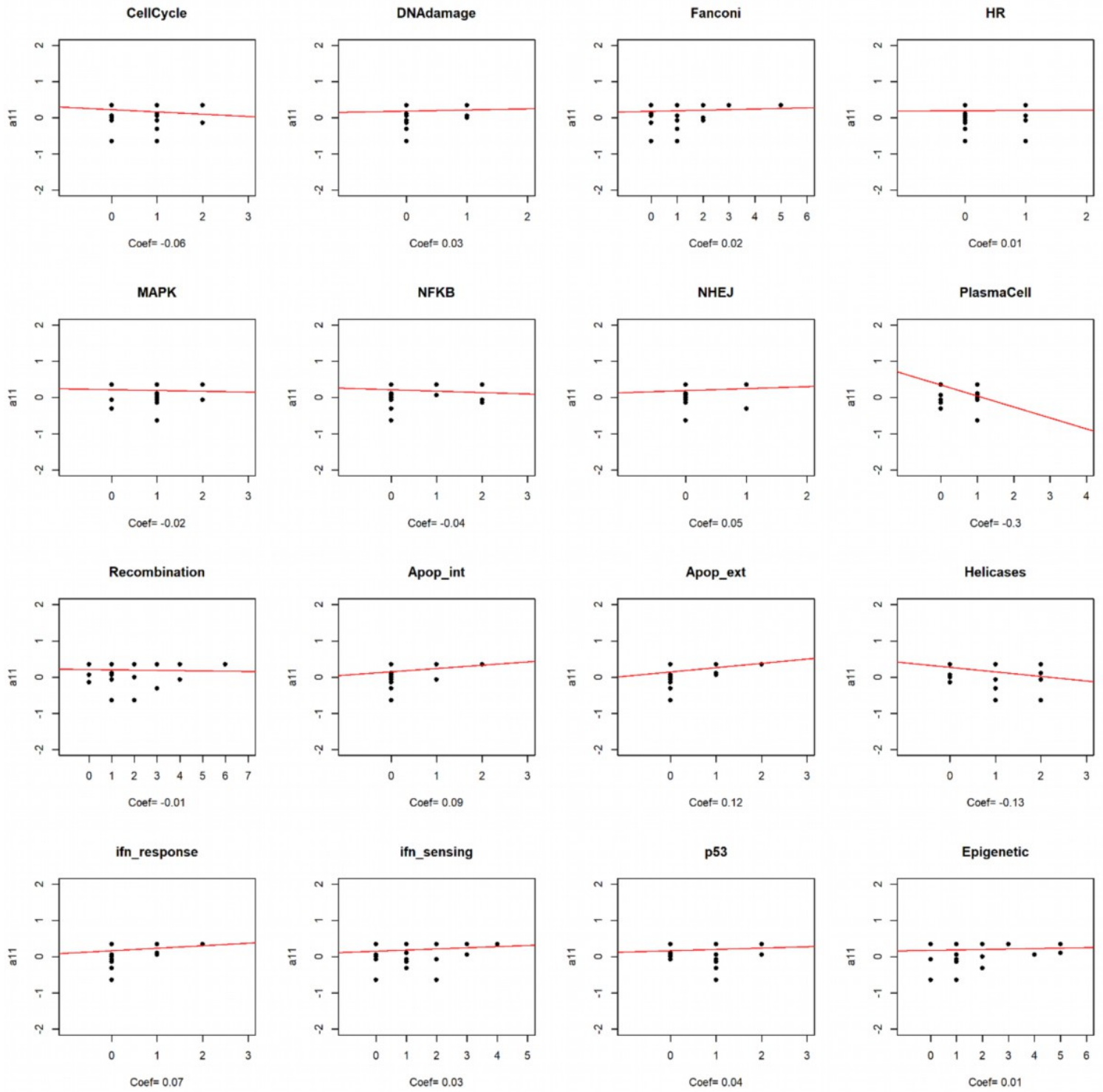
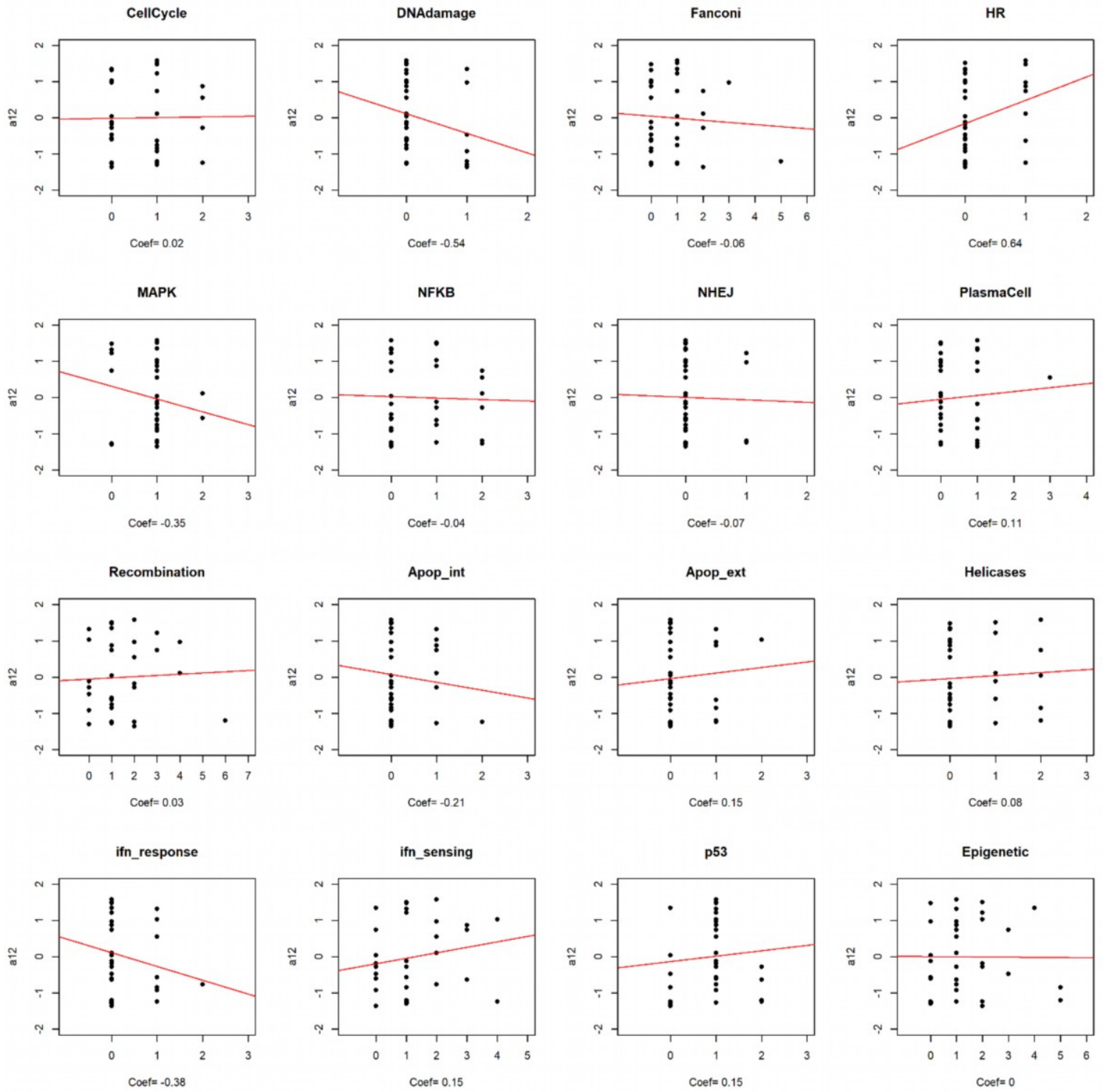
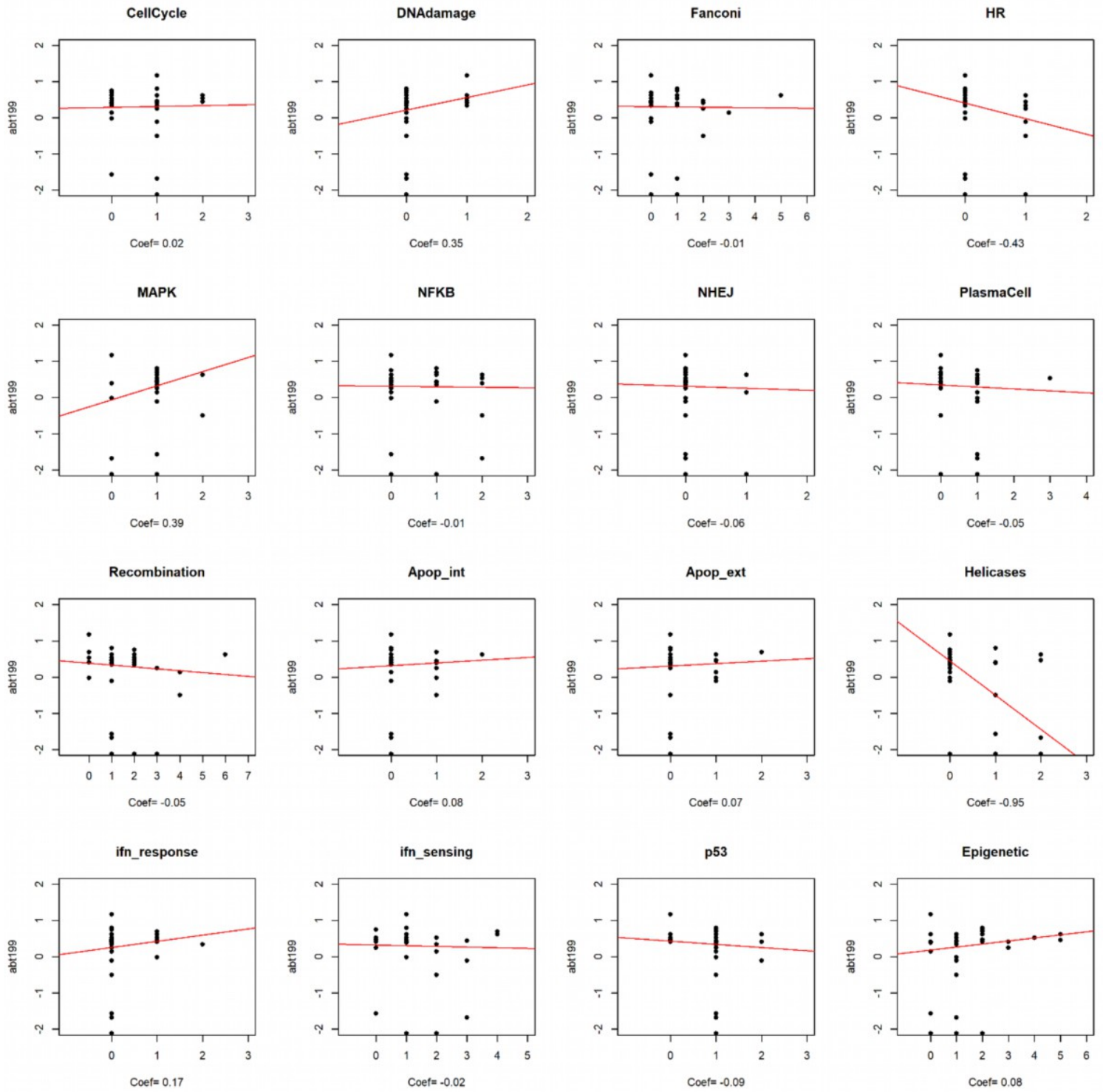


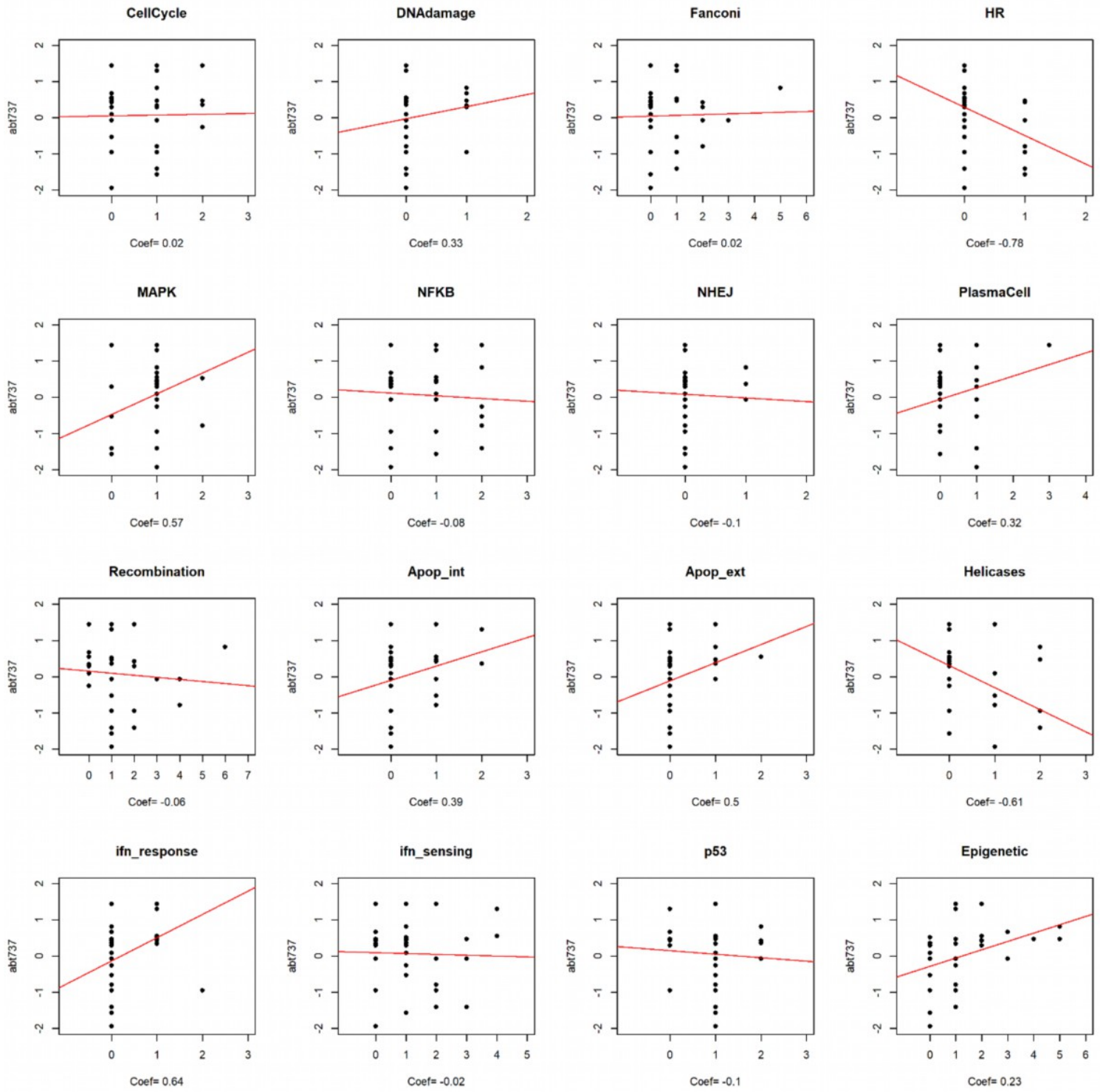
Figure S7: Chord Diagram of pathway hits relative to recurrent translocation subgroup. Pathway sizes are proportional to their number of hits. Significant associations are outlined in black.

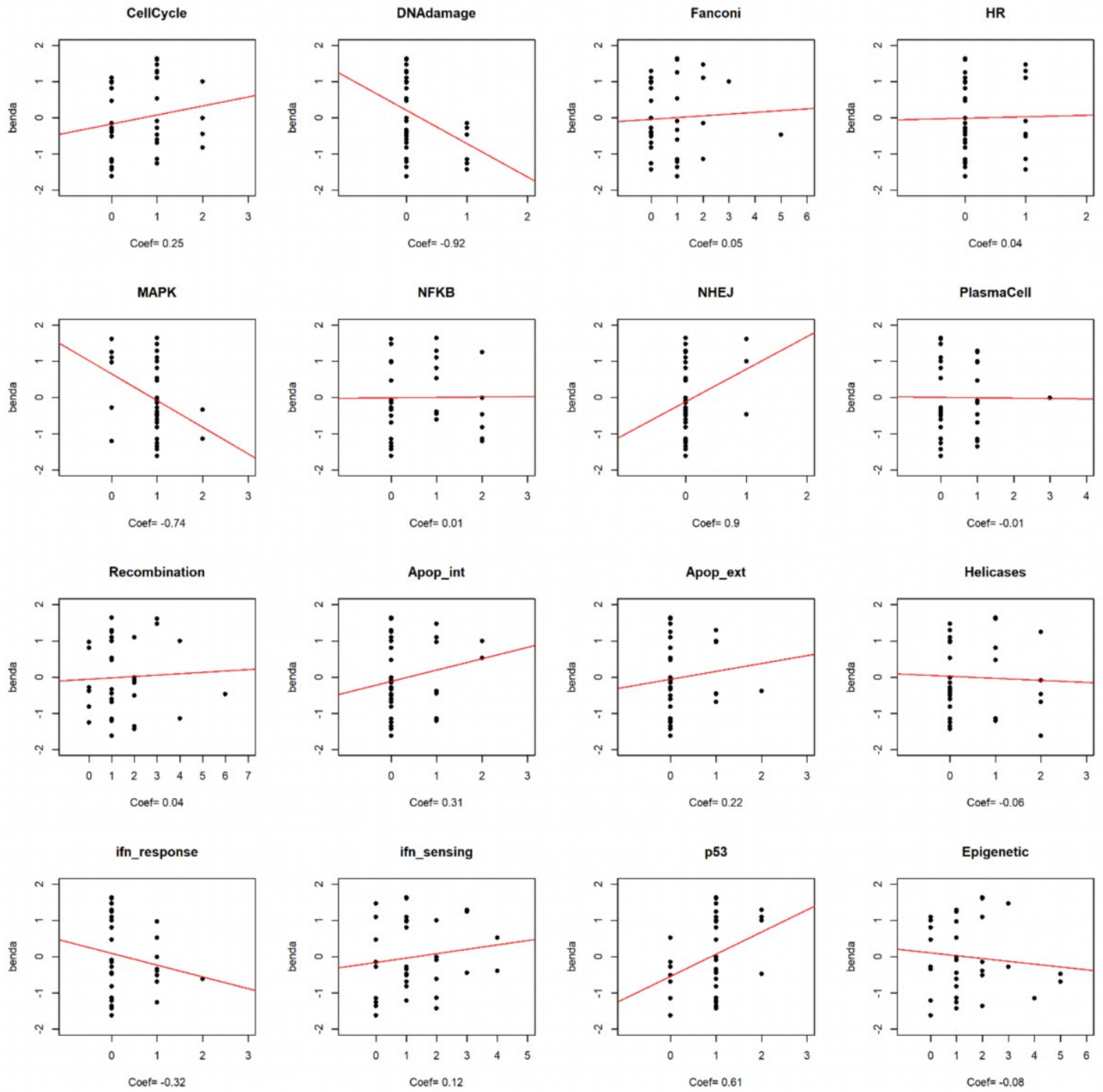
Figure S8: Drugs responses according to pathway hits. Robust linear regression coefficient is displayed; regression line was drawn according to coefficients obtained after 5000 bootstrapped replicates. Only significant associations of tested drugs with the pathways of interest are displayed. Mel= Melphalan, benda= Bendamustine, palbo=Palbociclib, tram2= trametinib, mapa= Mapatumumab, nut= Nultin-3A, Prima= Prima-1^{Met}, lexa= lexatumumab, dexa= dexamethasone, poma= pomalidomide, btz= bortezomib, cfz= carfilzomib, a11= A-1155463, a12= A-1210477.

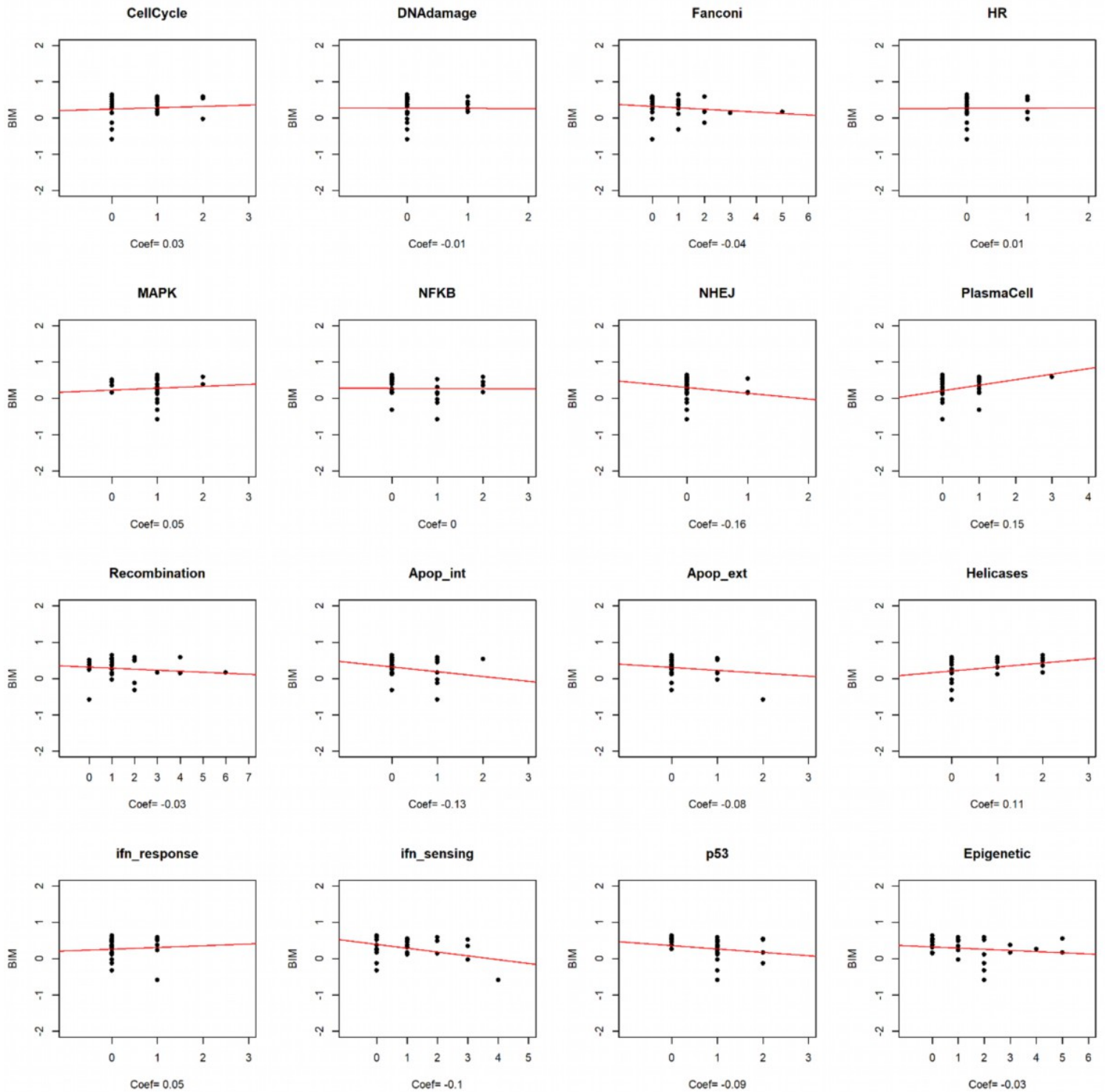


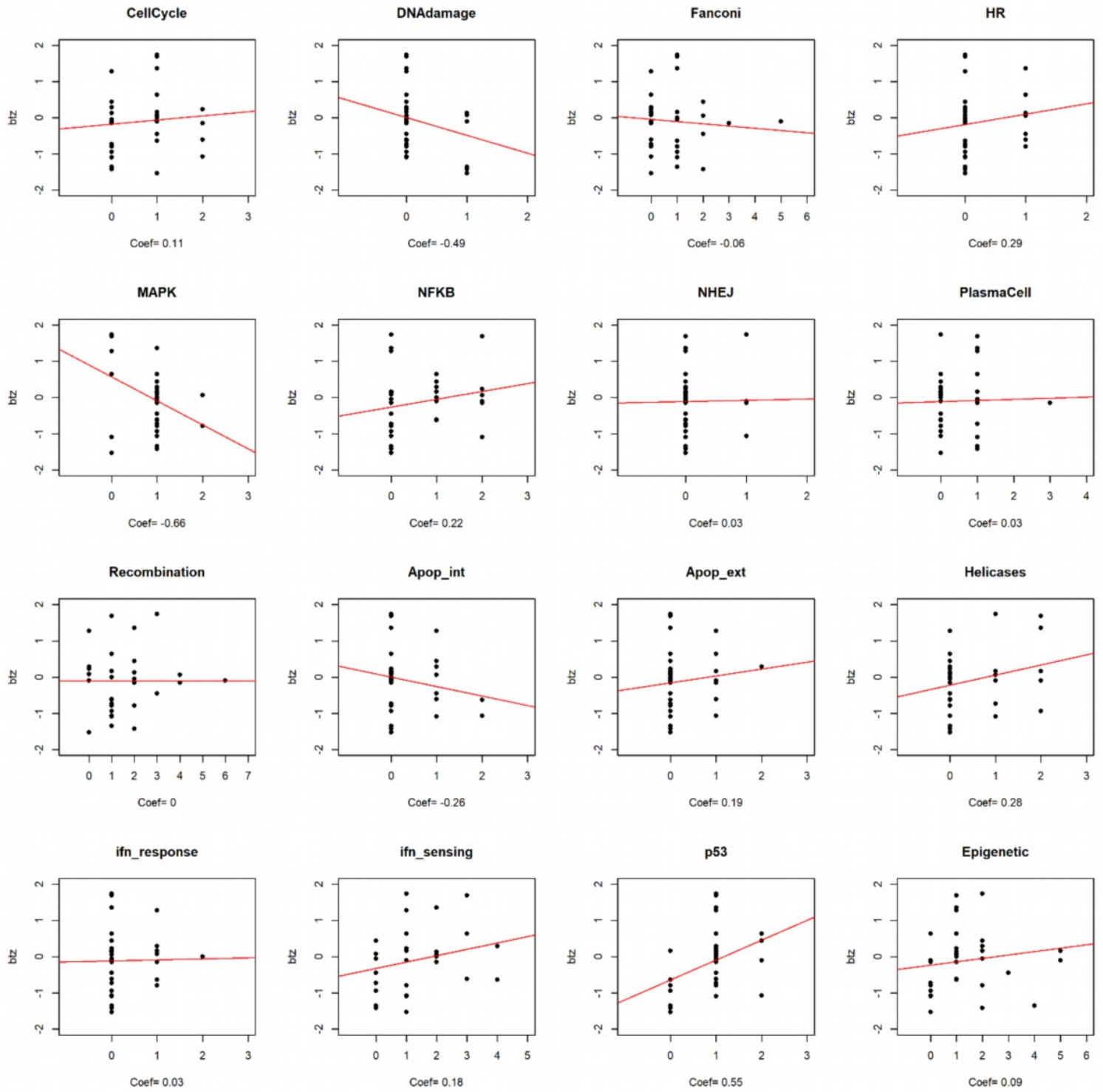


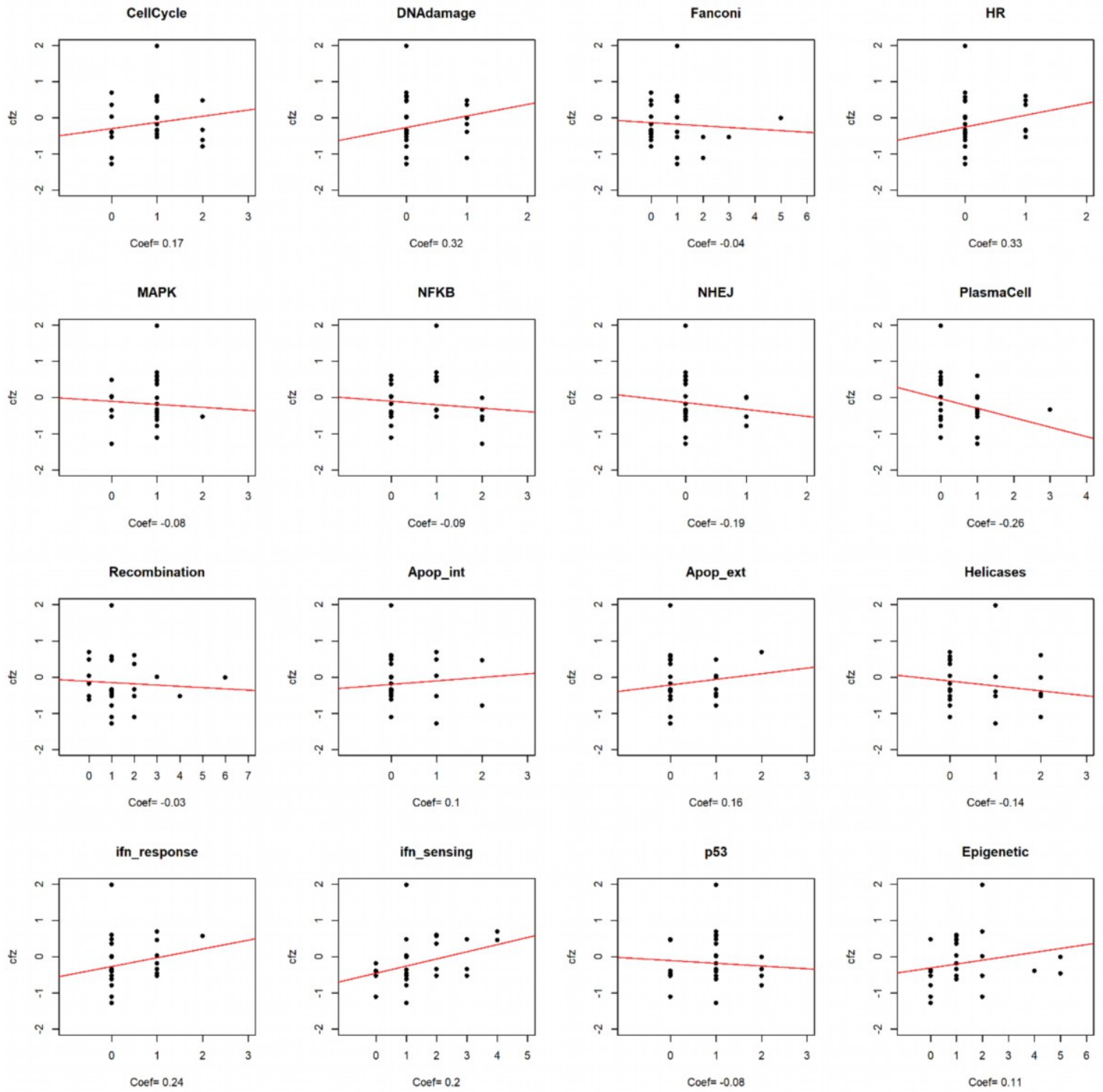


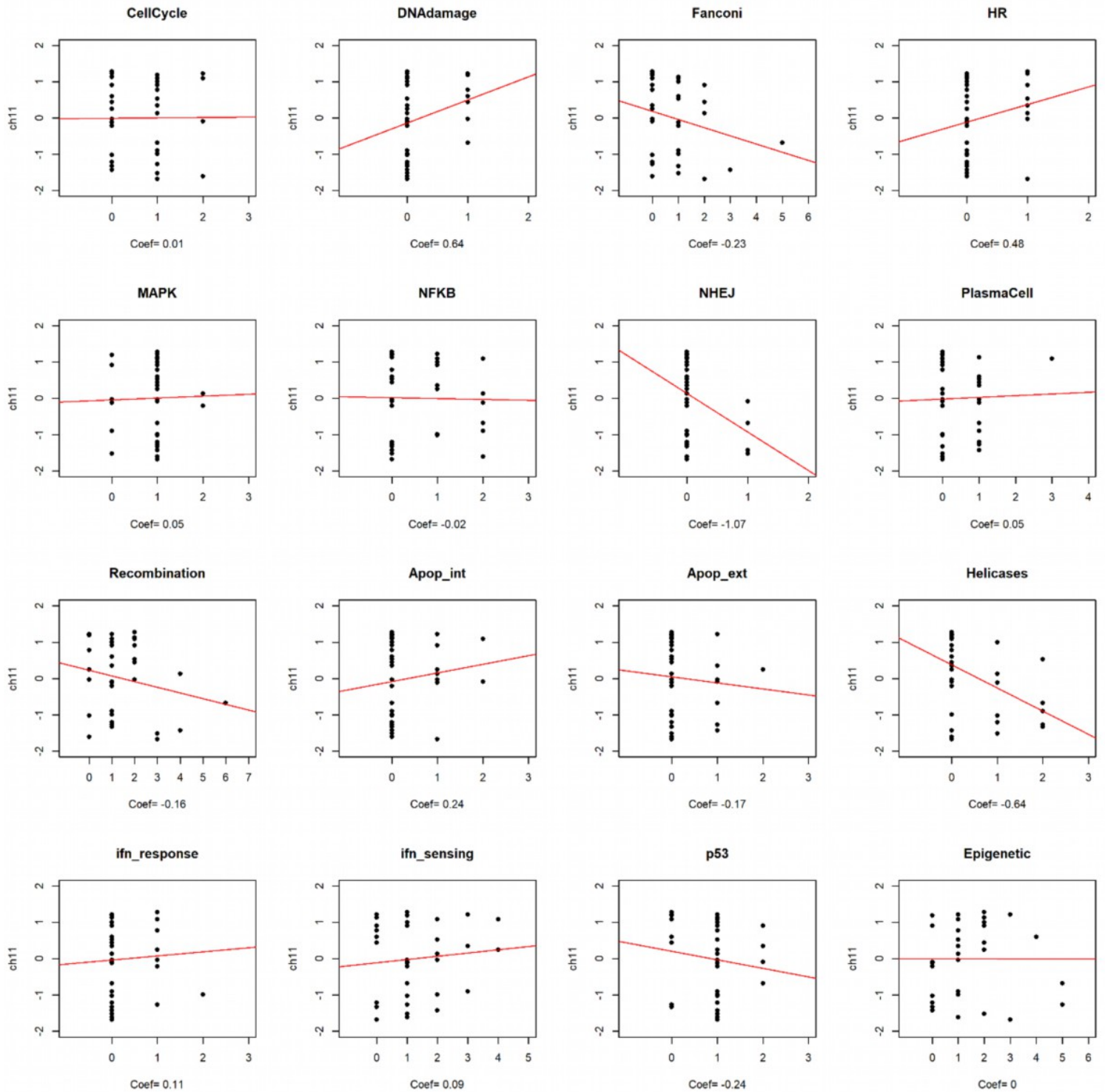


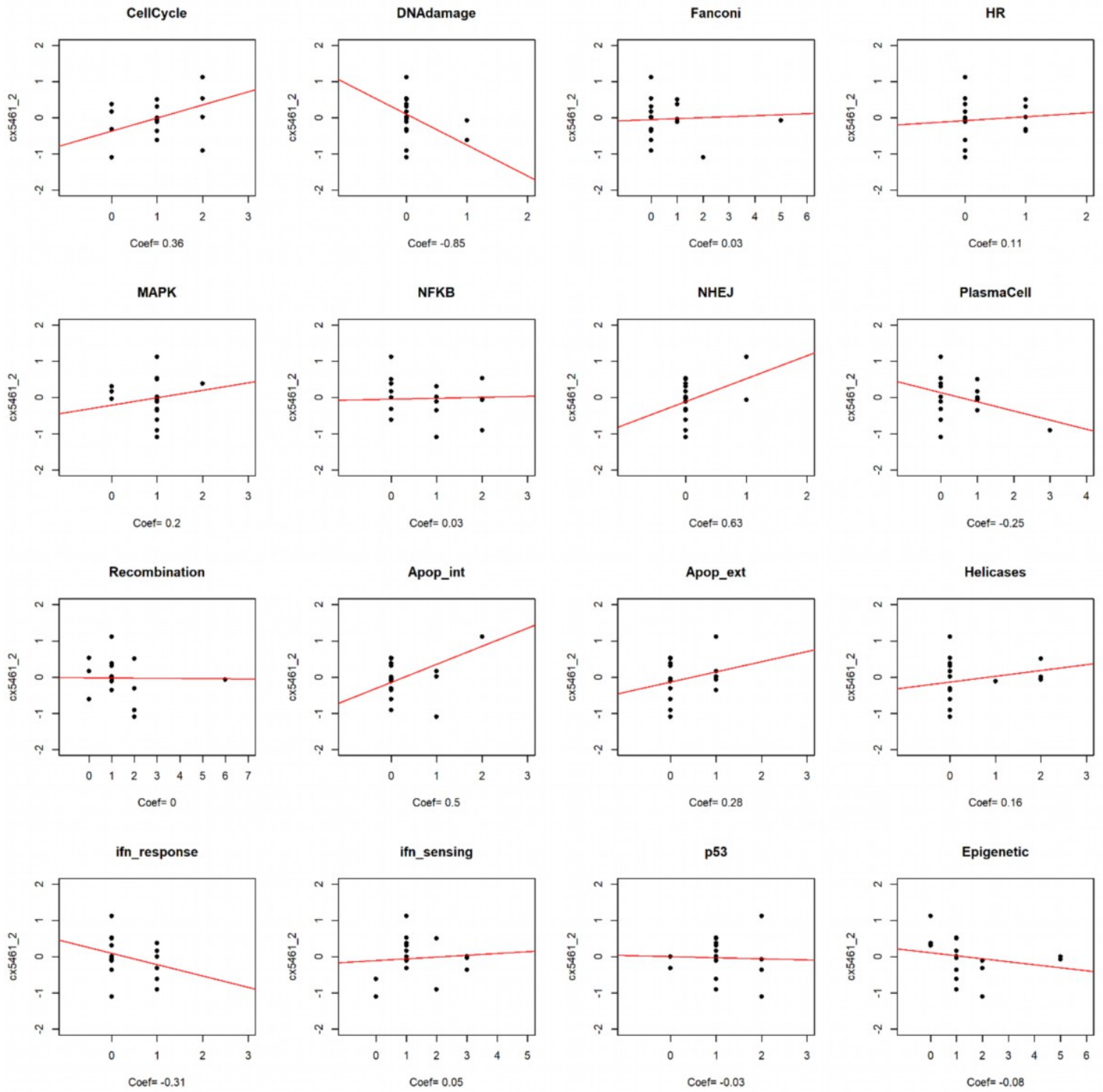


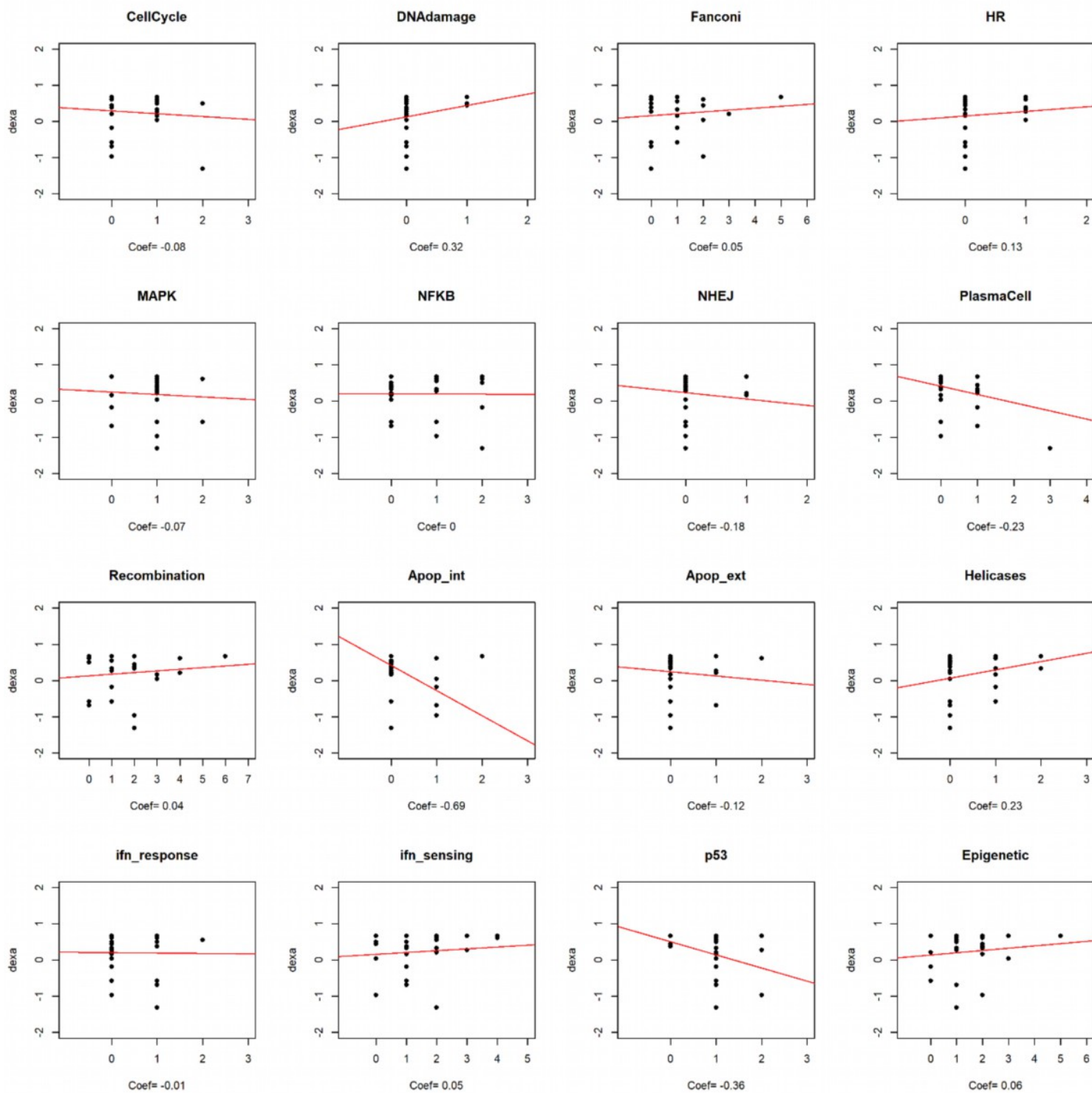


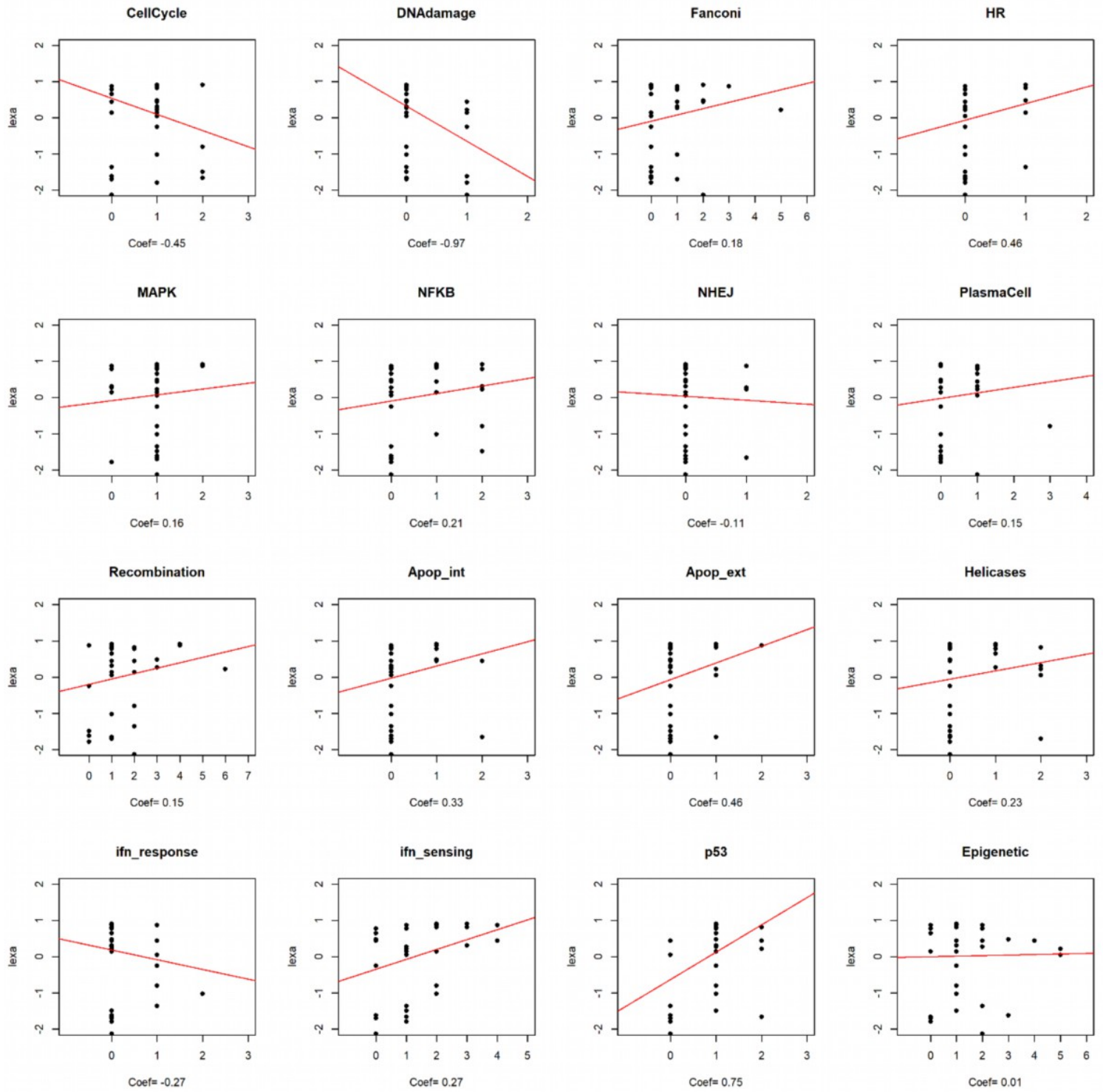


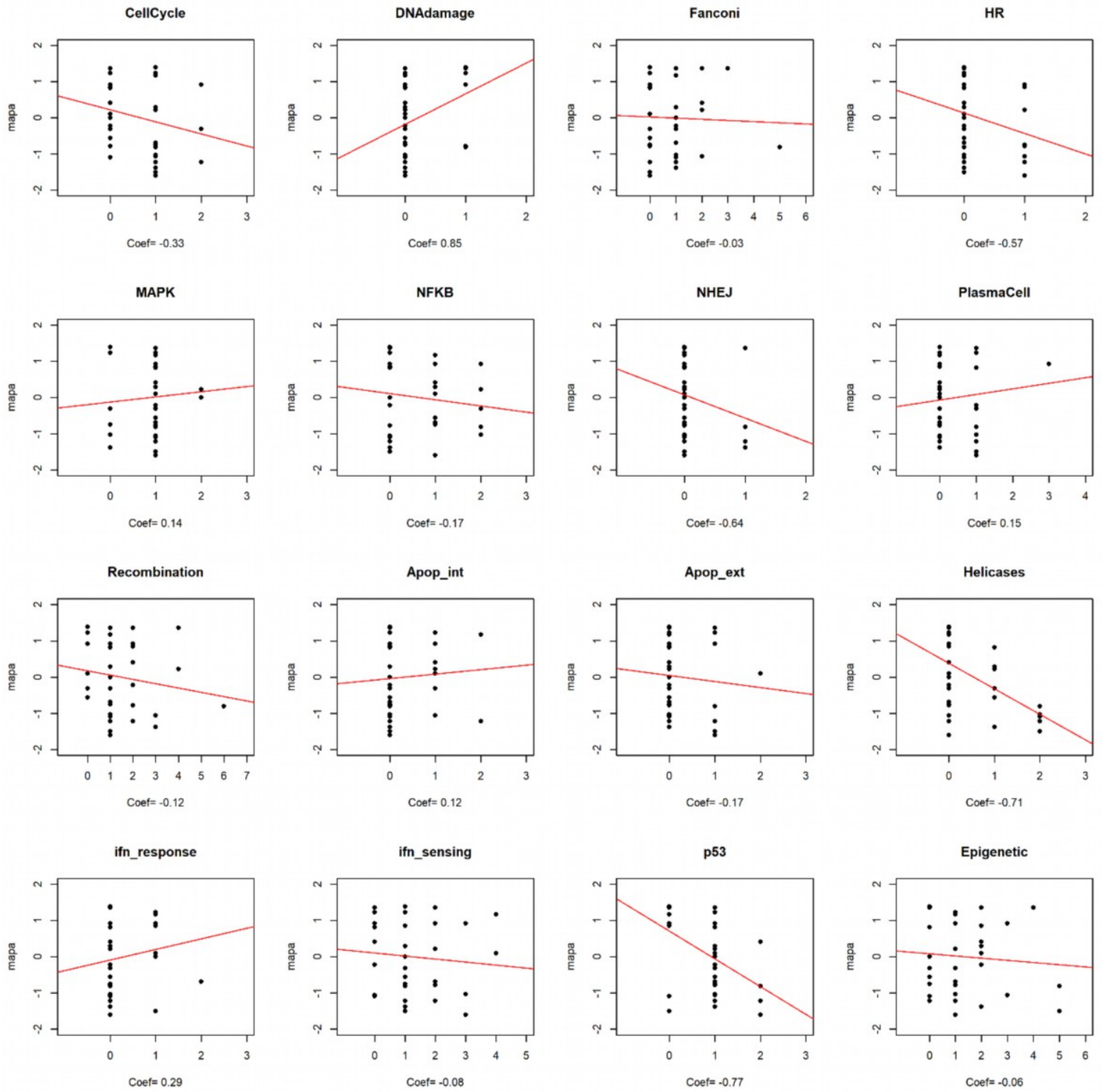


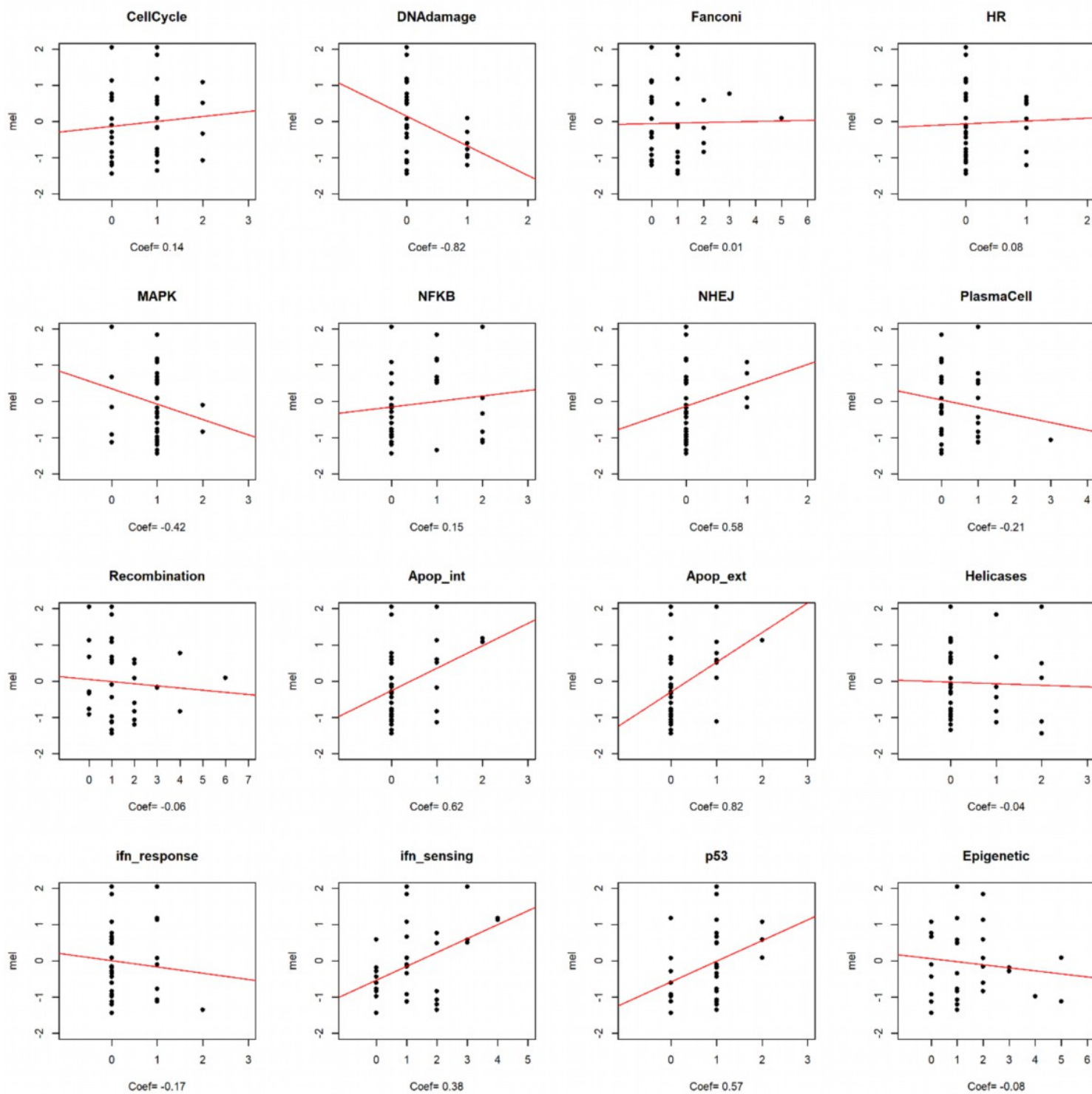


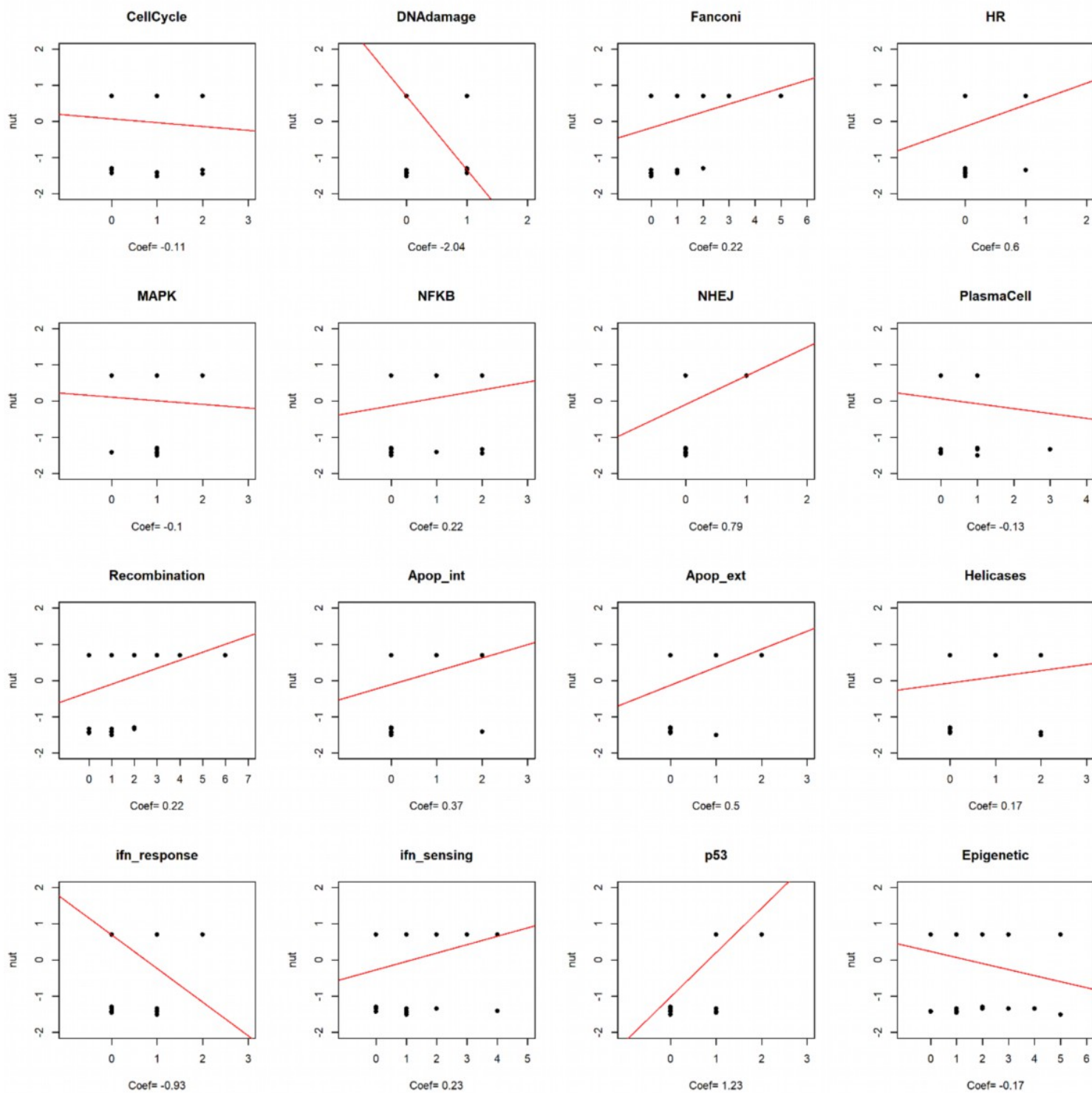


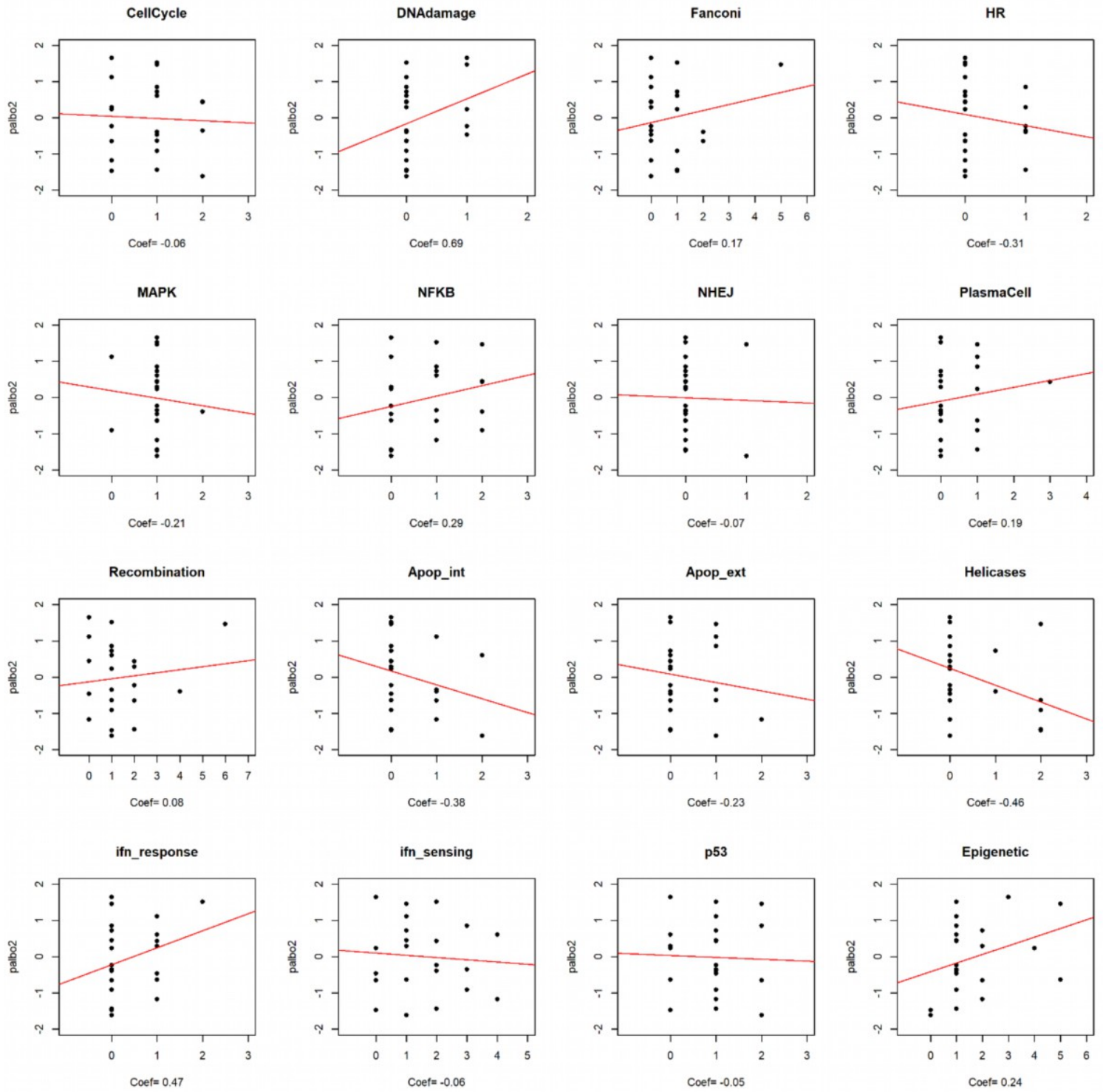


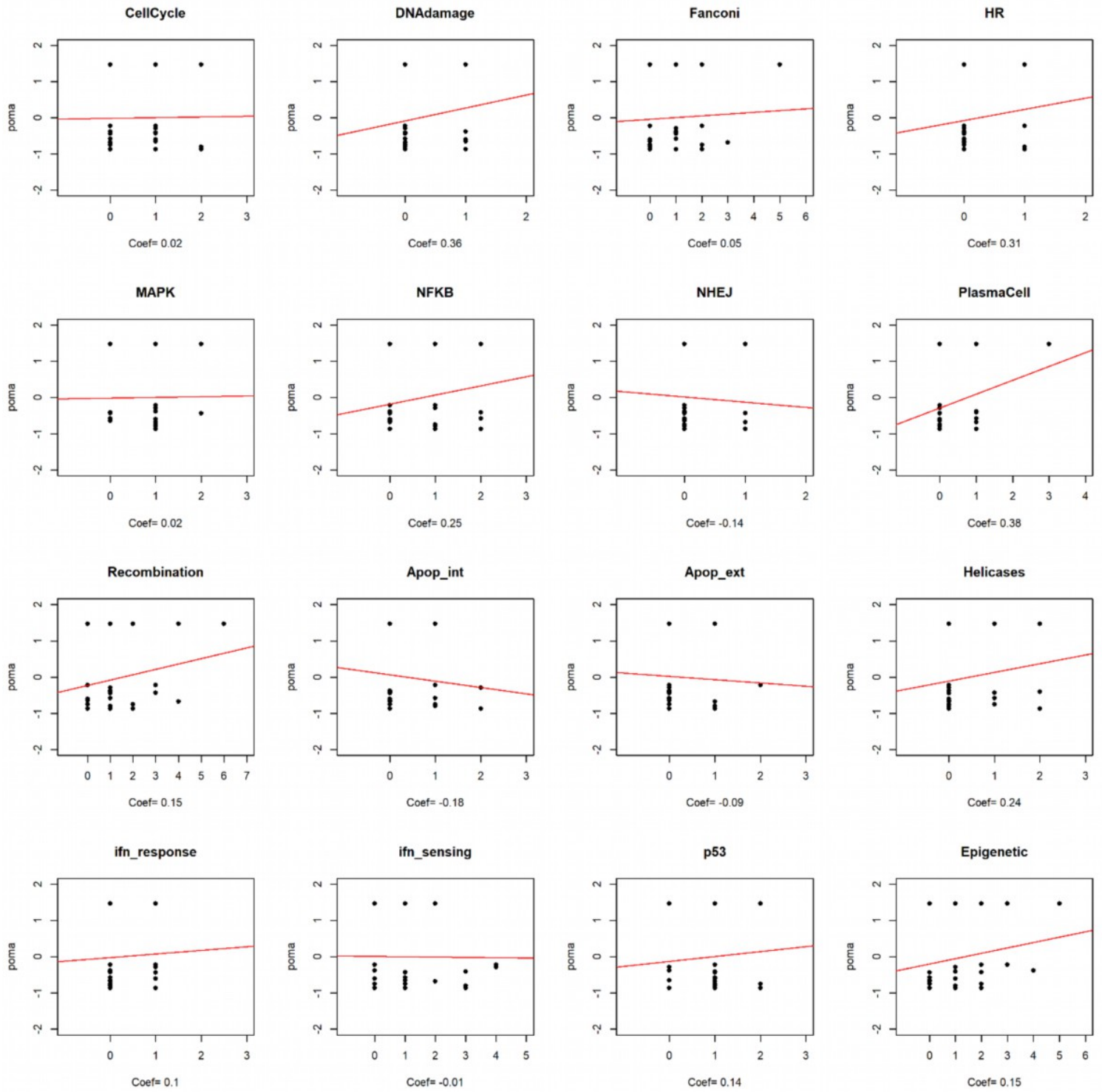


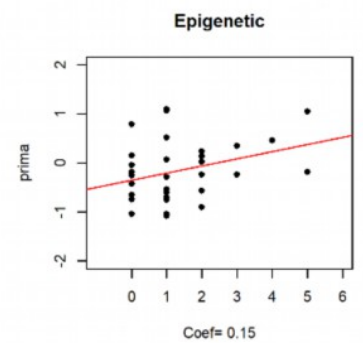
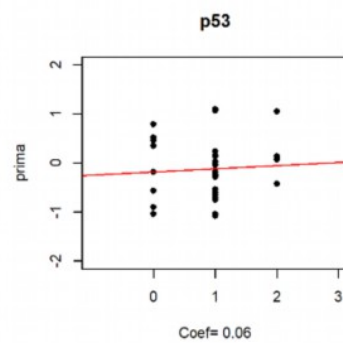
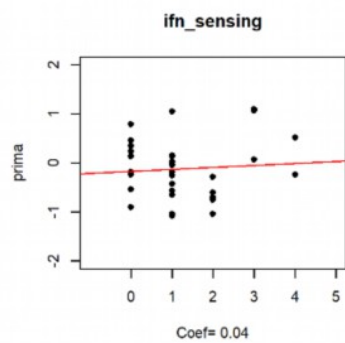
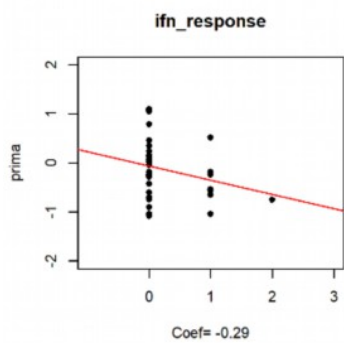
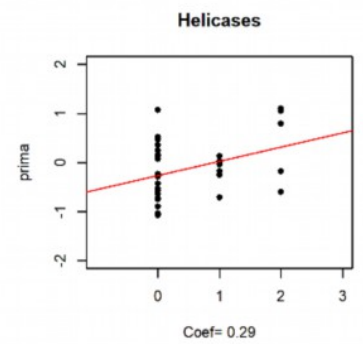
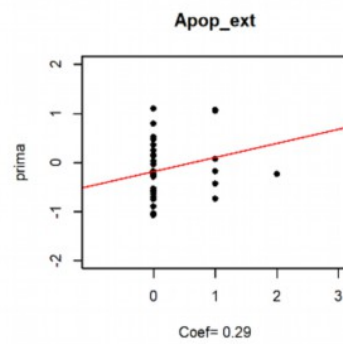
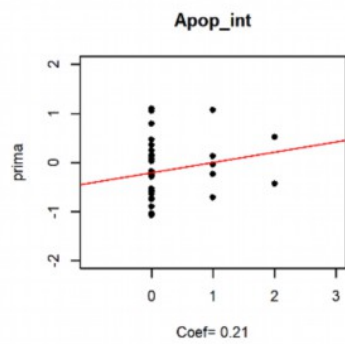
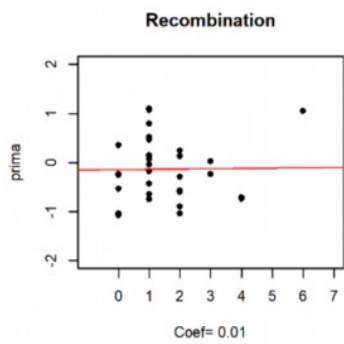
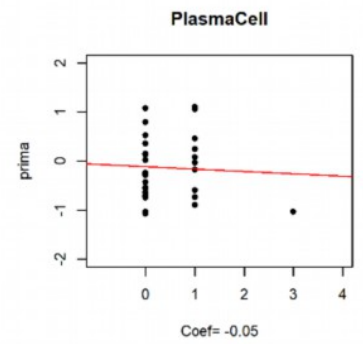
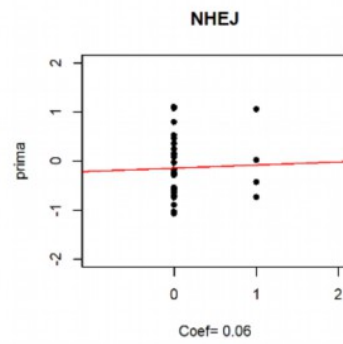
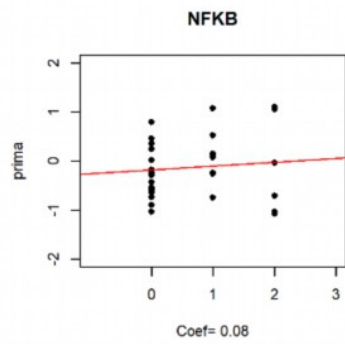
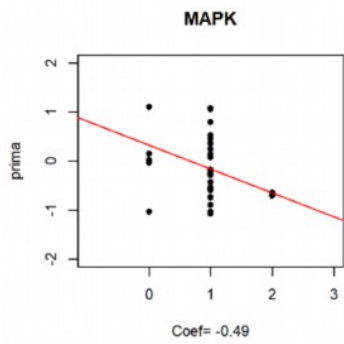
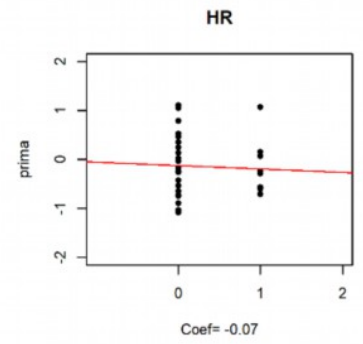
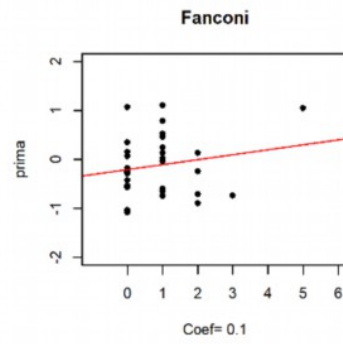
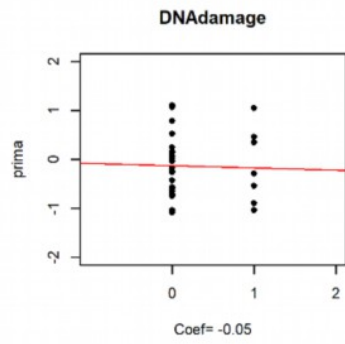
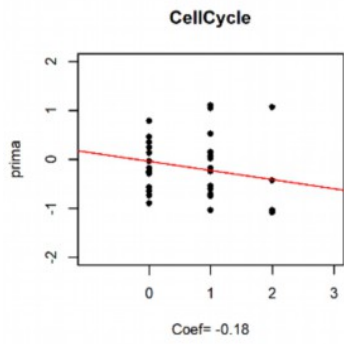


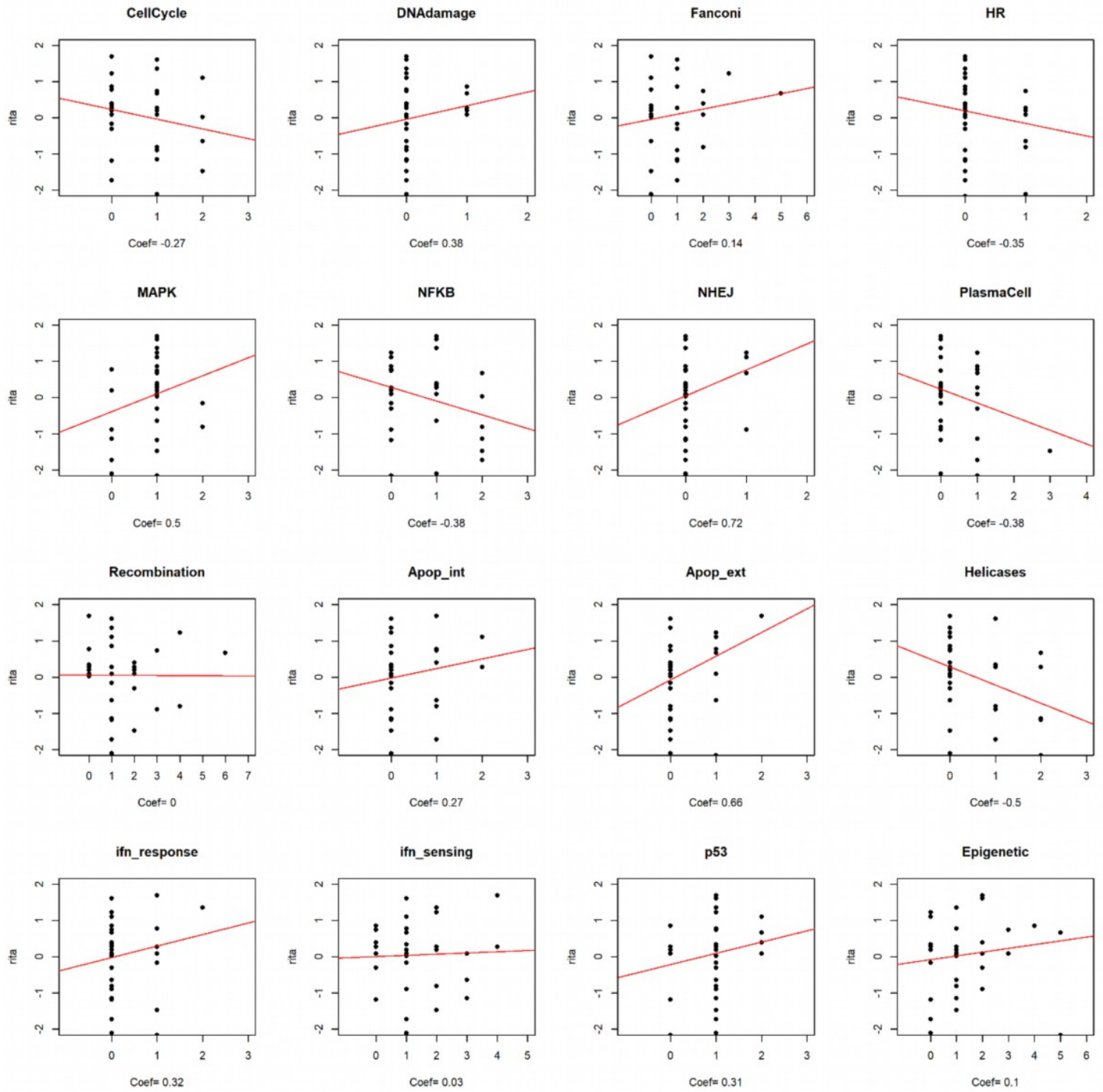


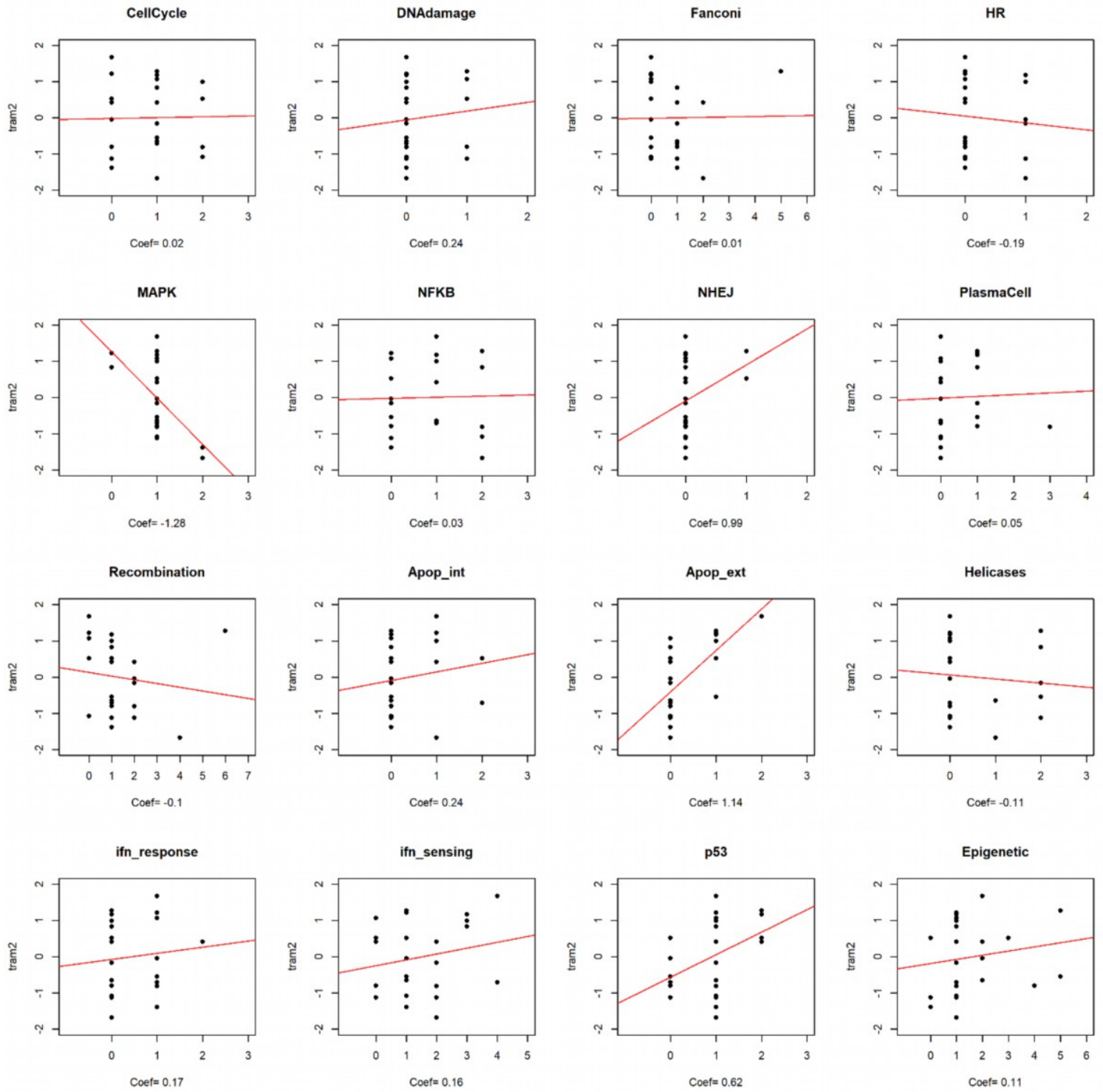


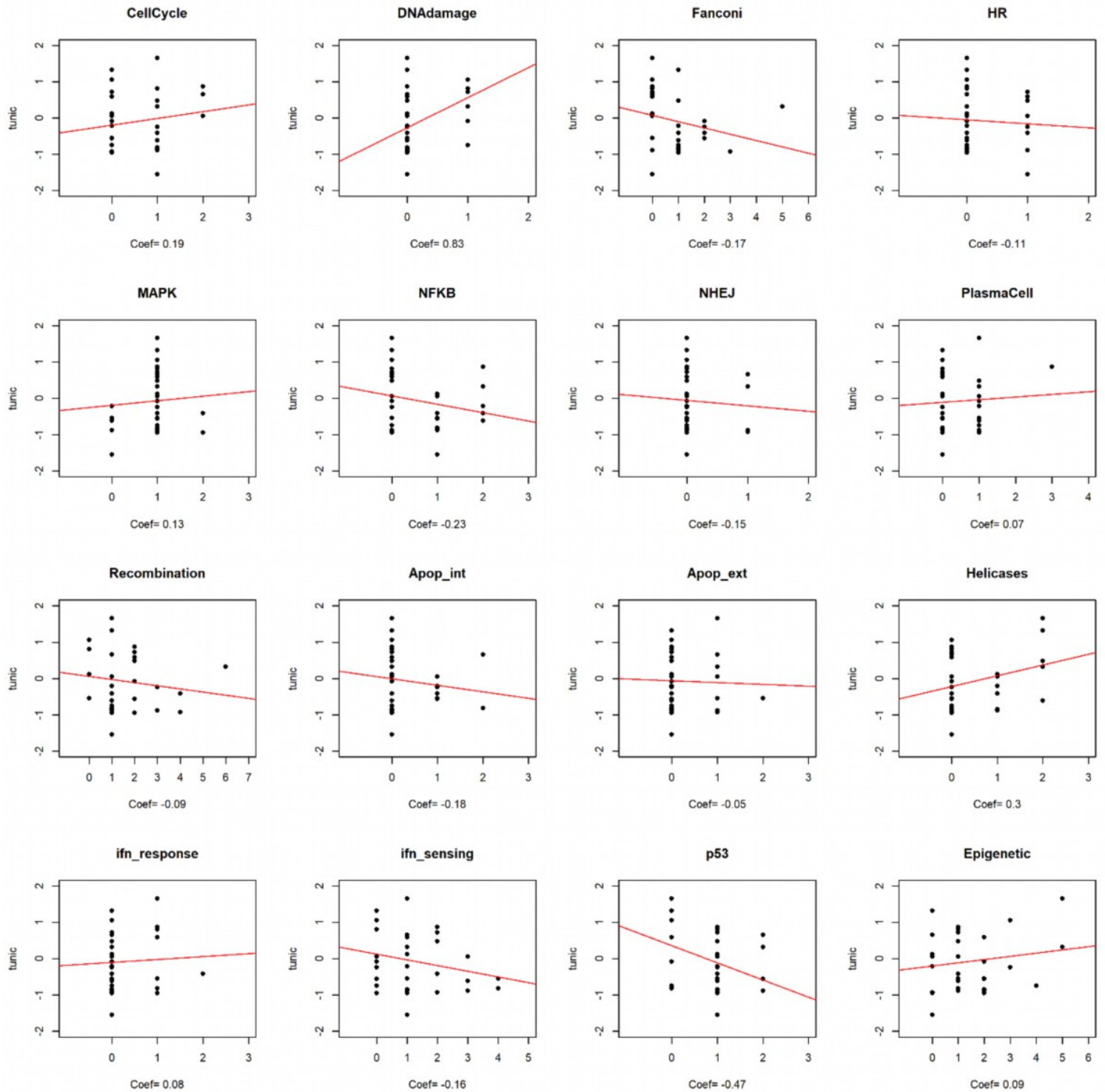




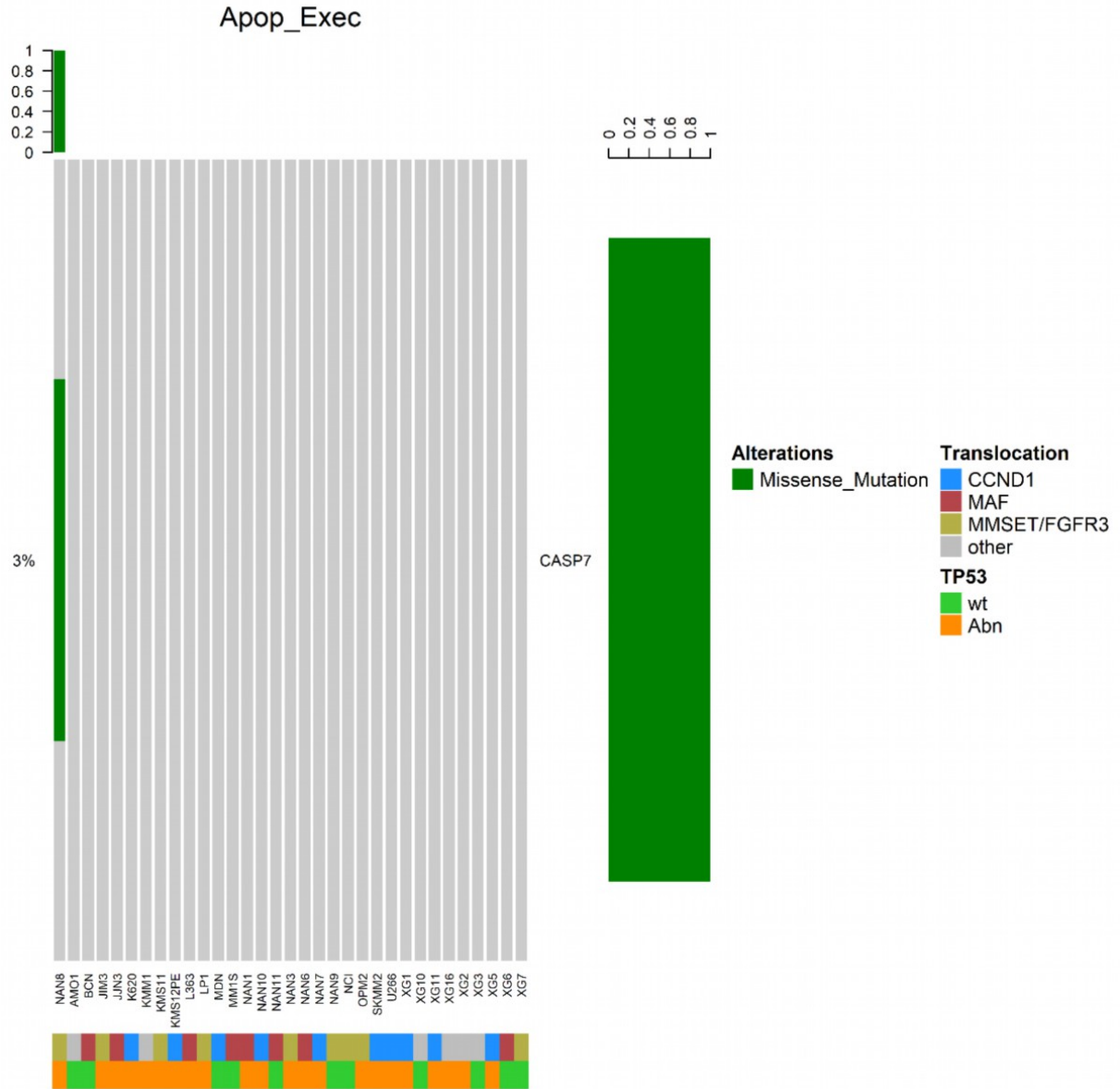


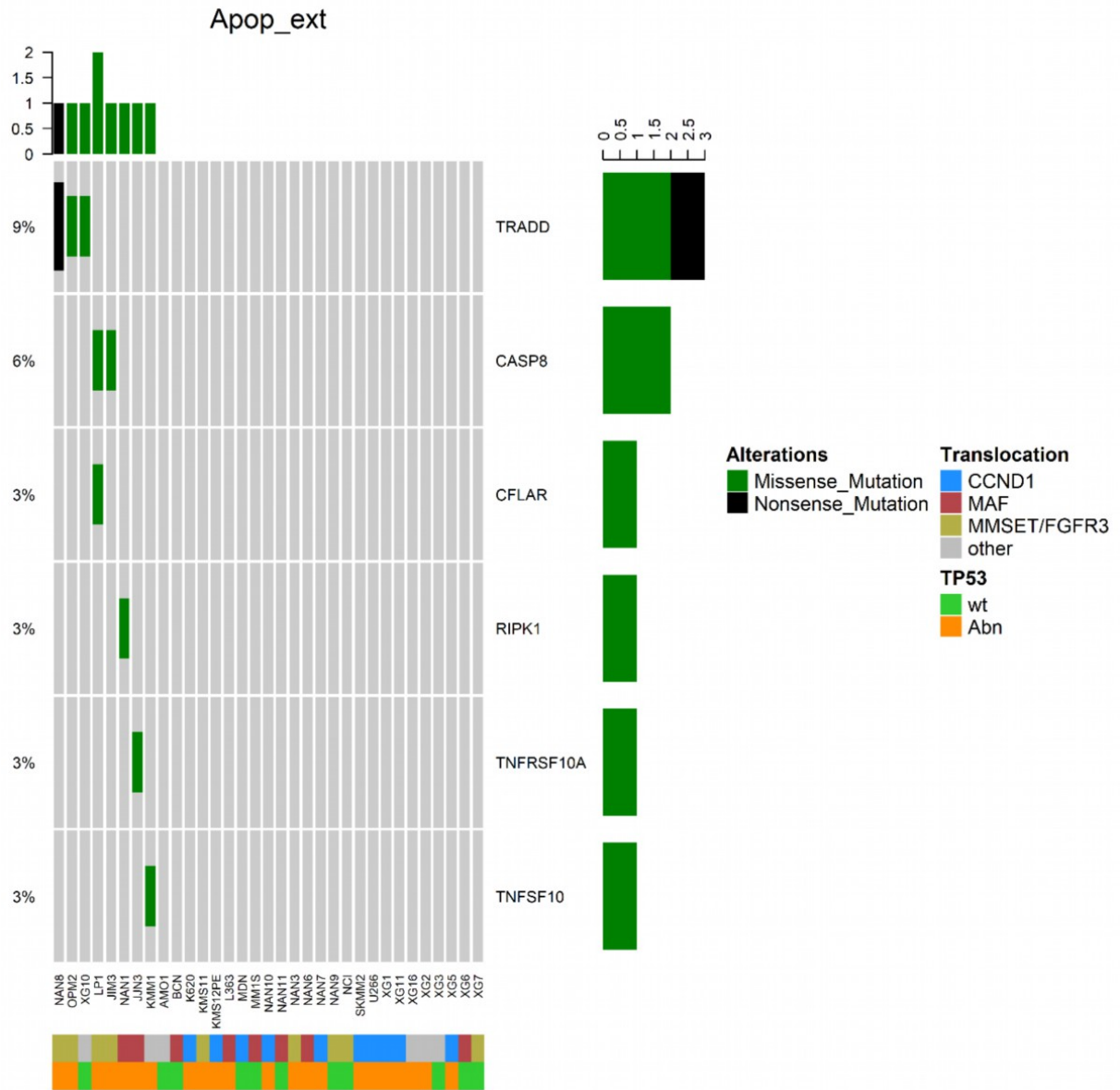


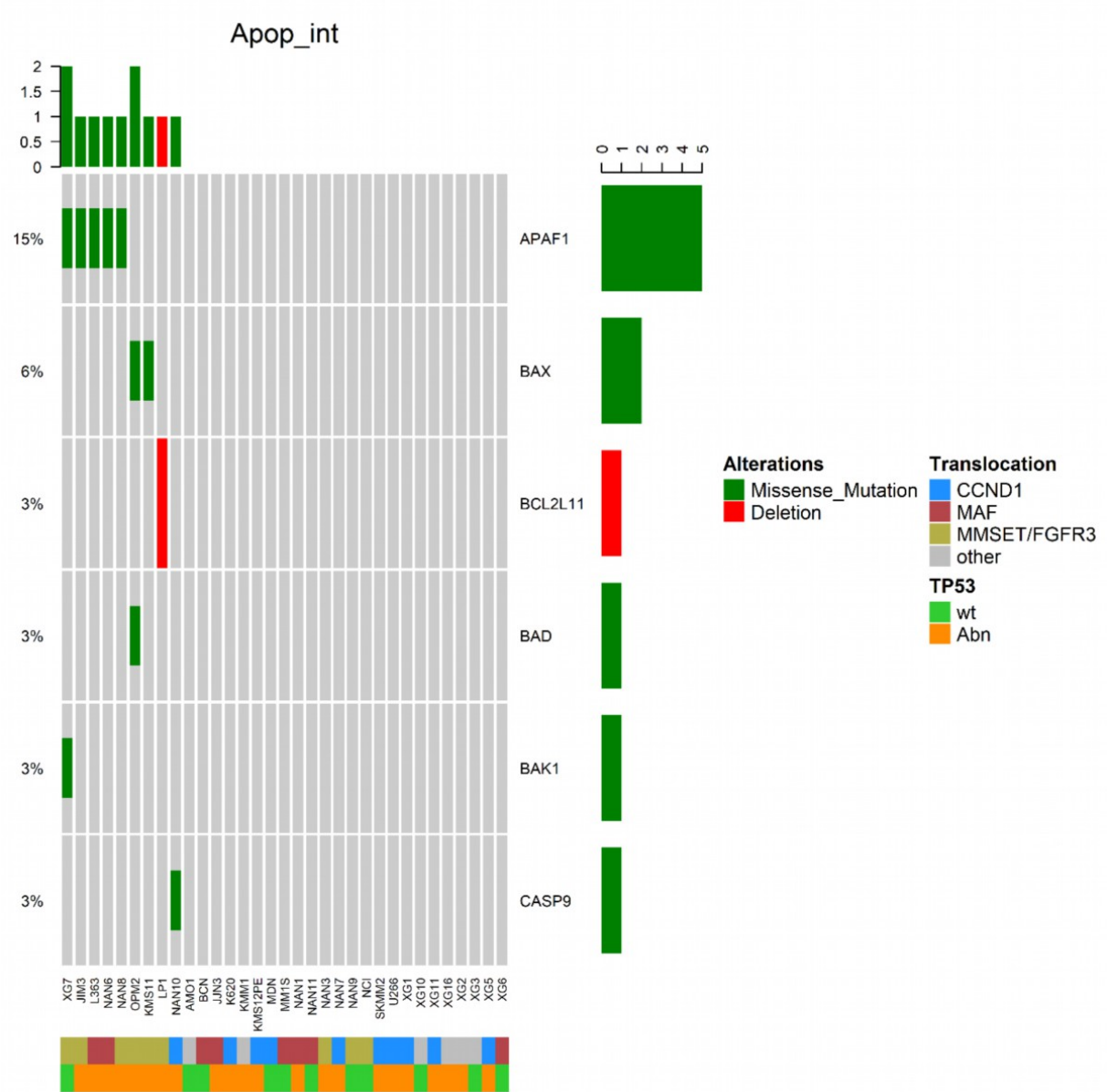


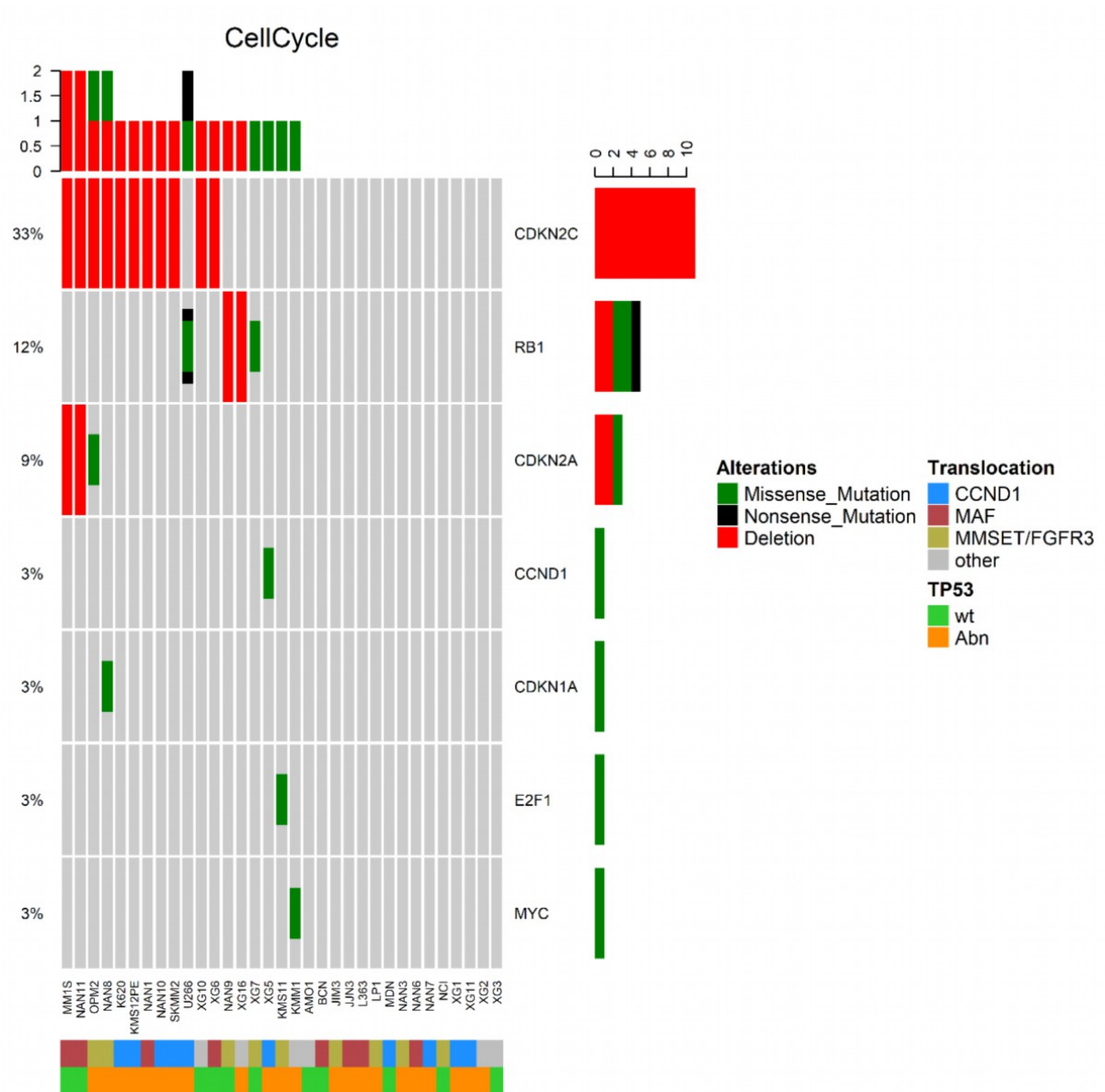


Sup. Figure 9: Oncoprints by pathway of mostly mutated genes

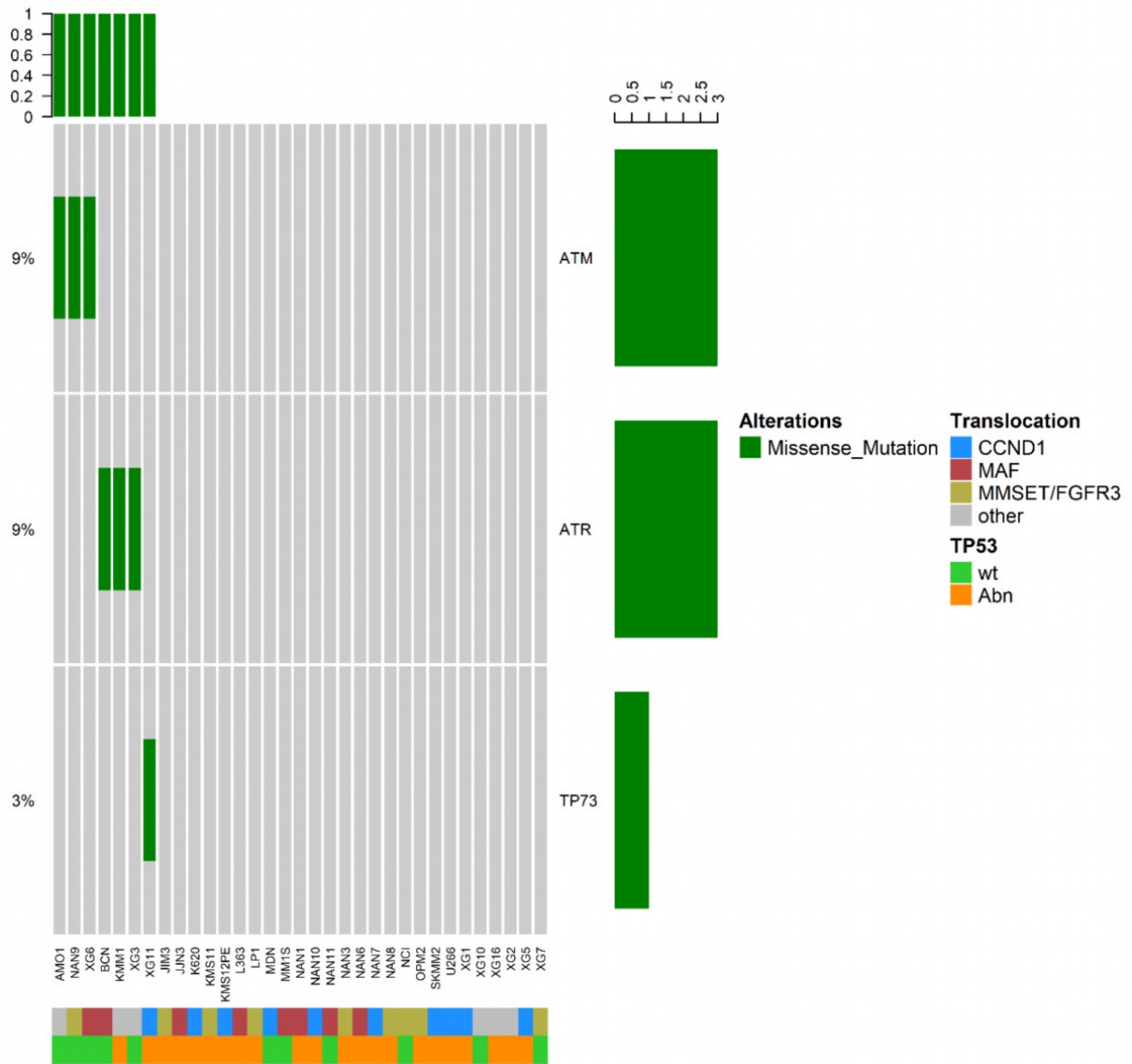




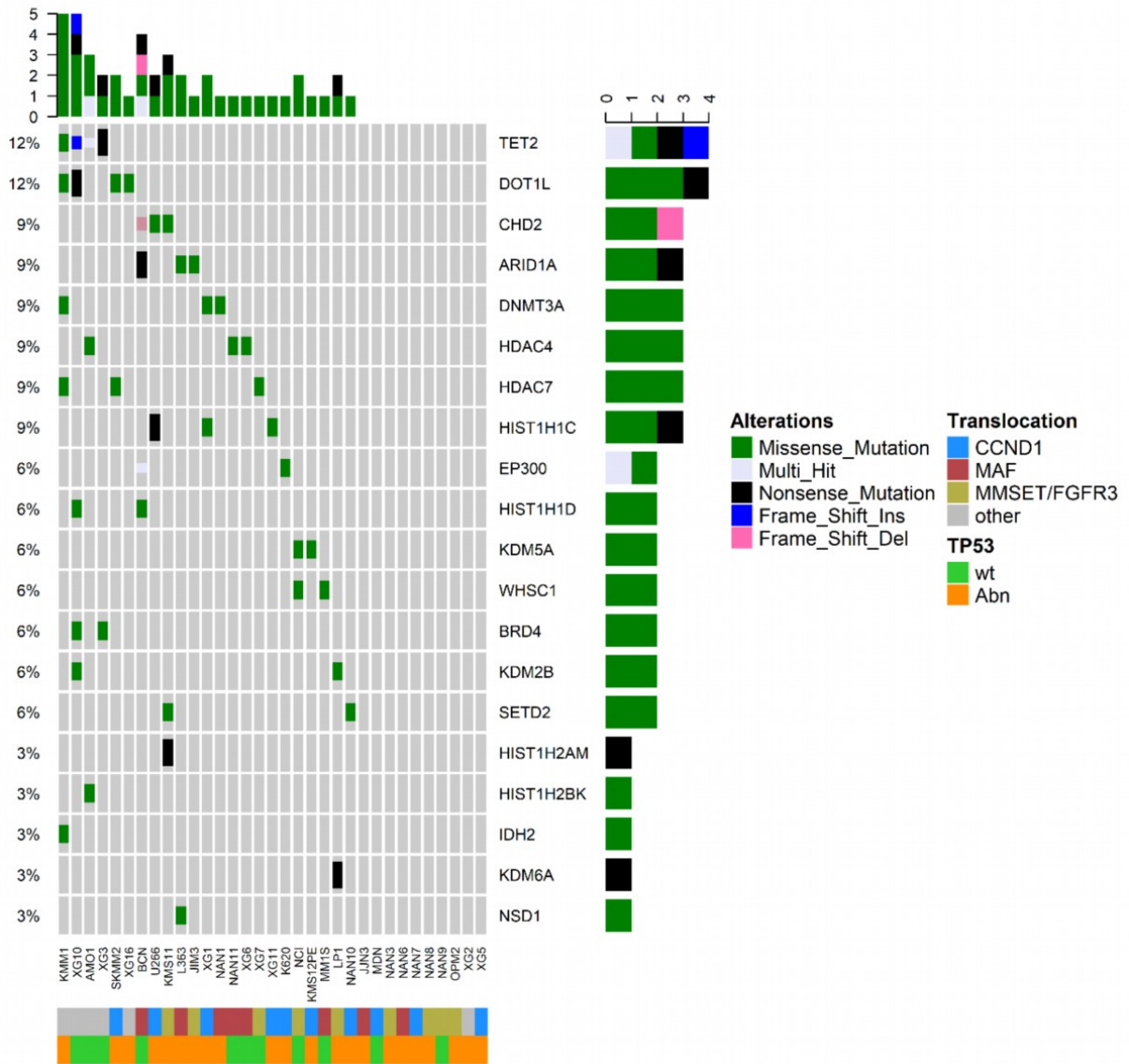




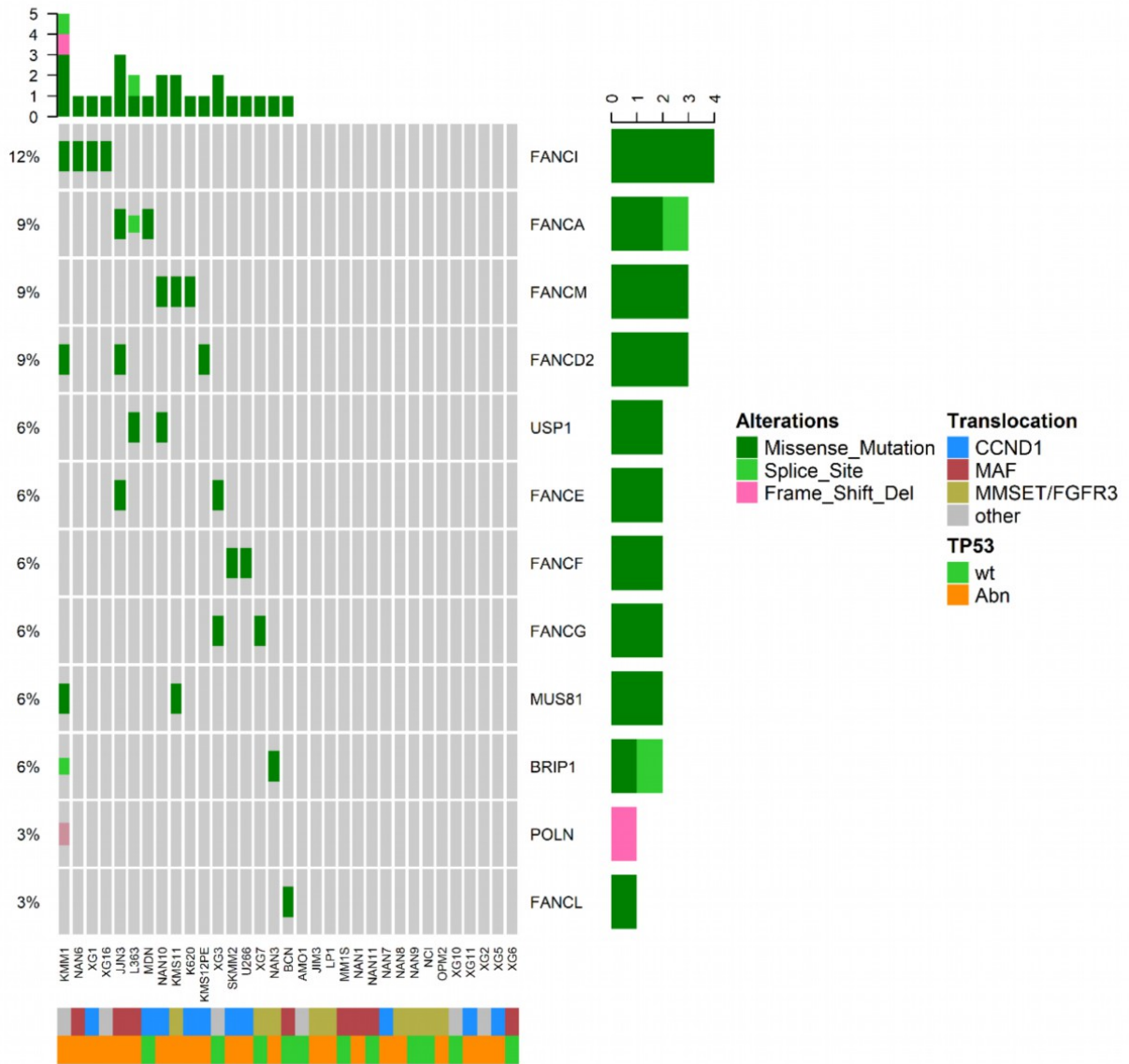
DNADamage



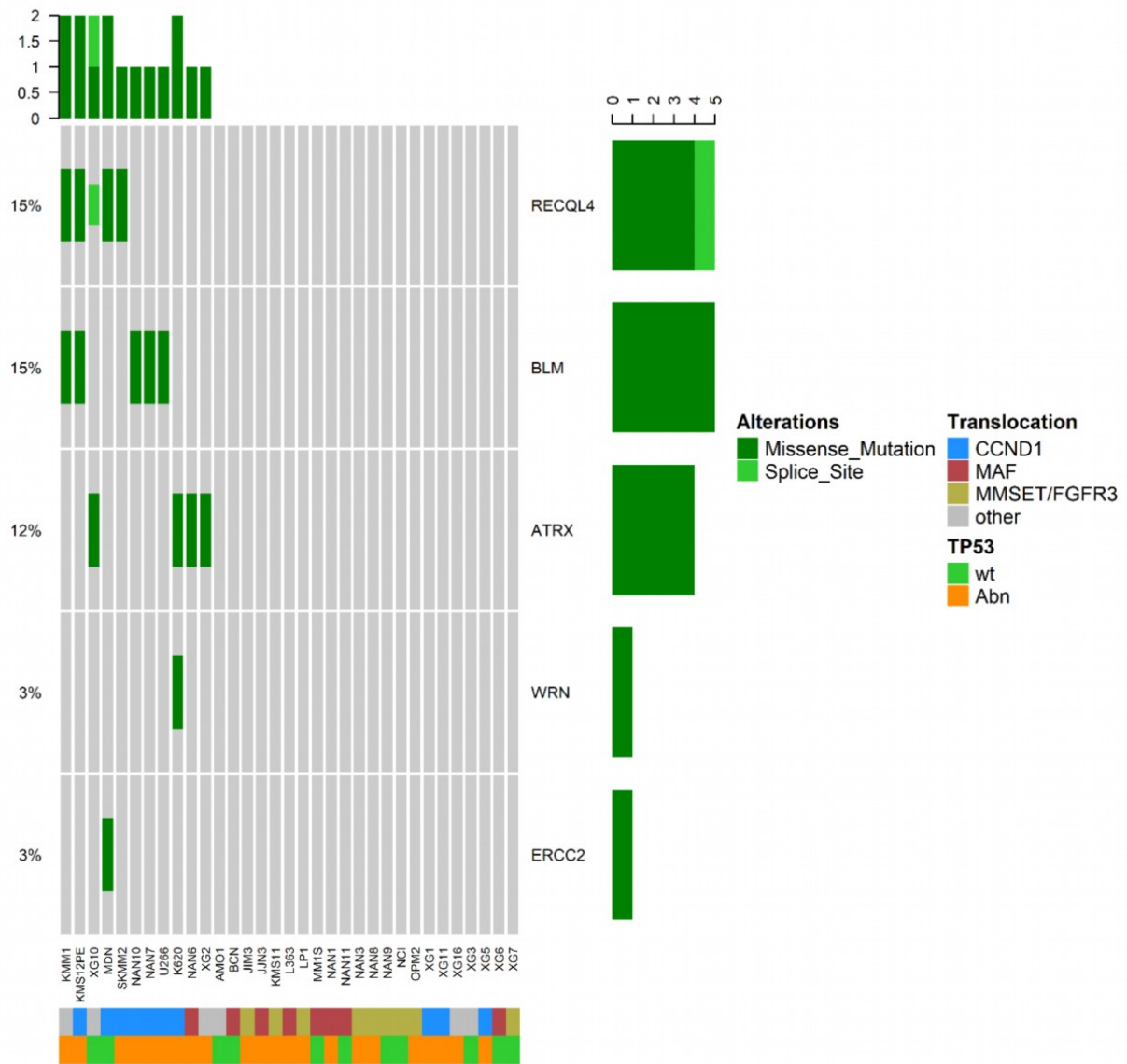
Epigenetic

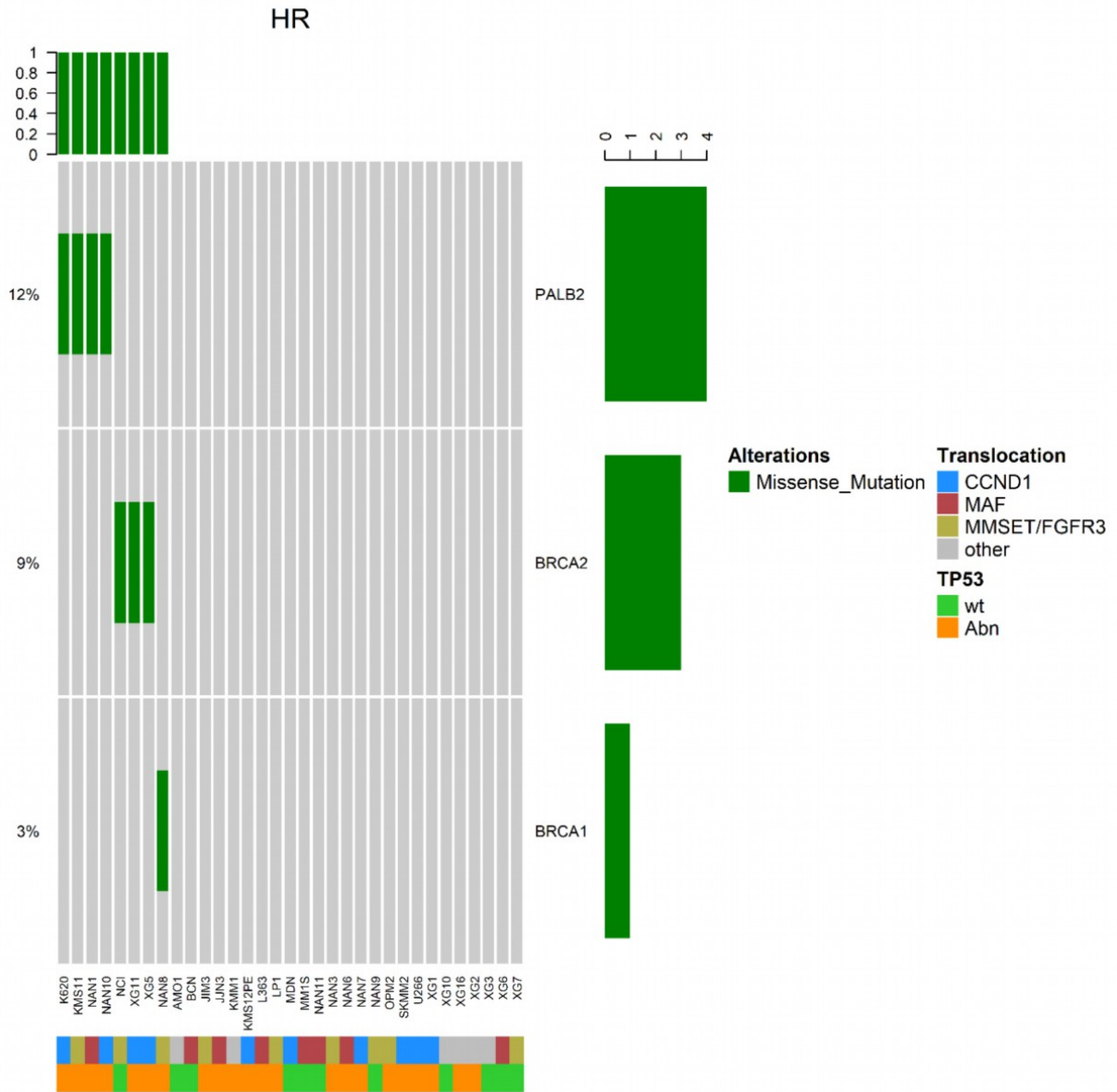


Fanconi

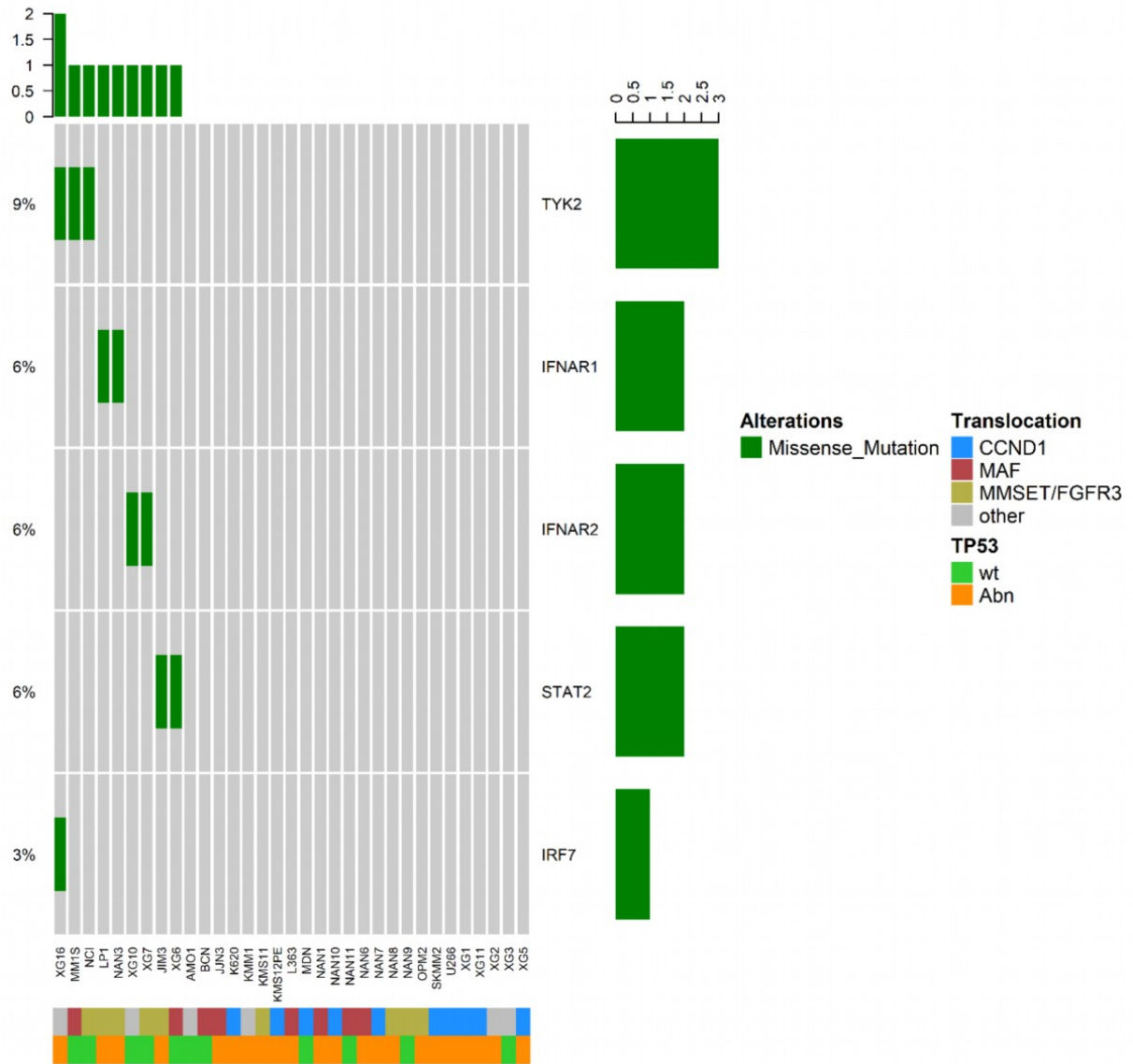


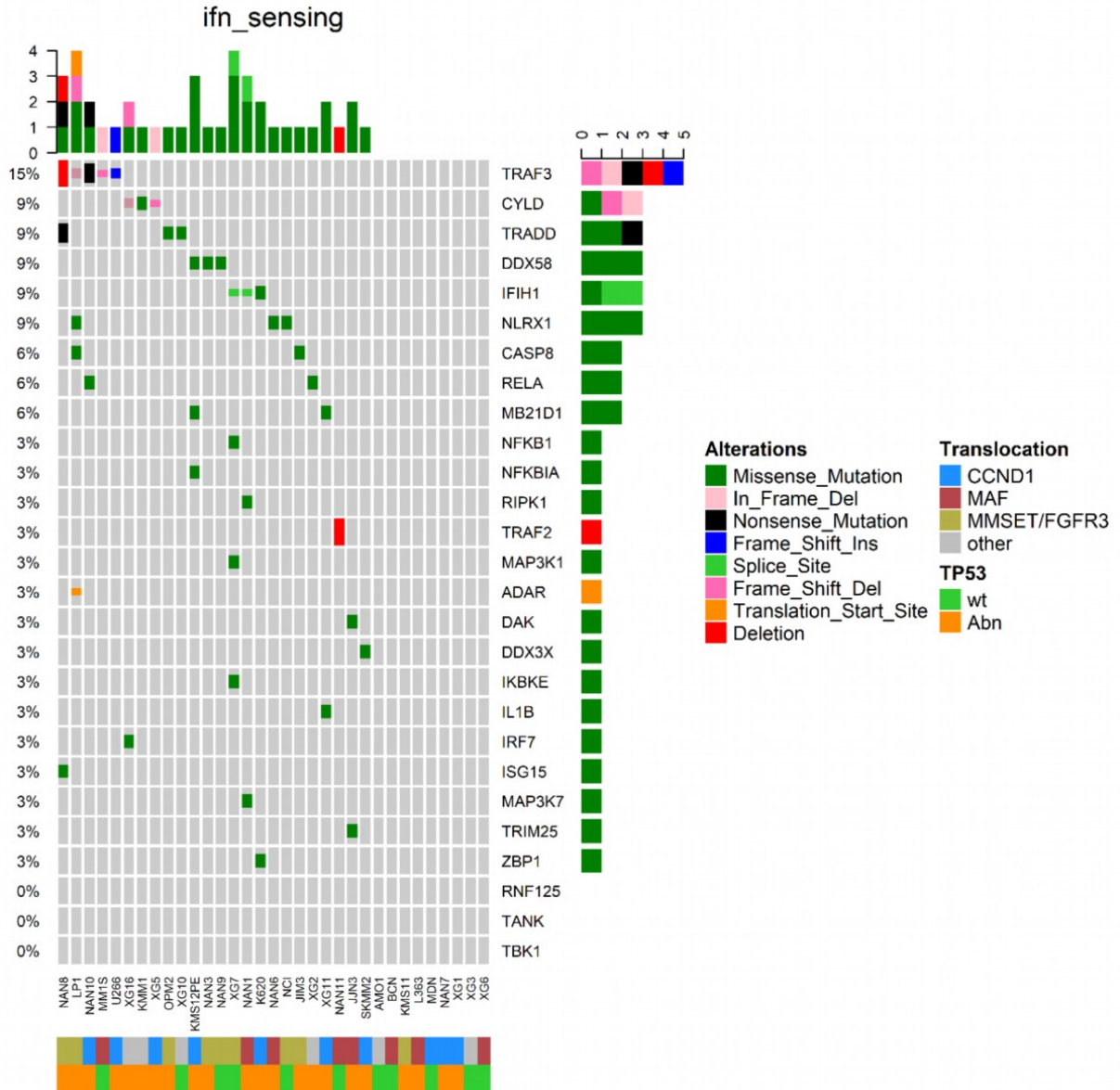
Helicases

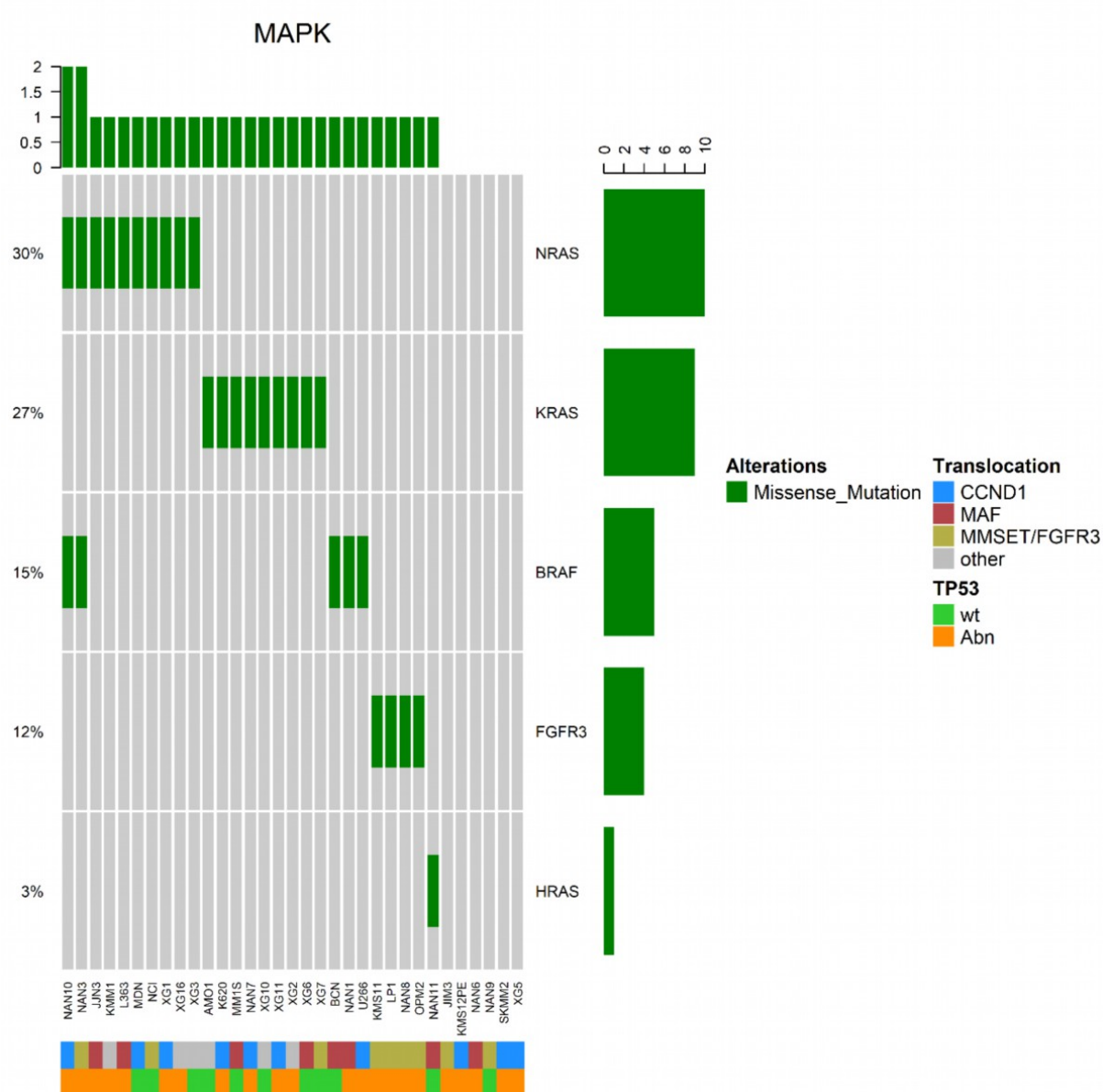




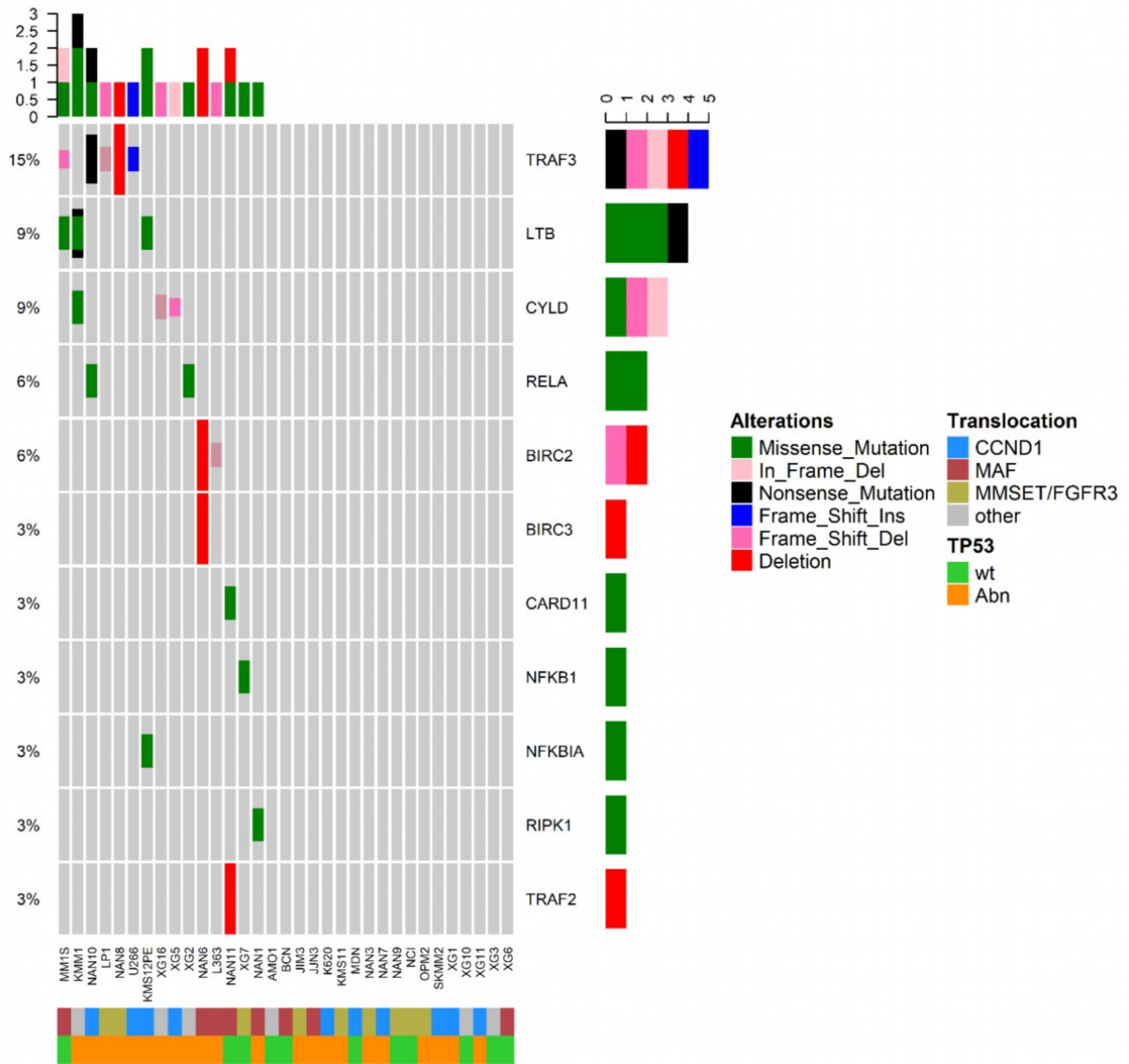
ifn_response



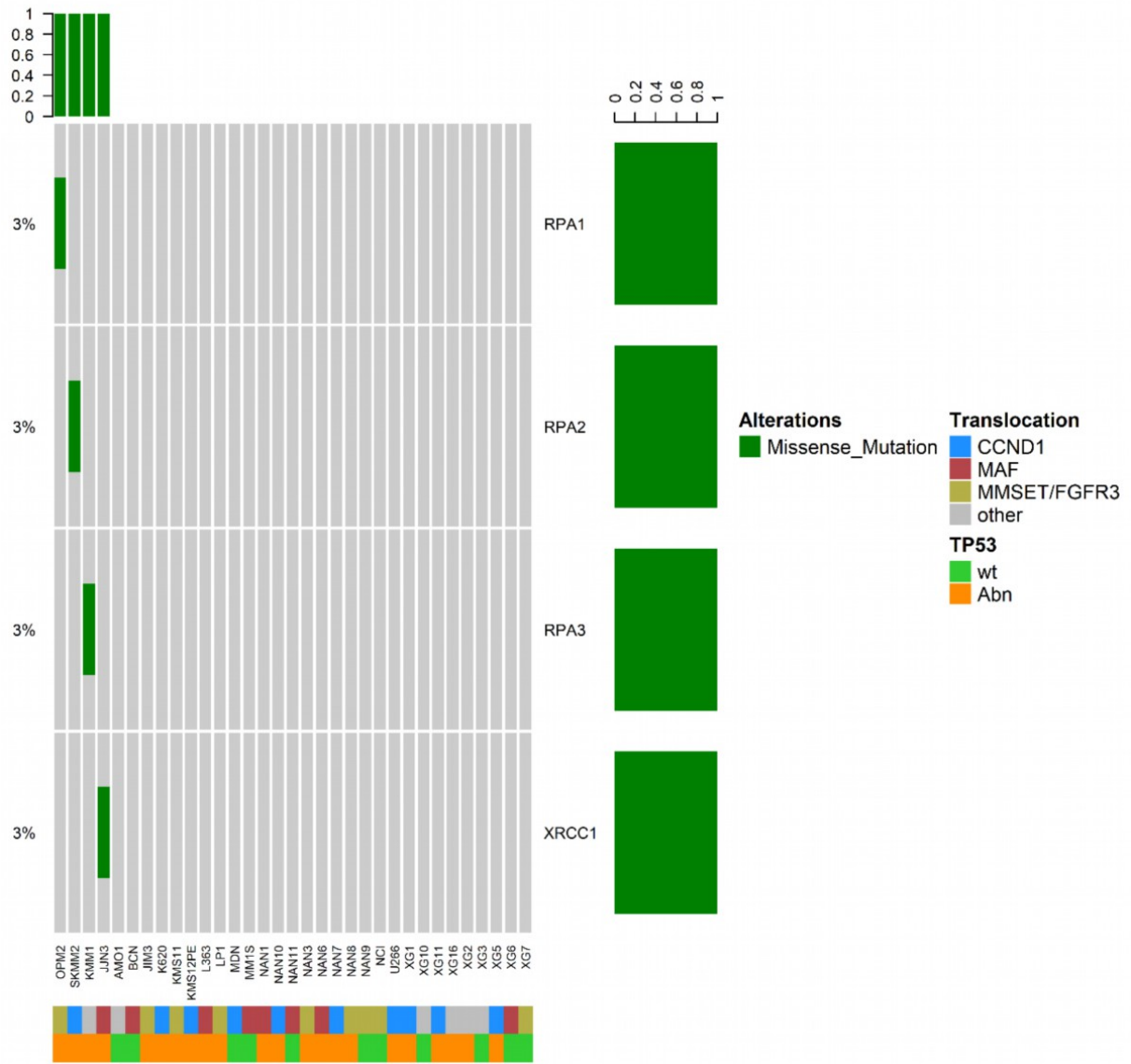


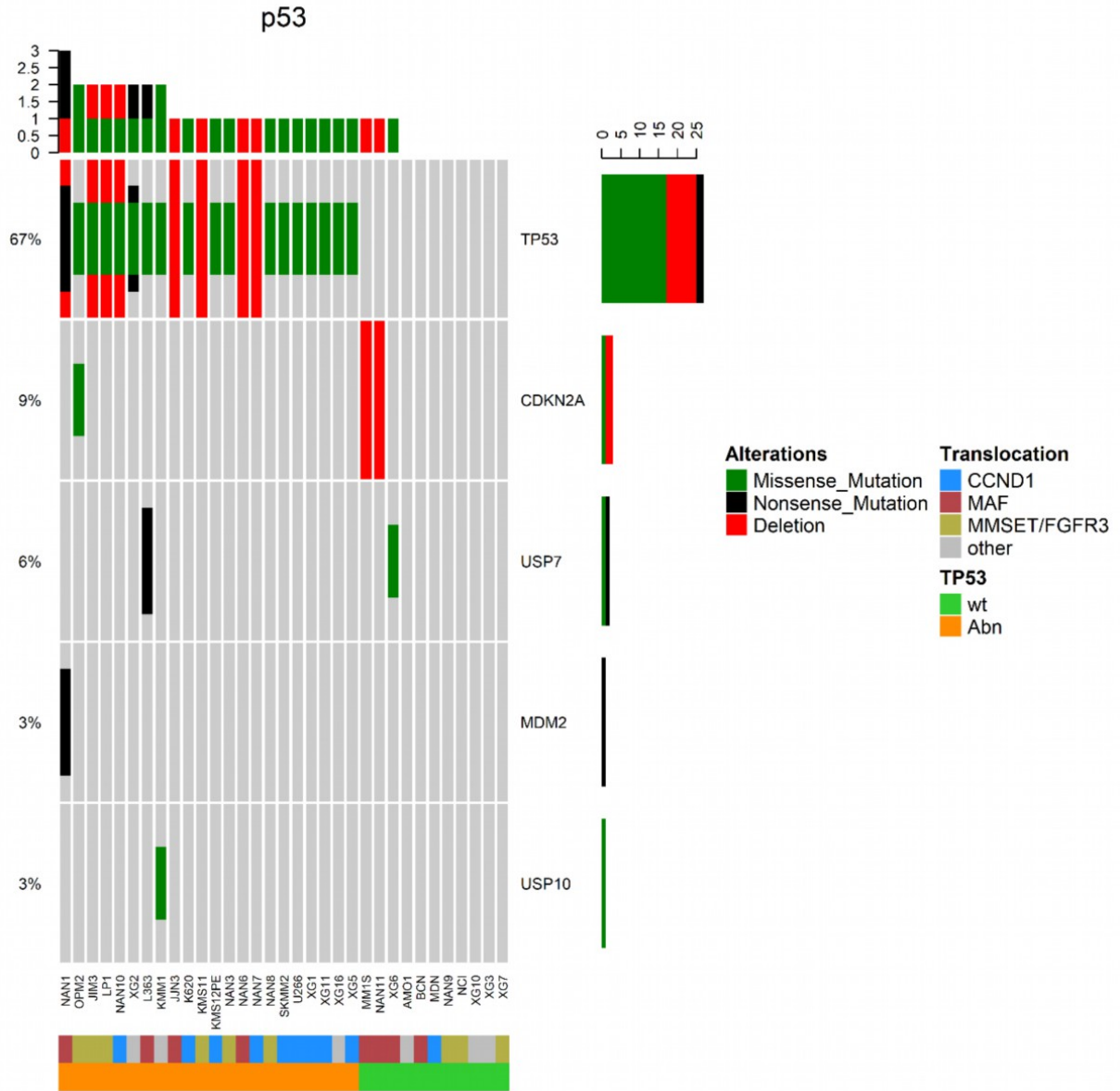


NFKB

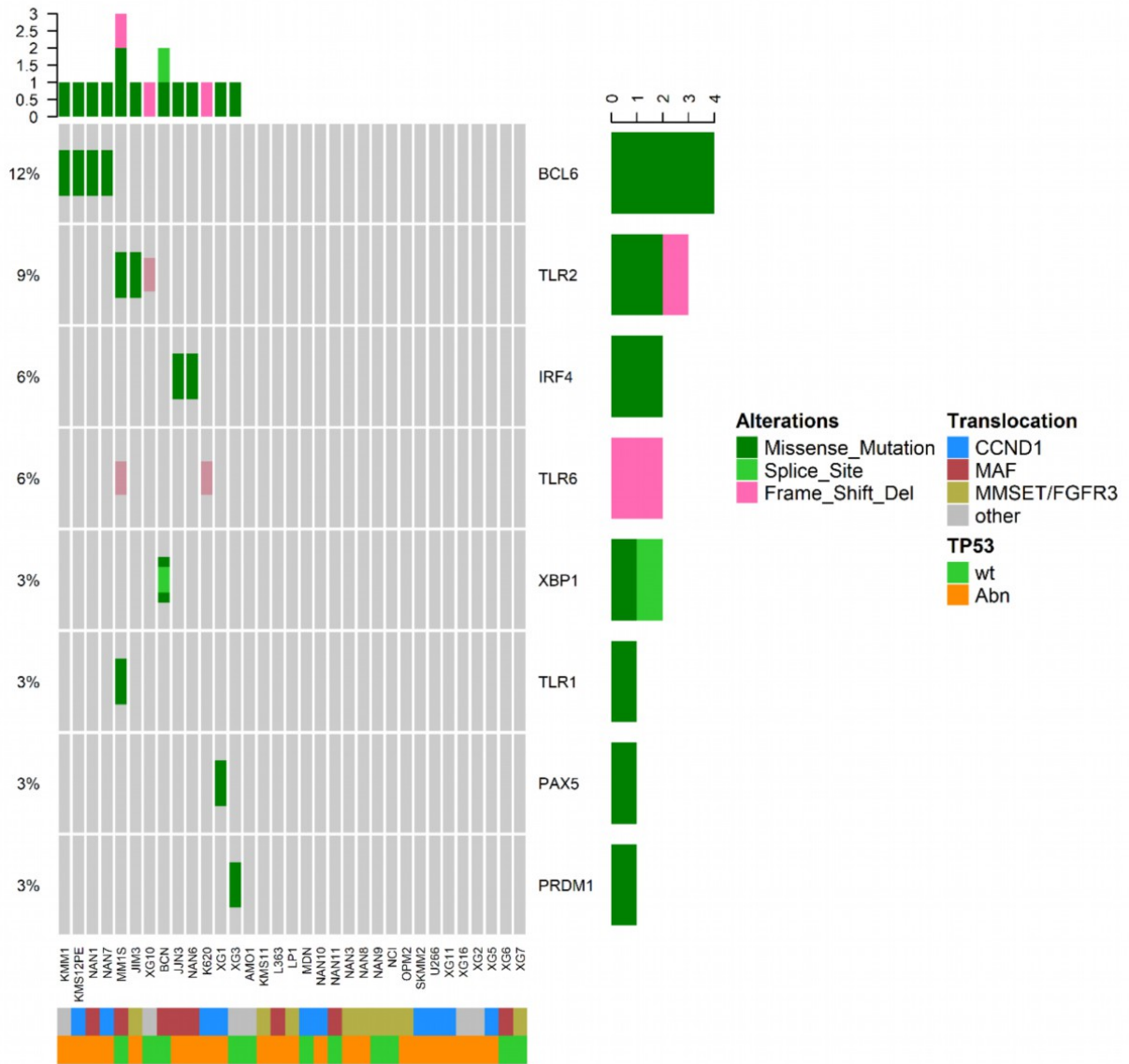


NHEJ





PlasmaCell





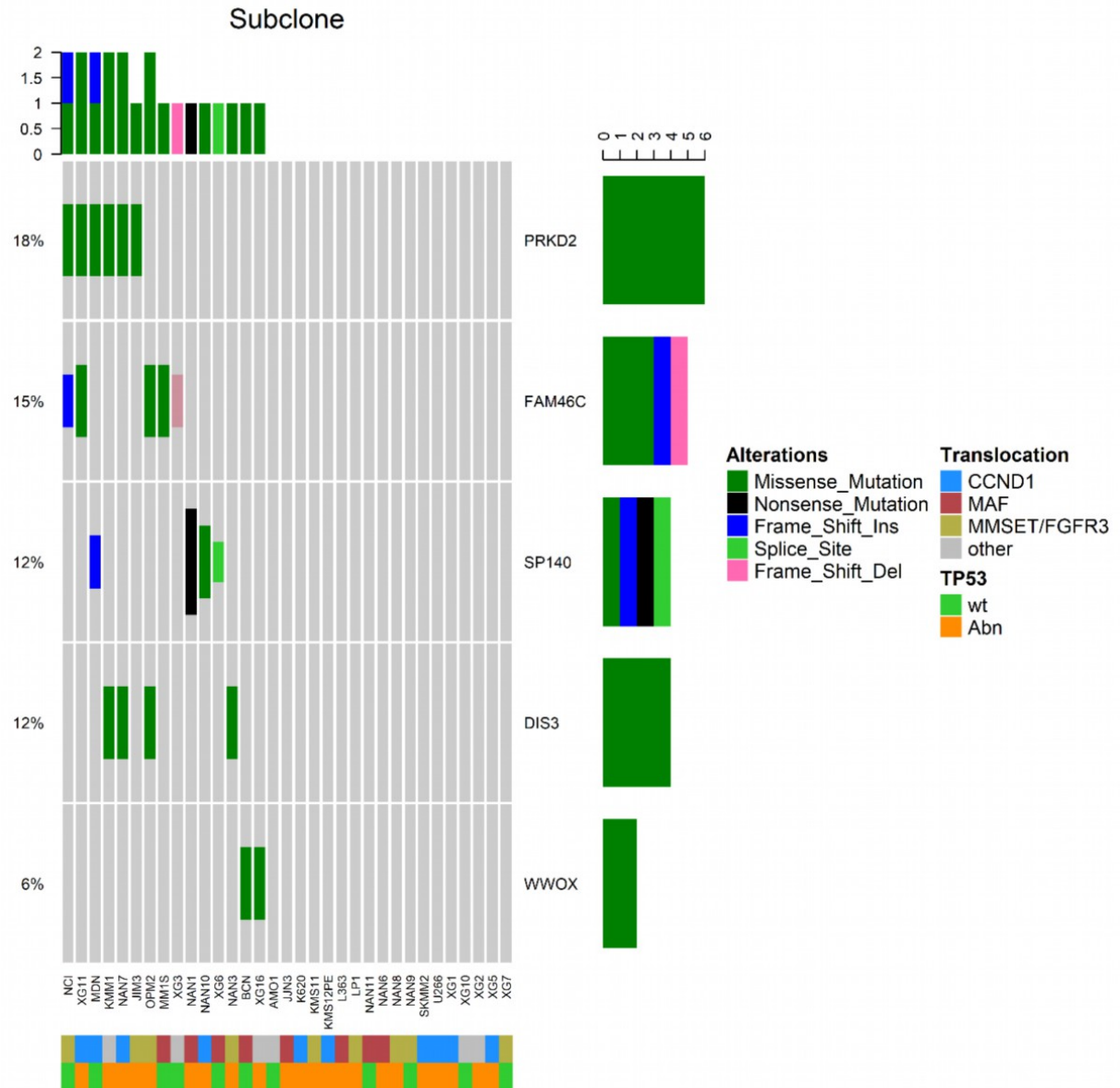


Figure S10

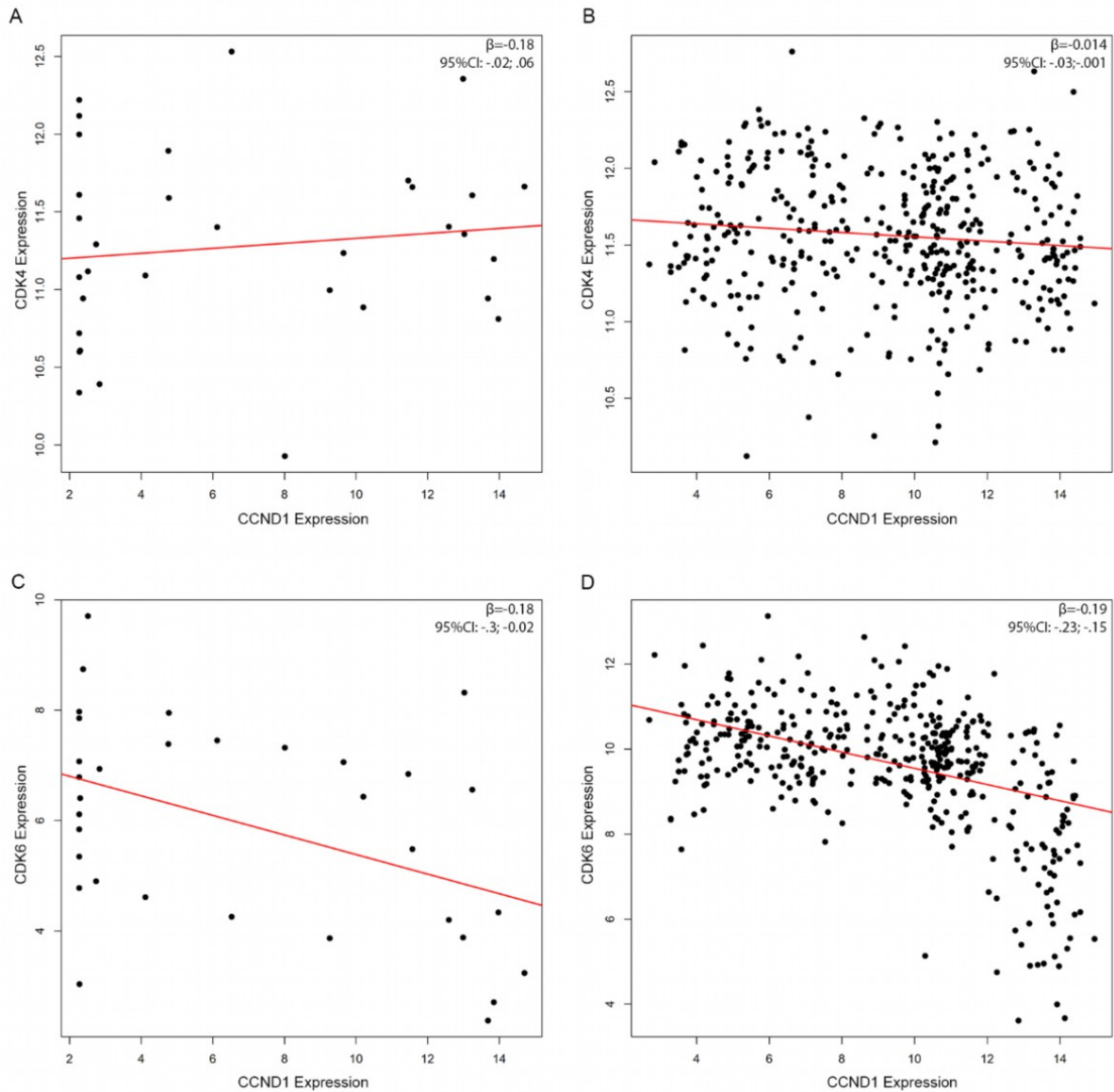


Figure S10: CDK4 expression according to CCND1 expression in HMCLs (A) and Myeloma patients (B). CDK6 Expression according to CCND1 expression in HMCLs (C) and Myeloma patients (D). Robust linear regression is displayed; regression line was drawn according to coefficients obtained after 5000 bootstrapped replicates. Only significant associations of tested drugs with the pathways of interest are displayed.

Supplementary references

- 1 Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D *et al.* A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011; **96**: 574-582.
- 2 Lim WK, Wang K, Lefebvre C, Califano A. Comparative analysis of microarray normalization procedures: effects on reverse engineering gene networks. *Bioinforma Oxf Engl*2007; **23**: i282-288.
- 3 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: e47.
- 4 Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods San Diego Calif*2003; **31**: 265-273.
- 5 Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*2010; **26**: 589-595.
- 6 Love MI, Myšičková A, Sun R, Kalscheuer V, Vingron M, Haas SA. Modeling read counts for CNV detection in exome sequencing data. *Stat Appl Genet Mol Biol*2011; **10**. doi:10.2202/1544-6115.1732.
- 7 Backenroth D, Homsy J, Murillo LR, Glessner J, Lin E, Brueckner M *et al.* CANOES: detecting rare copy number variants from whole exome sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: e97.
- 8 Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 2011. doi:10.1038/nbt.1754.
- 9 Surget S, Lemieux-Blanchard E, Maïga S, Descamps G, Le Gouill S, Moreau P *et al.* Bendamustine and melphalan kill myeloma cells similarly through reactive oxygen species production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**: 2165-2173.
- 10 Mayakonda A, Koeffler HP. Maftools: Efficient analysis, visualization and summarization of MAF files from large-scale cohort based cancer studies. *bioRxiv* 2016; : 052662.
- 11 Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 2020-2028.
- 12 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; **500**: 415-421.
- 13 Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, Giagounidis A, Porta MGD, Jädersten M *et al.* Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* 2015; **6**: 5901.

Mise à jour des données de PRIMA-1^{Met} dans le MM

Au cours de mon Master 2, nous avons évalué l'efficacité de PRIMA-1^{Met} dans le MM, et publié ces résultats (Tessoulin et al., 2014)(article 3 en Annexe).

Les principaux résultats de notre étude sur PRIMA-1^{Met} étaient les suivants :

- La sensibilité à PRIMA-1^{Met} était hétérogène au sein des HMCLs, et cette sensibilité n'était pas corrélée au statut p53 des HMCLs.
- L'utilisation de PRIMA-1^{Met} n'était pas associée à la surexpression des cibles de p53 (p21 ou TNFRSF10B) mais augmentait l'expression de Noxa.
- L'extinction stable de p53 dans les lignées de MM (p53^{wt}, p53^{R282W}) ne modifiait pas la sensibilité à PRIMA-1^{Met}.
- La sensibilité à PRIMA-1^{Met} était associée à une majoration des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à une chute du taux intracellulaire de glutathion. Cette perte de glutathion total sans apparition de glutathion oxydé détecté était en faveur d'une séquestration directe par Prima-1^{Met} (et non pas d'une simple oxydation).
- L'utilisation de la N-Acétyl-Cystéine ou de Glutathion inhibait la cytotoxicité de PRIMA-1^{Met}, tandis que l'association avec le L-Buthionine Sulfoximine (inhibiteur irréversible de la γ -glutamylcystéine synthase, γ -GCS) était associée à un effet synergique majeur dans les HMCLs, les cellules primaires de patients et les xénogreffes tumorales.

Au total, nous démontrions dans le MM que la sensibilité à PRIMA-1^{Met} n'était probablement pas liée à une réactivation de p53 (PRIMA-1^{Met} était efficace dans les cellules p53^{KO}, p53^{Non-exprimé}, ou p53^{wt}), et que son efficacité était associée à un déséquilibre de la balance oxydo-réductive (possiblement par séquestration du glutathion).

Cependant, le mécanisme de mort n'était pas connu et nous n'avions pas identifié de cible intracellulaire. Un article publié par Peng en 2013, évoquait également ce lien avec les espèces réactives de l'oxygène *via* une interaction avec la Thioredoxin Reductase-1 (TXNRD1) (Peng et al., 2013).

Compte-tenu de ce lien décrit avec la TXNRD-1, nous avons travaillé sur PRIMA-1^{Met} et l'Auranofin (inhibiteur de TXNRD-1) pour améliorer la compréhension que nous avons de PRIMA-1^{Met}.

L'auranofin et PRIMA-1^{Met} présentent un même profil de cytotoxicité dans les HMCLs et les cellules primaires de patients

La sensibilité à PRIMA-1^{Met} et l'auranofin sont corrélées dans les HMCLs ($\beta=7.34$, 95%CI=0.7-15), cependant de nombreuses lignées sont en dehors de la zone de régression. La corrélation au sein des cellules primaires de patients est positive, bien que le faible nombre d'échantillons ne permette pas d'atteindre un seuil statistiquement significatif ($p=0.1$), Figure 1A-B.

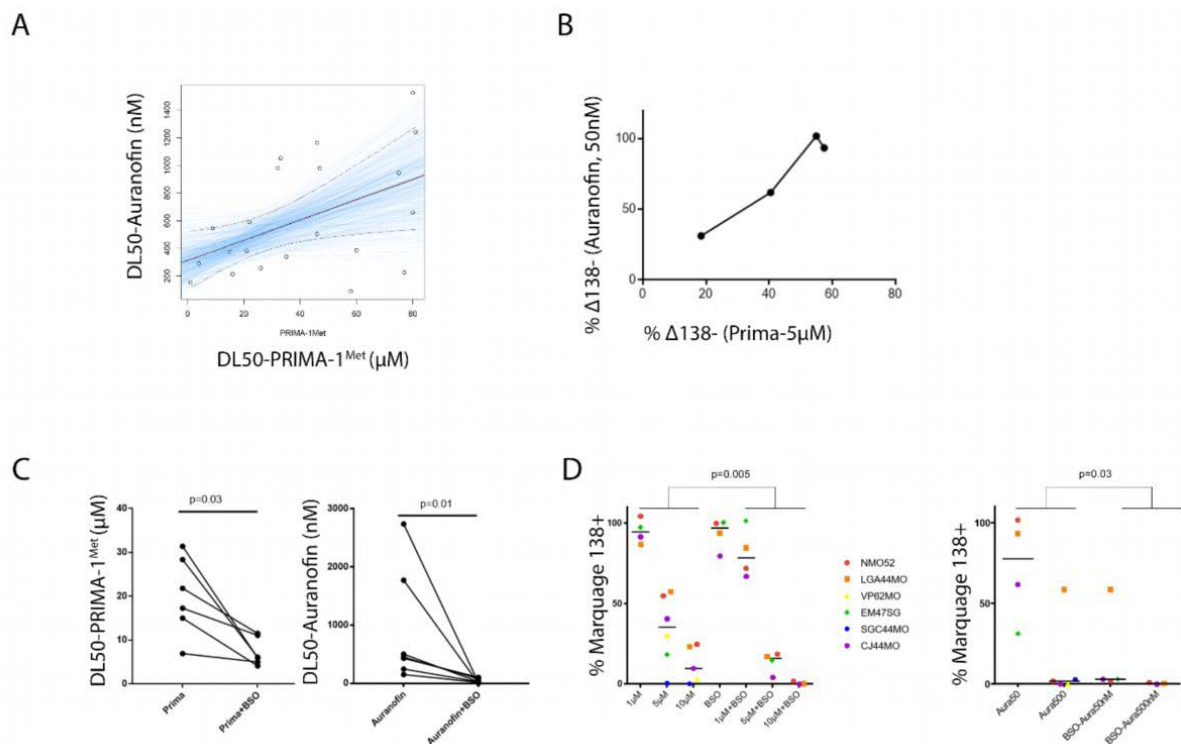


Figure 1. Lien entre sensibilité à PRIMA-1^{Met} et Auranofin dans les HMCLs et cellules primaires de patients. A. Corrélation entre DL50 de PRIMA-1^{Met} et Auranofin. Les lignes bleues représentent 1000 régressions linéaires robustes, issues du bootstrap des échantillons et leur enveloppe à 95% (ligne pointillée). B. Corrélation entre le taux de mort à Prima-1^{Met} et l'Auranofin dans les échantillons primaires de patients. C. Synergie du BSO avec Prima-1^{Met} et l'auranofin dans les HMCLs. D. Synergie du BSO avec Prima-1^{Met} et l'auranofin dans les cellules primaires de patients. DL50 : dose létale 50, CD138+ : la perte du CD138 est corrélée à la mort des plasmocytes.

Afin de valider le rôle de l'auranofin, nous l'avons combinée au L-Buthionine Sulfoximine (BSO), inhibiteur irréversible de la γ -GCS, qui permet la synthèse du glutathion à partir du glutamate. De la même façon que PRIMA-1^{Met}, l'auranofin présente une forte synergie avec le BSO dans les HCMLs ($p=0.01$) et les cellules primaires de patients ($p=0.03$), Figure 1C-D.

La mort induite par PRIMA-1^{Met} et l'Auranofin est Bax/Bak indépendante

Afin d'étudier la mort induite par ces deux molécules, nous avons utilisé deux modèles: une extinction transitoire par siRNA de Bax et de Bak dans 2 HCMLs sensibles à PRIMA-1^{Met} (OPM2 : *TP53*^{R175H} et LP1 : *TP53*^{E286K}) et dans une lignée rendue résistante à l'ABT-199, l'inhibiteur spécifique de BCL-2 (XG5^{ABT-R}). Cette dernière lignée a été obtenue par exposition continue à des doses croissantes d'ABT-199 et est caractérisée par une perte de Bax/Bak et une diminution de la sensibilité aux alkylants et aux inhibiteurs du protéasome (Dousset et al., 2016). La mise sous silence de Bax/ou Bak n'a pas d'impact sur la sensibilité à PRIMA-1^{Met} (OPM2/LP1) ou à l'auranofin (LP1), Figure 2-A. De la même façon, la sensibilité de la lignée parentale XG5^{ABT-S} est superposable à celle de la lignée dérivée XG5^{ABT-R}, avec l'Auranofin et PRIMA-1^{Met}, Figure 2-B.

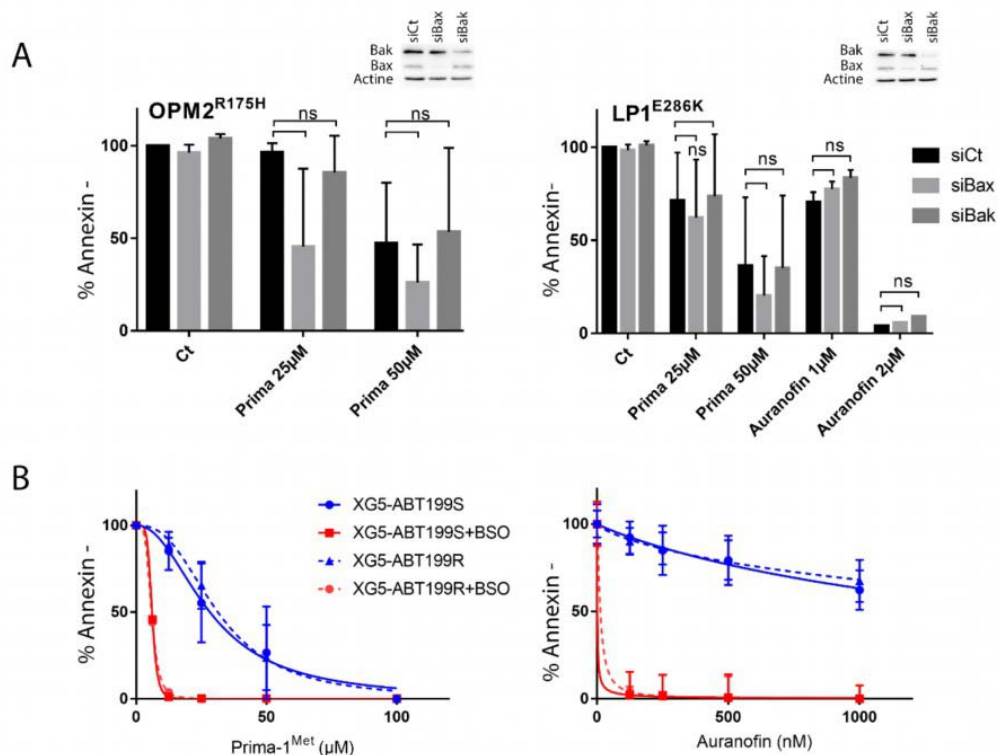


Figure 2. La mort induite par PRIMA-1^{Met} et l'auranofin est Bax/Bak indépendante. A : incubation 24H par siRNA, puis 48H de traitement. Les Western-blots, représentatifs, sont fournis. B. Les lignées XG5^{ABT-S} (ligne pleine) et XG5^{ABT-R} (ligne pointillée) ont été traitées 48H par l'association PRIMA-1^{Met} ou Auranofin avec (rouge) ou sans BSO (bleu, 250µM).

La mort induite par PRIMA-1^{Met} est majoritairement caspase-dépendante

L'absence de dépendance à la dépolarisation mitochondriale induite par les BH3-activateurs Bax et/ou Bak est commune à l'Auranofin et à PRIMA-1^{Met}. L'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase Z-VAD n'a aucun effet sur la sensibilité à l'auranofin (p=1). Cependant, l'utilisation du Z-VAD sur les lignées de MM traitées par Prima-1^{Met} est associée à la diminution de la toxicité dans la majorité des lignées (p=0.001), de façon hétérogène, Figure 3. Dans les lignées XG5^{ABTS} et XG5^{ABTR}, le Z-VAD permet l'inhibition de la mort induite par Prima-1^{Met}.

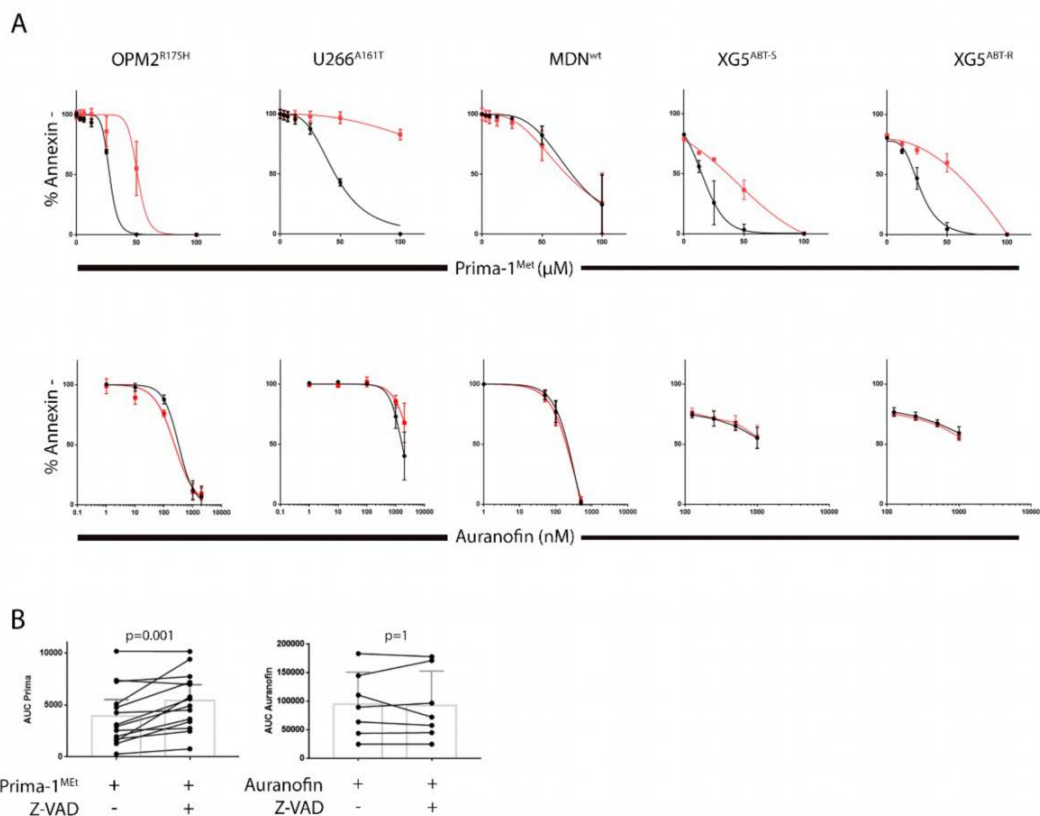


Figure 3. L'efficacité de PRIMA-1^{Met} est partiellement dépendante de l'activation des caspases. A. les cellules sont incubées 1H avec le Z-VAD (ligne rouge), puis 48H avec des doses croissantes de PRIMA-1^{Met} ou d'Auranofin. B : les aires sous la courbe ont été quantifiées pour comparer la sensibilité (n=14 HMCLs pour PRIMA et n=7 HMCLs pour Auranofin). Wilcoxon pour données appariées.

Conclusion des travaux sur Prima-1^{Met}

Au terme de ces différentes manipulations, les résultats obtenus avec l'auranofin ne nous permettaient pas d'améliorer la compréhension des résultats de Prima-1^{Met}. En effet, la mort induite par Prima-1^{Met} était dépendante des caspases et hétérogène, mais cette dépendance n'était pas observée pour l'auranofin. De façon encore plus étonnante, la mort induite par Prima-1^{Met}, bien que liée aux caspases, n'était pas due à un processus apoptotique intrinsèque lié à Bax ou Bak. Concernant ces derniers résultats il est possible que les extinctions de Bax et Bak aient été insuffisantes, cependant, la lignée XG5^{ABTR}, invalidée pour ces BH3 effecteurs, venait conforter nos résultats obtenus par extinction. Cette mort cellulaire, dépendante des caspases mais indépendante de la dépolarisation mitochondriale induite par les effecteurs apoptotiques Bax/Bak, nous orientait vers un mécanisme d'apoptose extrinsèque ou de disruption membranaire mitochondriale directe, potentiellement induite par les ROS.

Alors que nous poursuivions nos investigations (mise en évidence du relargage du cytochrome-c, inhibition de l'apoptose extrinsèque), David Liu a publié en mars 2017 les résultats d'une étude qui confirmait l'induction de ROS par PRIMA-1^{Met}, et la baisse du glutathion intra-cellulaire réduit. Cette réduction, interaction directe entre PRIMA-1^{Met} et le glutathion, empêche le recyclage de ce dernier (Figure 4). Par microscopie électronique et marquage d'un acide gras rapporteur, l'équipe démontre une lipo-peroxydation intra-mitochondriale majeure, à l'origine de la perte d'intégrité membranaire mitochondriale, du relargage de cytochrome-c et de la mort cellulaire. L'inhibition de ce processus de lipo-peroxydation restaure la viabilité cellulaire. Il met également en évidence que l'expression d'un échangeur Cystéine/Glutamine (SLC7A11), sous la dépendance de Nrf2 est diminuée dans les mutants *TP53*, par séquestration de Nrf2 par la protéine mutée. Cet échangeur est essentiel à la synthèse endogène de glutathion et sa privation entraîne la mort cellulaire lors de l'utilisation de Prima-1^{Met}. La démonstration biologique est menée dans des lignées de carcinome épidermoïde œsophagien (*TP53^{Mut}* dans 10 lignées sur 11)(Liu et al., 2017).

Dans cet article, les données de génomique publiques (NCI-60) mettaient en évidence une corrélation entre la sensibilité à PRIMA-1^{Met} et le niveau d'expression de SLC7A11, nous confirmons ce lien statistique dans nos lignées ($\beta=0.14$, 95%CI=0.03-0.22). En

revanche, nous ne trouvons pas de lien entre les niveaux de *SLC7A11* ou *NFE2L2* et le statut *TP53* dans nos données ($p=0.45$ et 0.7 , respectivement, *kruskal-wallis*).

L'exploitation de bases de données plus vastes, en particulier avec plus de lignées par histologies peut nous permettre d'analyser plus finement certains résultats. Les données suivantes sont calculées à partir de la base « Cancer Therapeutics Response Portal » du Broad Institute *via* le portail « CellMinerCDB » (Rees et al., 2016; Shankavaram et al., 2009). Si la corrélation entre *SLC7A11* et la sensibilité à Prima-1^{Met} est bien retrouvée ($p < 2.10^{-16}$), les niveaux basaux de *SLC7A11* et *NFE2L2* ne sont pas dépendants du statut *TP53* ($p=0.8$ et 0.9 , respectivement). Le statut *TP53* et la sensibilité à Prima-1^{Met} sont globalement liés, mais de façon inverse à ce qui est habituellement décrit : les lignées les plus sensibles à Prima-1^{Met} sont les lignées sans mutation *TP53* (toutes histologies confondues, $p=0.036$). Ce lien n'est pas retrouvé quand on considère les tumeurs par histologie. Cette différence n'existe pas dans le MM ($p=0.3$), dans le cancer du sein ($p=0.8$), dans l'œsophage ($p=0.6$), même le sous-type squameux (utilisé dans l'article de Liu *et al*) ($p=0.6$), le poumon (par les différents sous-types à grandes cellules ou à petites cellules), ou l'ovaire (par sous-types histologiques). Il existe donc possiblement un biais, qui est retrouvé lorsque l'analyse de la sensibilité à Prima-1^{Met} prend en compte l'histologie (comme facteur d'interaction avec le statut *TP53*). La régression n'identifie plus *TP53* comme un facteur de réponse à Prima-1^{Met} ($p=0.74$). Une dernière analyse de l'utilisation de ces bases démontre une très bonne corrélation entre Prima-1^{Met} et le PX-12, un inhibiteur de la thioredoxin-1 ($r=0.77$, $p=1.10^{-136}$). L'ensemble des éléments des bases de données et de l'article de Liu semblent être en faveur d'un mécanisme p53-indépendant, lié au blocage de la régénération de glutathion et à l'accumulation secondaires d'espèces réactives de l'oxygène.

Au total, cet article nous a contraint à arrêter le travail biologique sur Prima-1^{Met}, puisqu'il répondait à de nombreuses questions que nous nous efforcions d'élucider, et bien que des questions subsistent, les possibilités de publications s'éloignaient. Une de ces questions concerne le rôle de Noxa, la mise sous silence de Noxa dans notre modèle réduisait drastiquement la mort induite par Prima-1^{Met}.

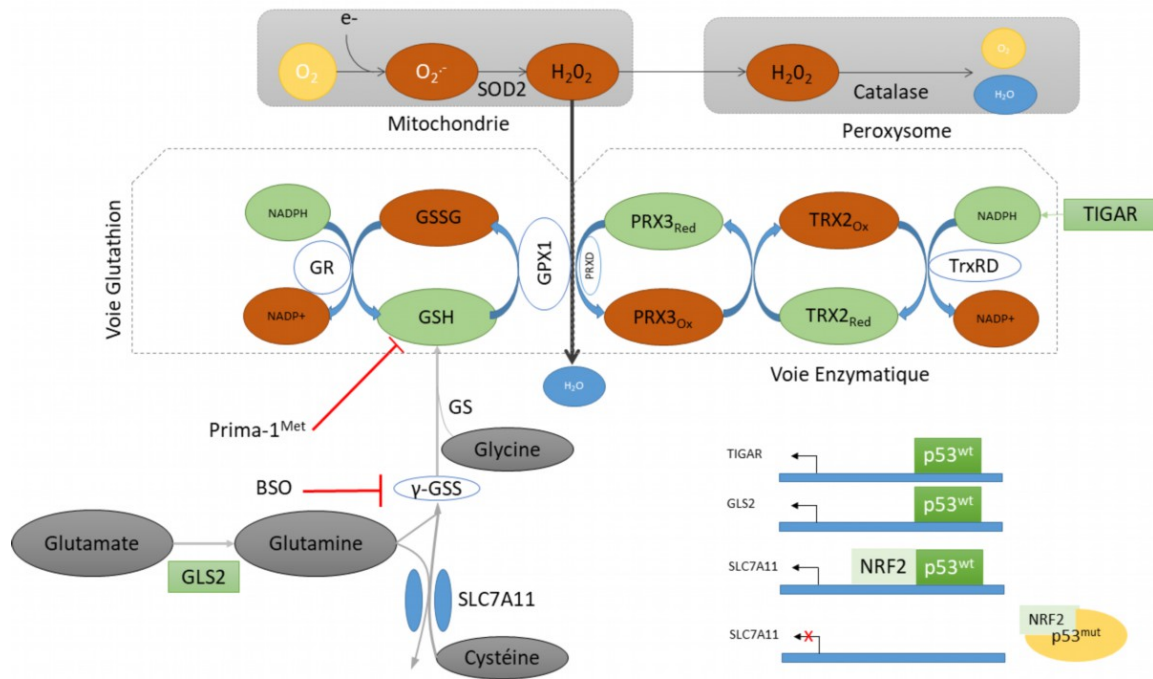


Figure 4. Mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène. SOD2 : Superoxyde dismutase 2, GSH : Glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GPX1 : Glutathion peroxydase, PRXD : peroxidase, TRX : Thioredoxin. TrxRD : Thioredoxin Reductase. TIGAR : TP53-Induced Glycolysis And Apoptosis Regulator, GS: Glutathion Synthase, γ GSS: γ -Glutamyl-cystéine-synthase. BSO: Buthionine Sulfoximine, GLS2: Glutaminase 2.

L'apport du chaînon manquant entre une mort caspase dépendante mais Bax/Bak indépendante nous semble particulièrement intéressante d'un point de vue thérapeutique, *via* la disruption membranaire mitochondriale. Nous continuons de penser que l'action de Prima-1^{Met} doit aussi s'exercer sur un autre point de contrôle/production des ROS, en effet nous avons vu dans notre article et dans celui de David Liu que l'inhibition de la γ -GSS (*via* le BSO) ou du SLC7A11 bloquaient la synthèse de glutathion. Hors si ces deux mécanismes effondrent le taux de glutathion réduit, ils ne permettent pas la génération de ROS ni la mort cellulaire (à court terme), contrairement à Prima-1^{Met}. L'interaction de Prima-1^{Met} avec des résidus cystéines est connu depuis la première description de la molécule et son rôle sur le glutathion est donc indéniable (Bykov et al., 2002; Lambert et al., 2009), mais compte-tenu des mécanismes de détoxification des ROS, nous attendons une activité supplémentaire de Prima-1^{Met} sur l'autre voie de détoxification des ROS, la voie « enzymatique » (liée à la thioredoxine, comme le PX-12), Figure 4. Cette attente est justifiée par la synergie

majeure de Prima-1^{Met} avec l'utilisation du BSO ou l'inhibition de SLC7A11, réalisant une sorte de « double attaque » des systèmes de détoxification des ROS.

Discussion

Au cours de mes 3 années de thèse dans notre laboratoire, nous avons cherché à améliorer notre compréhension et l'annotation de notre modèle de MM.

Au sein des néoplasies, ce modèle cellulaire est particulièrement adapté, entre autres par la récapitulation de la diversité biologique rencontrée chez les patients (en particulier les anomalies cytogénétiques primaires, c-à-d les translocations). Par ailleurs, les HMCLs sont très majoritairement dérivées de patients en échec thérapeutique (après exposition aux alkylants, aux inhibiteurs du protéasome, voire de la radiothérapie), et dérivés de clones extra-médullaires. Elles constituent donc un observatoire particulièrement intéressant des résultats des processus de sélection tumorale chez les patients les plus graves et en impasse thérapeutique. Cependant, bien que leur transcriptome ait été annoté pour la majorité d'entre elles et que certaines lignées aient été séquencées, le génome des HMCLs n'est que peu connu. Le faible nombre de lignées de HMCLs utilisées au cours des développements pharmacologiques *in-vitro* et le manque de rigueur dans l'identification précise des lignées (voire de leur type histologique) sont inquiétantes, pouvant mettre à mal la robustesse des résultats ainsi que leur exportabilité pré-clinique et clinique. En effet, de nombreuses voies concourent à la détermination de la sensibilité tumorale aux drogues utilisées, et la connaissance des mutants sous-jacents nous apparaît essentielle. Des erreurs d'identification de lignées, et l'utilisation de lignées lymphoblastiques transformées par l'EBV (Drexler and Matsuo, 2000; Pellat-Deceunynk et al., 1995) sont encore publiées comme étant du MM (Bolli et al., 2016; Maura et al., 2018).

Le premier article nous a permis de resituer les anomalies de la voie p53 (au diagnostic) au sein des hémopathies lymphoïdes malignes. Le MM ne présente pas fréquemment d'inactivation de p53 au diagnostic, ces dernières s'accumulent au cours des rechutes itératives (Chavan et al., 2017; Weinhold et al., 2016). Une des constatations liées à ce travail était l'importance des mutants de RAS dans le MM, touchant près d'un patient sur deux, et faisant du MM une hémopathie totalement à part (Figure 15).

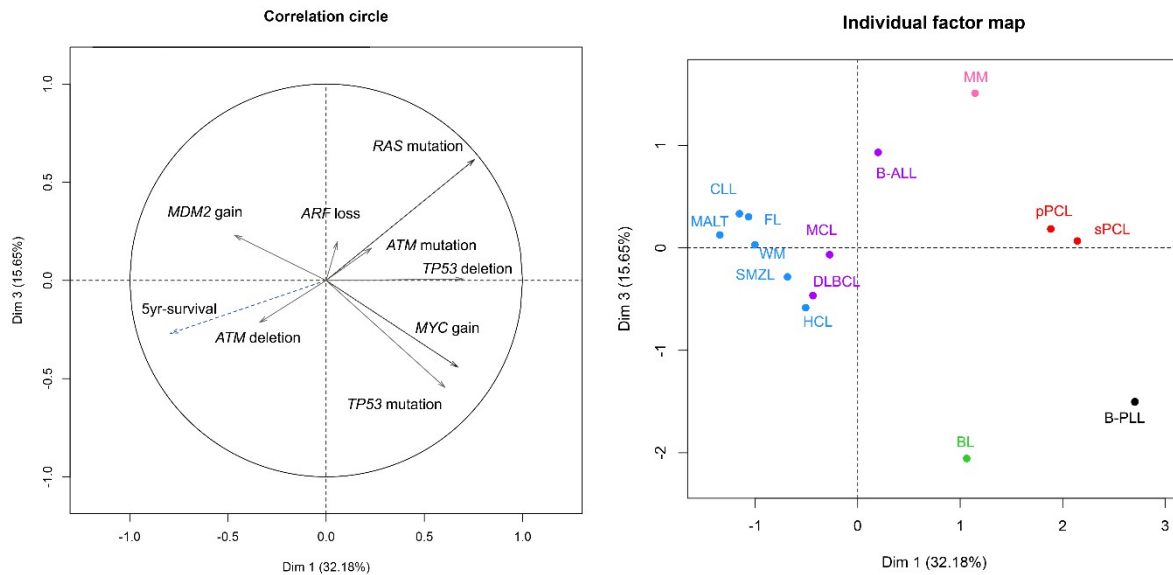


Figure 15. Tirée de la revue p53. Second plan de l'analyse en facteurs multiples, plan de corrélation et plan de projection des individus.

Avec le second article, nous détaillons les anomalies de séquence retrouvées au sein des HMCLs, leurs impacts potentiels et les liens avec d'autres caractéristiques cytogénétiques ou phénotypiques de nos lignées. Nous avons séquencé par capture d'exome 33 de nos HMCLs. La plus grande difficulté -et limite- de ce travail (comme tout travail sur lignée) est l'absence de matériel génomique germlinal, potentiellement à l'origine de faux-positifs. En effet, ces lignées ont été établies sur plus de 50 ans et sur 3 continents différents avec des bruits de fonds ethniques (polymorphismes) qu'il a fallu prendre en compte. La non-prise en compte de ce bruit de fond conduisant à une sur-estimation du nombre de variants dans les HMCLs (à part 2 lignées, l'ensemble des HMCLs présente moins de 600 variants). Par exemple, AMO1 et OPM2, deux lignées d'origine japonaise, sont annotées dans un article récent avec plus de 1300 variants non-synonymes chacune, contre 476 et 496, respectivement, dans notre étude (Maura et al., 2018). Une autre difficulté majeure de sélection des variants réside dans la prédiction protéique des variants codants: les variants dont l'impact prévisible le plus fort sur la protéine sont les insertion/deletion associés ou non à un décalage, ou les codons STOP prématurés, tandis que les faux-sens et mutants d'épissage sont plus difficile à prédire. Après utilisation de nombreux algorithmes de prédiction (dont certains non présentés dans le fichier MAF) nous avons abandonné leur utilisation au vu du faible recouvrement de leurs prédictions.

Nos résultats nous montrent que les HMCLs présentent deux sortes d'anomalies : des anomalies « primaires » ou fixes, qui ne s'enrichissent pas depuis le stade diagnostic jusqu'au stade HMCL (*KRAS*) ; et des anomalies secondaires, nombreuses, qui se concentrent fortement dans les HMCLs (en particulier *TP53*). Les dérégulations de la voie p53, et particulièrement les mutants et délétions/pertes d'expression de *TP53* sont l'évènement le plus fréquent au sein des HMCLs (67%), bien au-delà d'un résultat récent qui rapportait un taux de 21%(Bolli et al., 2016). Cette discordance est sans explication, plusieurs lignées étant communes entre nos deux études, avec pour certaines des génotypes *TP53* connus depuis longtemps mais non détectés dans l'étude (*KMS-11^{KO}*, *OPM2^{R175H}*, etc..). Ces chiffres d'anomalie de *TP53* sont cohérentes avec la dernière étude rétrospective portant sur 101 patients sPCL : 46% de délétion du locus sont détectées(Jurczyszyn et al., 2018). Les anomalies de *TP53* dans les HMCLs sont caractérisées par des pertes d'expression dans 6 lignées (par KO pour *KMS-11*, Non-sens pour *Nan-1*, pertes d'exons pour *Nan-6*, et *Nan-7*, perte d'expression de *JJN-3* et *Nan-8* sans explication retrouvée). Au sein des mutants, l'analyse par Seshat (web-API qui analyse les variants *TP53*) a révélé que les variants *TP53* détectés (sauf *D21Y* de *Nan-8*) sont tous pathogènes, Figure 16A(Tikkanen et al., 2018). La lignée L-363 possède un variant *S261T* qui entraîne un non-épissage de l'intron 7. Cet impact est ambigu dans les criblages phénotypiques et la littérature (p53.iarc.fr, R=18). Cette lignée présente une résistance à la Nutlin-3a, un inhibiteur spécifique de MDM2, ainsi qu'une résistance au melphalan et à la bendamustine, ce mutant est considéré pathogène dans notre modèle. Une anomalie détectée par le WES mais difficile à détecter par d'autres techniques (en particulier la FISH) est la perte de trois exons (7-8-9) par la lignée *Nan6* (Figure 16B). Par ailleurs, avec notre analyse nous n'avons pas détecté de variant silencieux de *TP53* qui aurait pu altérer la stabilité de l'ARNm du gène. D'un point de vue fonctionnel, nous mettons en évidence que les lignées qui présentent des anomalies de la voie p53 présentent une sensibilité moindre aux agents alkylants, ce qui est en accord avec l'impact négatif de la délétion 17p sur la réponse au traitements, même après intensification thérapeutique avec de hautes doses de melphalan(Moreau et al., 2014).

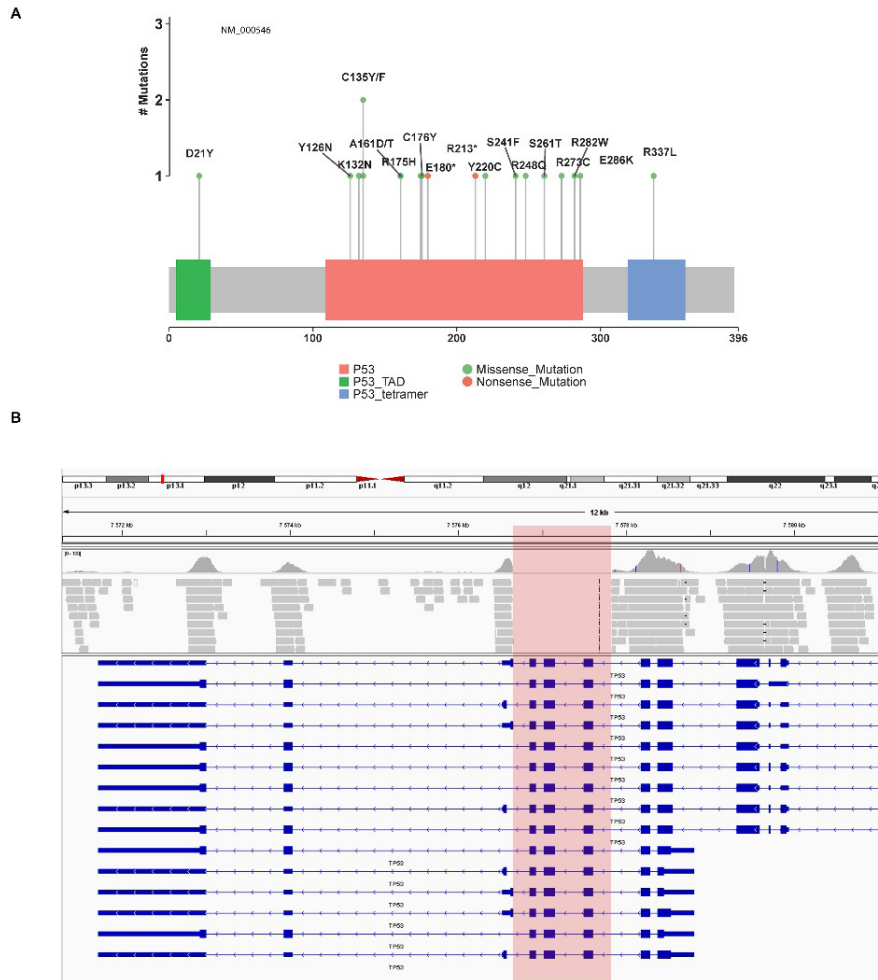


Figure 16. Anomalies de séquences et de structures de TP53 détectés par WES. A : lollipop-plot des variants de de séquence de TP53. B. Sortie IGV : délétion des exons 7-9 de NAN6.

Concernant l'impact transcriptionnel de $TP53^{mut}$, tous les mutants ponctuels ou structuraux ont été confirmés sur l'ARNm de la collection de lignées à notre disposition et dont nous avons le transcriptome, Table 5. En analysant ce transcriptome en fonction des anomalies de p53, nous retrouvons bien une signature « perte de fonction » (sous-expression des cibles transcriptionnelles classiques de p53 : MDM2, Bax, CDKN1A, DDB2, etc...), Figure 17A. En revanche, l'identification d'une sur-expression, qui pourrait être le témoin d'un gain-de-fonction de $p53^{mut}$ ne retrouve que de rares gènes d'intérêt : *MZT1* (Mitotic-spindle organizing protein 1), et *NOL3* (Nuclolar Protein 3), Figure 17B. *NOL3* est sur-exprimé dans les mutants intéressant les boucles d'interaction avec l'ADN vs les autres altérations et vs les lignées sans anomalies de *TP53*. La fonction biologique de *NOL3* est pour l'instant imprécise, il

inhiberait en partie l'apoptose extrinsèque i) en empêchant la formation du death-inducing signaling complex (DISC, formé par l'activation du récepteur FAS), ii) en inhibant directement les caspases 2 et 8, iii) en inhibant directement certains membres de la famille Bcl-2 (Bad, Bax, BBC3)(Kung et al., 2014; Sohn et al., 2016; Wu et al., 2013). Concernant le lien entre p53 et NOL3, ces dernières partageraient la même ubiquitin-ligase MDM2(Foo et al., 2007a).

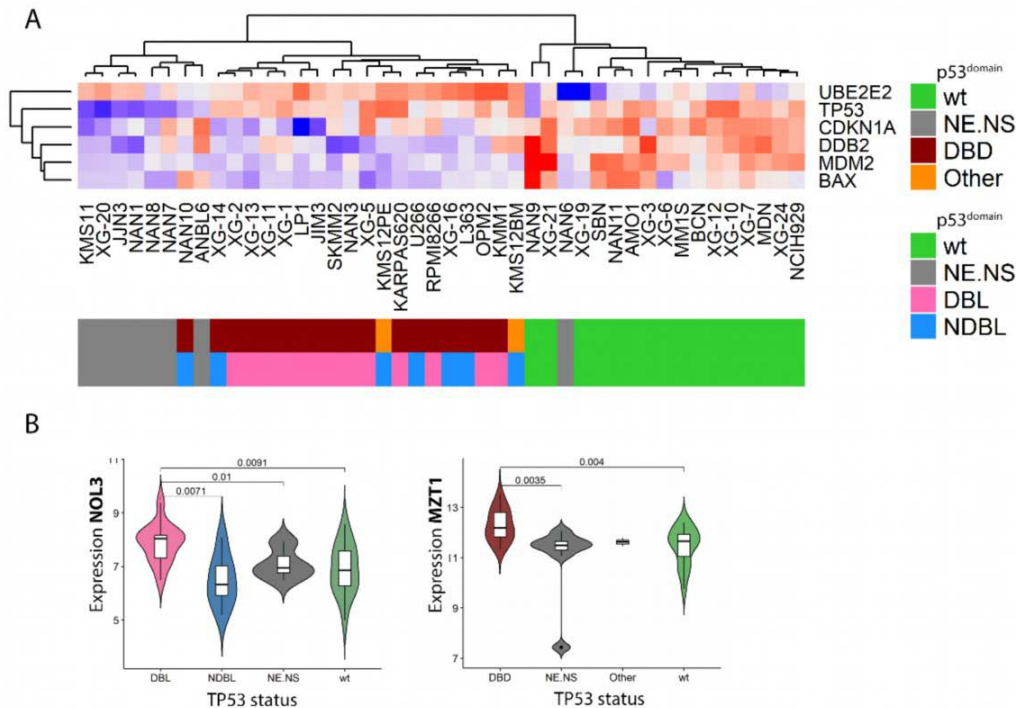


Figure 17. Analyse de l'impact des mutants TP53 sur le transcriptome des HMCLs. A. Perte de fonction de TP53. Deux annotations des mutants sont fournies, selon que le mutant est considéré par sa localisation et son effet abrogeant l'expression ou son atteinte des résidus. B : Expression de NOL3 et MZT1 en fonction des statuts TP53. p-value : ajustée sur le nombre de comparaisons, test de wilcoxon. DBD : mutants faux sens dans le DNA Binding Domain, NE.NS : Non Exprimé ou Non Sens, Other : mutant faux sens ou splice hors du DBD. DBL : mutant faux sens dans les boucles de liaison à l'ADN. NDBL : mutants faux sens en dehors des boucles de liaison à l'ADN.

Cependant, des données contradictoires sont retrouvées dans la littérature, en effet en 2007 une équipe décrit NOL3 (protéine ARC) comme un régulateur négatif de p53, tandis qu'une sonde équipe conclut que NOL3 est une cible du programme transcriptionnel réprimé par p53 sauvage dans un modèle d'hypoxie, sans que le mécanisme de répression ne soit décrit(Foo et al., 2007b; Li et al., 2008). En revanche, le mécanisme de répression du gène MZT1 par le complexe p53-dépendant DREAM

est lui bien compris(Engeland, 2018). Dans notre modèle d'HMCLs, ce gène est sur-exprimé dans les lignées qui possèdent un mutant dans le DBD vs toutes les autres lignées. Le niveau basal des *TP53^{wt}* est équivalent à celui des lignées mutées en dehors du DBD ou non exprimées/tronquées. Compte-tenu du mécanisme de régulation, on aurait attendu un niveau basal plus faible dans les *TP53^{wt}*, mais il est probable que cette différence ne soit visible que sous stress (avec la Nutlin-3a ou un dommage à l'ADN par exemple). La protéine « Mozart-1 » (gène *MZT1*) est essentielle à la nucléation des μ tubules, et à la formation du fuseau mitotique(Cota et al., 2017; Masuda et al., 2013). La spécificité de cette up-régulation de *MZT1* dans les lignées qui portent un mutant dans le DBD est à confirmer, compte-tenu de sa régulation négative par p21/DREAM. Il s'agit possiblement d'un artifice statistique. Ces deux gènes, *NOL3* et *MZT1* pourraient être validés par une approche double : la suppression du mutant p53^{DBD/DBL} (via siRNA ou Crisper) et la transfection/génération d'un mutant p53^{DBD} spécifique dans des lignées p53^{sauvage}, afin d'étudier les modulations de *NOL3* et *MZT1*.

La dérégulation du cycle-cellulaire est un élément central de la biologie du MM. En effet, la grande majorité des évènements cytogénétiques primaires s'accompagne d'une sur-expression des gènes des cyclines D (CCND1, CCND2, CCND3)(Zhan et al., 2006). Alors que les atteintes directes du locus de *CDKN2A* sont rares dans le MM (en dehors d'hyper-méthylations du promoteur), nous mettons en évidence que *CDKN2A* est perdu dans 2 lignées et qu'une 3^{ème} lignée possède un mutant hot-spot (10%). Cette modulation du cycle via *CDKN2A* se fait au travers du 2^{ème} transcrite du locus: p16^{INK4a} (Inhibitor of CDK4), un inhibiteur de l'interaction entre les cyclines et les kinases-dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6. Un dernier acteur de la même famille fortement invalidé dans les HMCLs est *CDKN2C* (p18^{INK4c}, 33% de délétions dans les HMCLs), contrairement aux patients en rechute (~5%, table 3). Cette invalidation ressemble à un « lâcher » du frein du cycle ancestral : en effet, l'action de p18^{INK4c} est indispensable à la génération des plasmocytes sains, via son action inhibitrice de CDK6, et l'arrêt du cycle(Tourigny et al., 2002). Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre les anomalies du cycle et la sensibilité à certains traitements, probablement par manque de contraste dans les activateurs du cycle (dérégulation des cyclines dans presque toutes les lignées) et manque de contraste dans les régulateurs du cycle (plus d'une lignée sur deux atteinte pour *CDKN2A*, *CDKN2C*, ou

RB1). Nous avons cependant démontré que dans les lignées qui exprimaient *RB1*, seules les HMCLs exprimant la *CCND1* semblent pouvoir répondre à l'inhibiteur des CDK4-6 (palbociclib). De façon étonnante, l'essai clinique évaluant l'efficacité du palbociclib et du bortezomib a montré de très bons résultats biologiques (inhibition de la phosphorylation de Rb dans 80% des patients) qui contrastaient avec une faible efficacité clinique (20% de réponses), alors que les patients avaient en majorité reçu une seule ligne de traitement. Cette étude avait sélectionné des patients dont les tumeurs exprimaient *RB1*, et il est probable que ces derniers aient eu beaucoup moins d'altérations de régulateurs du cycle que nos lignées (Niesvizky et al., 2015). Il n'y a pas d'explication claire à cette différence entre nos résultats et ceux des patients, en dehors de l'hypothèse, à nouveau d'un manque de contraste dans les réponses au palbociclib dans nos lignées : c-à-d qu'elles répondraient quasiment toutes au palbociclib, avec une propension plus importante à répondre pour les *CCND1*. Paradoxalement, le palbociclib pourrait apporter un plus grand bénéfice clinique chez des patients plus avancés, avec une fraction proliférante plus importante (Baughn et al., 2006).

De plus en plus décrits dans le MM, nous avons confirmé des atteintes très fréquentes des acteurs de l'épigénétique et de la réparation de l'ADN dans les HMCLs (73%). Concernant les anomalies des régulateurs épigénétiques, une étude d'envergure récente a démontré leur présence dès le diagnostic (53%, de façon clonale et sous-clonale), et leur augmentation dans les cohortes de patients en rechute (44% vs 25%, à sets de gènes comparables) (Pawlyn et al., 2016). Cette étude identifiait les gènes de la famille *HIST1H1* comme étant les plus fréquemment mutés (6%, *HIST1H1B-E*). Cette famille de gènes d'histones-linkers est également la plus mutée dans les HMCLs (15%), et est très fréquemment mutée dans le lymphome folliculaire, une autre hémopathie post-GC (Li et al., 2014; Xiao et al., 2012). Ces événements mutationnels sont le plus souvent clonaux chez les patients et pourraient donc jouer un rôle dans la pathogenèse (Pawlyn et al., 2016). Concernant l'enrichissement à la rechute, il touche surtout les histones méthyl-transférases (16% vs 7%, 27% dans les HMCLs) et les enzymes modifiant la méthylation de l'ADN (8% vs 2%, 24% dans les HMCLs). Ces deux familles de gènes sont associées à des survies diminuées lorsqu'elles sont atteintes par des mutations (Pawlyn et al., 2016). L'ensemble des données souligne que de nouvelles stratégies tirant partie de ces anomalies, et qui sont déjà utilisées

dans les autres hémopathies lymphoïdes et myéloïdes (hypométhylants, inhibiteurs d'EZH2, etc...) pourraient être envisagées dans le MM. L'équipe de Keats a démontré avec modèle isogénique (*KDM6A*^{-/-}) que l'utilisation d'un inhibiteur d'EZH2 est plus efficace dans le modèle déficient par rapport au modèle sauvage, cependant les marques d'histone (en particulier la tri-méthylation H3K27) sont dépendantes d'autres acteurs et que le statut *KDM6A* n'est pas le seul déterminant de la réponse (Alzrigat et al., 2016; Ezponda et al., 2017; Herviou et al., 2016). Ce qui est une bonne nouvelle pour les patients, compte-tenu de la rareté des mutants *KDM6A* (et de l'absence de mutants EZH2) dans le MM et les HMCLs (Pawlyn et al., 2016, 2017b). Ces stratégies pourraient venir compléter ou plutôt concurrencer les inhibiteurs d'histones dé-acétylases (vorinostat, pinnobinostat) dont l'efficacité clinique est modérée, surtout au regard d'un profil de toxicité assez peu favorable (San-Miguel et al., 2016).

Enfin, les anomalies touchant les protéines de réparation des dommages à l'ADN sont un champ d'investigation relativement récent dans le MM. Il avait été démontré qu'ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related), était un acteur important dans la survie de certaines HMCLs qui présentaient un stress réplicatif intense (Cottini et al., 2015). Une étude récente, qui regroupe plus de 1273 patients atteints de MM au diagnostic (issus d'études de différents groupes coopérateurs) rapporte des mutations des gènes de la réparation homologue de l'ADN dans 10.4% des patients, dont le plus fréquent est ATM (3.9%) (Walker et al., 2018). La présence de mutants dans ces gènes de réparation (par exemple, *BRCA1-2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *FANCA-L*, *PALB2*, *RAD50-51*) est associée à une accentuation de la perte d'hétérozygotie (LOH) chez les patients et à une survie moins favorable. Ces phénomènes de LOH se majorent au cours de l'histoire naturelle du myélome, depuis le stade MGUS jusqu'à la rechute (bien que les données présentées soient issues de cohortes non longitudinales) (Pawlyn et al., 2018; Walker et al., 2018). Ces anomalies de la réparation homologue pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques, en particulier par l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérase poly(ADP-ribose), PARP. La PARP-1 est nécessaire au recrutement des acteurs de réparation de l'ADN en cas de cassure simple-brin de l'ADN. L'absence de réparation simple brin est à l'origine de cassures d'ADN double brins, et du dérèglement des fourches de réplication de l'ADN. Il a été démontré que les tumeurs *BRCA1/2* mutées présentaient une déficience de la recombinaison homologue nécessaire à la réparation double brin, et donc une sensibilité accrue aux inhibiteurs

de PARP-1(McCabe et al., 2006). Cette « BRCAness » est actuellement exploitée cliniquement dans les cancers du sein et de l'ovaire mutés pour BRCA1/2, ou qui présentent un profil « LOH », qui résulte de ce défaut de recombinaison homologue. La stratégie thérapeutique utilise les PARP-inhibiteurs en association à des sels de platines ou des alkylants pour favoriser la survenue de ces cassures double-brin(Swisher et al., 2017; Tutt et al., 2010). Au sein des lignées nous avons montré que de nombreux acteurs de la détection des dommages (*ATM*, *ATR*), de leur réparation (homologue ou non) et d'enzymes nécessaires à l'accessibilité chromosomique (hélicases comme *ATRX*, *BLM*, *RECQL4*) sont mutés. Les HMCLs qui présentent le plus d'anomalies de la voie de détection des dommages à l'ADN sont aussi les plus sensibles aux alkylants. A ce jour, de rares données cliniques sur l'utilisation d'inhibiteurs de PARP sont disponibles dans la littérature dont il n'est pas possible de tirer de conclusion d'efficacité(Neri et al., 2012; Soumerai et al., 2017), tandis que les données sur HMCLs sont aussi rares et ont été réalisées sans connaissance des statuts sous-jacents des mutations/anomalies des voies de réparation(Alagpulinsa et al., 2016; Neri et al., 2011). La voie Fanconi nous semble très intéressante dans le MM, mais non-ciblable spécifiquement pour l'instant. Cette voie (qui comprend désormais dans son spectre les protéines BRCA1/2) est un composant majeur de la recombinaison homologue, et en particulier du choix de la recombinaison homologue vs non-homologue (NHEJ)(Ceccaldi et al., 2016). Bien que des mutants soient détectés dans nos HMCLs nous n'avons pas mis en évidence de lien phénotypique. Des données non présentées de Mitomycin-C, qui permettent la formation d'adduits inter-brins et dont la réparation fait intervenir spécifiquement la voie Fanconi, ne sont pas convaincantes. Cette absence de résultat est peut-être dû à notre design expérimental : nous analysons la mort induite par la MitoC, mais plusieurs mécanismes peuvent altérer cette réponse, en particulier sur un fond génique aussi altéré en *TP53* que celui des HMCLs. Nous pourrions analyser les modifications chromosomiques induites par la MitoC, à la recherche de branchements anormaux caractéristiques (fragments radiaux), et avoir recours à un modèle invalidé iso-génique au sein de lignées *TP53^{sauvage}* et *TP53^{Abn}*. Par ailleurs, il n'existe pour l'instant aucun inhibiteur direct de la voie Fanconi, mais l'ubiquitylation/dé-ubiquitylation de FancD2 est un mécanisme majeur de l'activation de cette voie. Ainsi, l'équipe de Kenneth Anderson a mis en évidence l'efficacité d'un inhibiteur d'USP1 (enzyme qui dé-ubiquityle FancD2) sur des lignées de MM. On note que les lignées les moins

sensibles de ce travail (KMS-11 et U266) présentent des mutations de la voie Fanconi dans nos données (Das et al., 2017). Par l'exploitation du transcriptome des HMCLs, ainsi que de bases de données publiques nous mettons en évidence qu'il existe probablement une « addiction » du MM, aux mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier aux acteurs de la voie Fanconi. En effet, lorsque nous intégrons l'ensemble des acteurs de la voie Fanconi, il existe une variation d'expression coordonnée, depuis le stade « plasmocyte sain », à MGUS, puis myélome, myélome proliférant (de moins bon pronostic, défini par Zhan *et al.* (Zhan et al., 2006)) et enfin les HMCLs, Figure 18A. Cette distribution nous permet le calcul d'un « FANC-score », qui est la coordonnée de chaque échantillon sur l'axe de la première composante principale (FANC-score=Dim1). Ce FANC-score est associé à la prolifération cellulaire (évaluée par l'expression de MKI67 et PCNA), aussi bien globalement (Figure 18B), qu'individuellement au sein des sous-groupes de MM, en particulier MF (MAF), MS (MMSET), CD1 (CCND1) et PR (Proliférant), Figure 18C. Ces données d'expression mettent en évidence l'importance de la voie Fanconi (et globalement de la réparation des dommages), et ont été récemment confirmées dans une étude transcriptomique de patients mettant en évidence que la surexpression de certains gènes Fanconi (BRCA1, FANCA, FANCB, FANCC et FANCL) était associée au sous-groupe le plus agressif et défavorable (Laganà et al., 2018).

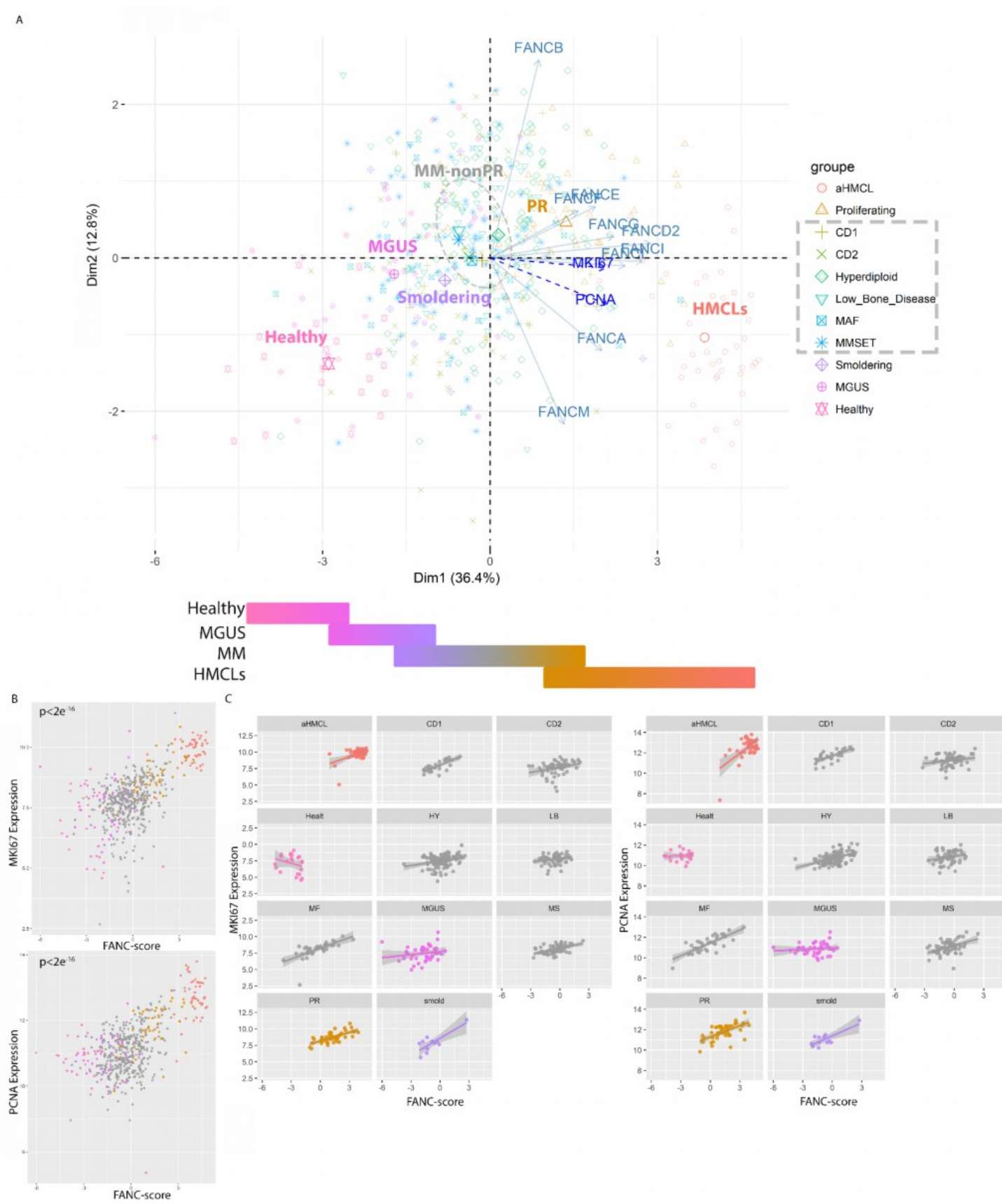


Figure 18. Analyse en composantes principales de l'expression des gènes de la famille Fanconi, des plasmocytes sains aux HMCLs. A. représentation

du premier plan de l'ACP, avec projection des variables qui ont construit les axes (*flèches pleines*), et les variables quantitatives illustratives (*pointillé*). Pour des raisons de lisibilité les sous-groupes cytogénétiques ont été regroupés sous le terme « MM ». B. Corrélation entre l'expression de MKI67 et FANC-score, PCNA et FANC-score. C. Corrélation entre l'expression de MKI67/PCNA et FANC-score au sein des sous-groupes moléculaires de MM. Healthy : plasmocyte sain, Smold : Myélome Indolent, MS : MMSET, MF : MAF, CD1/2: CCND1/2, HY: Hyperdiploïde, LB: Low-Bone disease (classification moléculaire du myélome, Zhan et al. 2006)

Pour finir avec les résultats de notre étude de l'exome, un élément de discussion qui semble important est la faible fréquence des variants homozygotes, en particulier au sein de gènes de réparation de dommages à l'ADN, ce qui nous a surpris. La définition d'un gène suppresseur de tumeur est liée à l'inactivation bi-allélique, le « double-hit »(Kinzler and Vogelstein, 1997). Cependant, si l'inactivation bi-allélique est une composante majeure dans les syndromes de prédisposition à des néoplasies (telles *BRCA1/2* et les cancers mammaires et ovariens) ou les syndromes congénitaux (maladie de Fanconi, syndromes ataxie-télangiectasie)(Choi et al., 2016; De Rocco et al., 2014), les invalidations somatiques tumorales sont le plus souvent hétérozygotes. Ces variants hétérozygotes (par exemple *BRCA1*, *PALB2*, *ATM*) sont associés dans plusieurs modèles (cancer du sein, lymphome du manteau) à une altération de la fonction à laquelle ils sont dévolus, en faveur d'une haplo-insuffisance, c.-à-d. que la perte d'un allèle suffit à altérer la fonction(Choi et al., 2016; Konishi et al., 2011; Nikkilä et al., 2013; Vaclová et al., 2015). A noter que la grande majorité des analyses d'impact clinique des variants rapportées dans les études de séquençage de MM (en particulier sur la survie) le sont sur des variants hétérozygotes.

Au total, le travail de cette thèse mosaïque nous a permis de resituer le MM et ses anomalies au sein des autres hémopathies malignes, et en particulier les post centre-germinatifs. Le travail de séquençage d'exome a été particulièrement complexe. La complexité était « technique » liée à l'acquisition et la manipulation des données mais également inhérente à la variabilité génique sans référence germinale. Le « haut-débit » technologique aboutissant *in-fine* à la curation manuelle de très nombreux variants. Si la réalisation du séquençage de l'exome d'HMCLs n'est pas nouveau (déjà 19 lignées sur COSMIC [12 communes], et 10 annotées sur Genomics of Drug Sensitivity in Cancer), nous avons intégré les données de séquençage dans un

ensemble cohérent de voies et de dérégulations. Nous mettons en évidence un enrichissement très net dans certaines cibles thérapeutiques potentielles, en particulier épigénétique et de réparation des dommages à l'ADN. Nous avons comparé ces fréquences d'anomalies aux MM au diagnostic et en rechute par manque de données de patients présentant des PCL primitives ou secondaires (en dehors des prévalences de quelques gènes comme *TP53*), alors que les anomalies génomiques entre HMCLs et sPCL sont probablement importantes. Par ailleurs, les similitudes retrouvées entre des anomalies les HMCLs et les patients, confirme à nouveau la robustesse de ce modèle pour trouver de nouvelles solutions pour nos patients, à condition de prendre en compte toutes les anomalies. Le développement d'un panel de lignées isogéniques (stratifiées sur leurs anomalies cytogénétiques), invalidées pour un panel de gènes d'intérêt, en particulier *TP53* (mut ou del) semble désormais incontournable pour répondre à nos questions biologiques, afin de s'affranchir du bruit de fond de nombreux autres variants/mutants ou caractéristiques de classe de translocation. Ces données de séquençage seront adressées, dès publication, à COSMIC pour mise à disposition de la communauté.

Annexes

Au cours de ma thèse j'ai pu poursuivre mes travaux de recherche clinique en tant qu'hématologue. Par ailleurs, je collabore à des articles au sein du laboratoire et dans d'autres champs en tant bio-statisticien/bio-informaticien (articles 5, 7 et 8). Ces articles sont présentés par ordre chronologique, avec un résumé de chaque étude ainsi que la première page de l'article ou de sa soumission en cours.

Article 3. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance.

Blood, 2014

Tessoulin B, Descamps G, Moreau P, Maïga S, Lodé L, Godon C, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C.

Regular Article

LYMPHOID NEOPLASIA

PRIMA-1^{Met} induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance

Benoît Tessoulin,¹⁻⁴ Géraldine Descamps,¹⁻³ Philippe Moreau,¹⁻⁴ Sophie Maïga,¹⁻³ Laurence Lodé,^{1-3,5} Catherine Godon,⁵ Séverine Marionneau-Lambot,⁶ Thibault Oullier,⁶ Steven Le Gouill,¹⁻⁴ Martine Amiot,¹⁻⁴ and Catherine Pellat-Deceunynck¹⁻⁴

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche 892, Nantes, France; ²Université de Nantes, Nantes, France; ³Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6299, Nantes, France; ⁴Service d'Hématologie, Centre Hospitalo-Universitaire Nantes, Nantes, France; ⁵Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalo-Universitaire Nantes, Nantes, France; and ⁶Plate-forme in vivo, Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France

Key Points

- Myeloma cells are highly sensitive to PRIMA-1^{Met}, independent of p53.
- PRIMA-1^{Met} induces myeloma cell death by impairing GSH/ROS balance.

The aim of this study was to assess the efficiency of p53 reactivation and induction of massive apoptosis (PRIMA-1^{Met}) in inducing myeloma cell death, using 27 human myeloma cell lines (HMCLs) and 23 primary samples. Measuring the lethal dose (LD₅₀) of HMCLs revealed that HMCLs displayed heterogeneous sensitivity, with an LD₅₀ ranging from 4 μM to more than 200 μM. The sensitivity of HMCLs did not correlate with myeloma genomic heterogeneity or TP53 status, and PRIMA-1^{Met} did not induce or increase expression of the p53 target genes *CDKN1A* or *TNFRSF10B/DR5*. However, PRIMA-1^{Met} increased expression of *NOXA* in a p53-independent manner, and *NOXA* silencing decreased PRIMA-1^{Met}-induced cell death. PRIMA-1^{Met} depleted glutathione (GSH) content and induced reactive oxygen

species production. The expression of GSH synthetase correlated with PRIMA-1^{Met} LD₅₀ values, and we showed that a GSH decrease mediated by GSH synthetase silencing or by and L-buthionine sulphoximine, an irreversible inhibitor of γ-glutamylcysteine synthetase, increased PRIMA-1^{Met}-induced cell death and overcame PRIMA-1^{Met} resistance. PRIMA-1^{Met} (10 μM) induced cell death in 65% of primary cells independent of the presence of del17p; did not increase DR5 expression, arguing against an activation of p53 pathway; and synergized with L-buthionine sulphoximine in all samples. Finally, we showed in mouse TP53^{neg} JJJN3-xenograft model that PRIMA-1^{Met} inhibited myeloma growth and synergized with L-buthionine sulphoximine in vivo. (*Blood*. 2014;124(10):1626-1636)

Introduction

TP53 is the most frequently mutated gene in cancers, and the mutations are associated with resistance to therapy in numerous cancers, including multiple myeloma (MM).^{1,2} MM remains an incurable plasma cell malignancy, although treatments for the disease have progressed in the last decade.³ It is well established that at diagnosis, patients with a deletion of the short arm of chromosome 17 (del17p), which overlaps the *TP53* locus (17p13), have been shown to have a shorter survival time, irrespective of the treatment regimens.³⁻⁷ Patients with del17p frequently (>30%) harbored a mutation in the remaining allele.⁸ Thus, there is an obvious need for compounds that bypass the defective p53 pathway, such as molecules targeting antiapoptotic molecules (eg, ABT-737 and ABT-199), which act downstream of p53.^{9,10} An alternative strategy is to target the overexpressed p53 mutant protein by directly modifying its conformation to restore its proapoptotic transcriptional functions.¹¹ Indeed, molecules that can reactivate cell death in p53 mutant cells in a p53-dependent manner have been selected on the basis of their ability to either kill the cells (phenotypic screening) or bind to mutated p53 and restore a functional p53 conformation (biochemical screening).¹¹⁻¹⁴ Among them, PRIMA-1^{Met} (APR-246) was isolated according to its ability to restore apoptosis in SAOS2-His-273 cells in a p53-dependent manner and was shown to bind to p53.^{11,15,16} PRIMA-1^{Met}, recently evaluated in

a phase 1 study, was shown to be effective in vivo in 2 patients with a mutation in the core (V173M) or tetramerization domain (A355V). After treatment, expression of the p53 target genes *Bax*, *Noxa*, and *Puma* was increased in tumor cells.¹⁷

At a molecular level, p53 reactivation and induction of massive apoptosis (PRIMA-1^{Met}) induced reactive oxygen species (ROS) production and requires an oxidative environment to reactivate p53, although the precise mechanism remains elusive.¹⁶ PRIMA-1^{Met} may have other targets, such as oxidosqualene cyclase, which was identified using a docking-inverse approach.¹⁸ Several reports have described a p53-independent ability of PRIMA-1^{Met} to induce tumor apoptosis. Indeed, in AML, APR-246 was found to be efficient irrespective of TP53 mutational status.¹⁹ Russo et al also have reported that PRIMA-1^{Met} kills cell lines that lack p53 expression.²⁰ Very recently, Saha et al reported that PRIMA-1^{Met} kills MM cells via Noxa induction in a p53-independent manner.²¹

In the present work, we evaluated the efficacy of PRIMA-1^{Met} across a collection of 27 human myeloma cell lines (HMCLs) representative of the heterogeneity of myeloma, as well as in 23 independent primary MM samples characterized for del17p. This HMCL collection was representative of *TP53* abnormalities found in patients (chromosome 17p deletion, different point mutations,

Submitted January 10, 2014; accepted June 21, 2014. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 8, 2014; DOI 10.1182/blood-2014-01-548800.

B.T. and G.D. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2014 by The American Society of Hematology

and exon deletion) and allowed us to provide an accurate preclinical evaluation.^{9,22-24} The efficacy of PRIMA-1^{Met} was compared with that of nutlin3a, which reactivates the p53 pathway and induces cell death only in TP53^{wt} HMCLs and primary cells.²⁴ We show that PRIMA-1^{Met}, in contrast to nutlin3a, killed HMCLs and primary myeloma cells independent of TP53 status and p53 expression in a GSH/ROS-dependent manner.

Materials and methods

HMCLs and primary myeloma cells

All HMCLs used in this article have been extensively characterized.^{9,23,26} The human stromal cell line HS5 was purchased from ATCC (LGC Standards SARL, Molsheim, France). After informed consent, blood or bone marrow samples from patients with MM were collected at the Department of Hematology at the University Hospital of Nantes or at the Intergroupe Francophone du Myélome (ethical approval DC-2011-1399). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Plasma cells were obtained after gradient density centrifugation, using Ficoll-Hypaque and purification with CD138 immunomagnetic beads (Stemcell Technologies, Le Plessis Robinson, France). Purified cells were cultured for 24 hours in RPMI1640 containing 5% fetal calf serum and 3 ng/mL interleukin 6. Deletion of the short arm of chromosome 17 was assessed by fluorescence in situ hybridization.⁸

Reagents and antibodies

Nutlin3a, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), glutathione reduced monoethyl ester (GSH-MEE), and L-buthionine sulfoximine (BSO) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). PRIMA-1^{Met}, small interfering RNA (siRNA), and antibodies against caspase 2, caspase 3, γ -glutamate-cysteine synthetase modifier subunit (GCLM), and glutathione synthetase (GSS) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Clintonsville, Nanterre, France). Anti-Apo2.7-PE, anti-CD138-PE, control immunoglobulin G (IgG1)-phycoerythrin (PE) monoclonal antibodies (mAbs) were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), and anti-DR5-PE was purchased from eBioscience. Anti-p53, anti-Noxa, anti-Bax, anti-p21, and anti-actin antibodies were purchased from Oncogene Science (Life Technologies, Paris, France), Alexis Biotech (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), Immunotech Beckman Coulter (Marseilles, France), Cell Signaling (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), and Millipore Bioscience Research Reagents (Molsheim, France), respectively. Glutathione (GSH) content was determined using a GSH/glutathione disulfide (GSSG) colorimetric detection kit (Arbor Assays, Euromedex, Strasbourg, France).

Cell death assays

The evaluation of cell death in HMCLs was performed by flow cytometry, using Apo2.7 staining.²⁷ Cell death in primary myeloma cells was measured via the loss of CD138 staining.²⁴

ROS detection

Endogenous ROS production was assessed using CellROX oxidative stress reagent (Molecular Probes, Life Technologies, Saint-Aubin, France). CellROX Green reagent (5 μ M) was added to the cell culture for 30 to 45 minutes at 37°C. After 3 washes in phosphate-buffered saline, fluorescence was analyzed on FACSCalibur (Cytocell, Structure Fédérative de Recherche Bonamy).

Gene silencing

Stably modified shp53 myeloma cell lines were obtained via lentiviral cell transduction, as previously described.²⁴ siRNA experiments also were performed as described previously.²⁸

Xenotransplant

Female severe combined immunodeficiency (SCID) beige 7-week-old mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Mice were bred

and housed in the Experimental Therapeutic Unit (UTE, Structure Fédérative de Recherche Bonamy) under animal care license 44565. Tumors were generated by implanting 10×10^6 cells in 100 μ L phosphate-buffered saline subcutaneously in the right flank above the hind leg.²⁹ The tumor volume was recorded in 3 dimensions, using a digital caliper and calculated by measuring length \times width \times depth.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Kruskal-Wallis, analysis of variance, Fisher exact, Mann-Whitney, and Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests.

Results

HMCLs displayed a p53-independent heterogeneous sensitivity to PRIMA-1^{Met}

The present HMCL collection consisted of 9 TP53^{wt} HMCLs, 12 TP53^{mut} HMCLs, 2 TP53^{wt+mut}, and 4 TP53^{neg} HMCLs. TP53^{neg} HMCLs did not express p53 protein because they either lacked p53 expression at the mRNA level (JN3, KMS11) or had a premature stop codon (NAN1) or a lack of intron splicing (L363; supplemental Table 1, available on the Blood Web site).^{23,24} Thus, 4 HMCLs harbored a hot-spot mutated 175, 248, 273, or 282 codon. PRIMA-1^{Met} LD₅₀ values were determined by incubating myeloma cells for 72 hours with a serial dilution of PRIMA-1^{Met} (1-200 μ M) in culture media. A cell death assay was performed, using Apo2.7 staining.^{24,27} The LD₅₀ values ranged from 3 up to more than 200 μ M (median, 37 μ M; supplemental Table 1). The median values for TP53^{wt}, TP53^{mut}, TP53^{wt+mut}, and TP53^{neg} HMCLs were, respectively, 22, 37, 49, and 38 μ M, with no significant differences between the HMCLs (Figure 1A; $P = .86$). Myeloma cells lacking p53 expression, such as JN3 and KMS11 (full length as well as all isoforms; data not shown), were as sensitive as TP53^{wt} or TP53^{mut} cells. Moreover, the shTP53 HMCLs, either TP53^{wt} (XG6, NCI-H929) or TP53^{mut} (XG5) myeloma cells, displayed no differential sensitivity to PRIMA-1^{Met} (Figure 1B), confirming that PRIMA-1^{Met}-induced myeloma cell death was not dependent on p53 expression. In contrast, the LD₅₀ values for nutlin3a in shTP53 XG6 and NCI-H929 TP53^{wt} HMCLs increased from 4 μ M up to more than 10 μ M ($P < .05$; supplemental Figure 1A), as described previously.²⁴ Myeloma-specific genomic heterogeneity characterized by recurrent 14q32 translocation and the overexpression of the *CCND1*, *MAF*, or *MMSET* genes was not significantly associated with the PRIMA-1^{Met} LD₅₀ values (Figure 1C; $P = .55$).

PRIMA-1^{Met} did not increase expression of the p53 target genes p21 and DR5 but did increase the expression of Noxa

Despite a lack of correlation between sensitivity of myeloma cells to PRIMA-1^{Met} and p53 expression, using flow cytometry or western blotting, we assessed whether PRIMA-1^{Met} induced the expression of p53 target genes p21, Noxa, and DR5. We performed experiments using 3 HMCLs that expressed either a wild-type protein (XG6) or a TP53^{R175H} mutant protein previously reported to be reactivated by PRIMA-1^{Met} (OPM2) or no p53 protein (JN3).¹⁶ Cells were treated with PRIMA-1^{Met} (LD₅₀ value) or nutlin3a (LD₅₀ value or 10 μ M) as a control of the p53 pathway mobilization. PRIMA-1^{Met} did not induce p21 expression but did induce strong expression of Noxa in HMCLs, regardless of the p53 expression or status (Figure 2A). In contrast, nutlin3a increased p53, p21, and Noxa expression in XG6^{wt} and NCI-H929^{wt} cells (supplemental Figure 1B). Of note, the expression of p53, either mutated or wild-type, became undetectable after PRIMA-1^{Met} treatment. PRIMA-1^{Met} induced apoptosis, as revealed by the cleavage of caspases 2 and 3, and

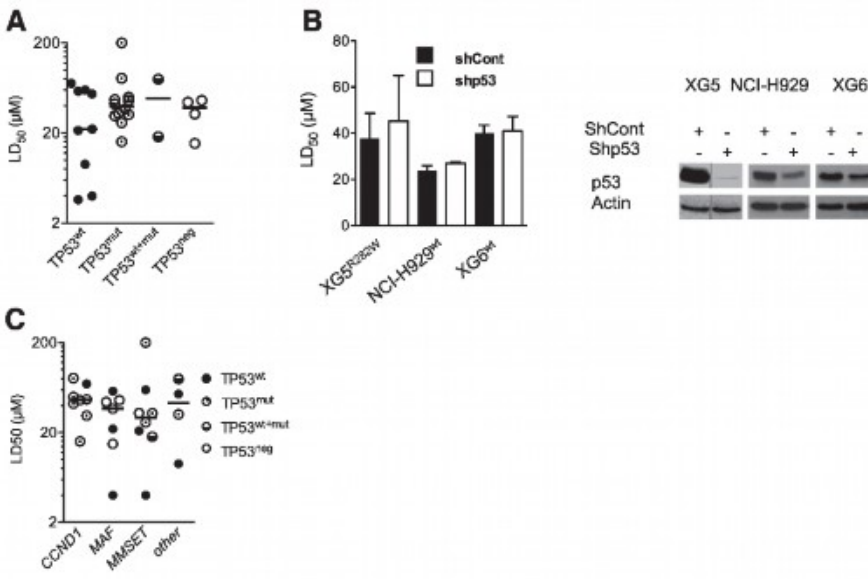


Figure 1. Sensitivity of HMCLs to PRIMA-1^{Met} was independent from TP53 status, p53 expression, and myeloma heterogeneity. (A) Sensitivity of HMCLs to PRIMA-1^{Met} was independent of TP53 status. The LD₅₀ values were defined by incubating cells (100 000 cells/0.2 mL) for 72 hours in the presence of a serial dilution of PRIMA-1^{Met} (starting dose, 200 µM). Cell death was determined using Apo2.7 staining, as described previously.^{24,27} The LD₅₀ values (defined as the mean of at least 3 independent experiments) were plotted against the TP53 status (supplemental Table 1). (B) Silencing of p53 in TP53^{wt} (XG6, NCI-H929) and TP53^{R275H} XG5 HMCLs did not inhibit PRIMA-1^{Met}-induced cell death. Stable shTP53 HMCLs were previously reported.²⁴ (Left) Cells were incubated for 72 hours, with serial dilutions of PRIMA-1^{Met} (starting dose, 80 µM), and cell death was assessed as described in the legend of Figure 1A. The data represent the mean ± standard error of the mean (SEM) of 3 independent experiments. (Right) Western blot analysis of p53 expression in shCont and shp53 myeloma cells. (C) Sensitivity of HMCLs to PRIMA-1^{Met} was independent of myeloma heterogeneity. The LD₅₀ values were plotted against recurrent 14q32, leading to overexpression of CCND1, (C-MAF or MAF-B) MAF, and MMSET.²³

PARP. We previously reported that activation of a functional p53 pathway increased DR5 expression, as p53 directly bound to the *DR5/TNFRSF10B* gene.²⁴ PRIMA-1^{Met} did not increase DR5 expression; the median fold increases were 0.99 ± 0.09 , 0.76 ± 0.25 , and 0.89 ± 0.17 for XG6^{wt}, OPM2^{R275H}, and JN3^{neg}, respectively (Figure 2B). As expected, nutlin3a increased the expression of DR5 in XG6^{wt} cells only (1.3 ± 0.1). These results confirmed that PRIMA-1^{Met}-induced myeloma cell death occurred independent of p53.

Induction of Noxa and ROS was involved in myeloma cell death

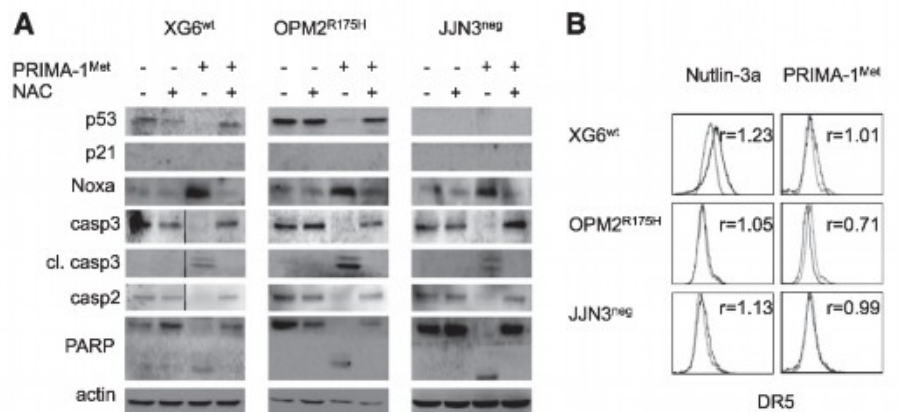
Because PRIMA-1^{Met} was reported to induce ROS, we assessed endogenous ROS production, using CellRox staining. XG6, OPM2, and JN3 cells were incubated with 20 µM PRIMA-1^{Met}, with or without the ROS scavenger NAC.¹⁶ Indeed, the mean fluorescence intensity was increased in cells treated with PRIMA-1^{Met}, and this increase was inhibited by NAC (Figure 3A). The addition of NAC (5 mM) also inhibited Noxa increase, decrease in p53 expression, cleavage of both PARP and caspases, and cell death (Figures 2B and 3B). GSH, GSH-MEE (5 mM), also inhibited PRIMA-1^{Met}-induced cell death in all sensitive HMCLs ($P < .001$; Figure 3B). In contrast, nutlin3a did not increase ROS production, and NAC did not impair nutlin3a-induced cell death in 3 TP53^{wt} HMCLs (supplemental

Figure 1C-D). The increase in Noxa expression was at the mRNA level: PRIMA-1^{Met} increased the median expression of *NOXA* mRNA 3.8-fold in OPM2^{R175H} cells ($P = .026$), and NAC fully prevented it ($P = .022$; Figure 3C). Silencing of Noxa inhibited PRIMA-1^{Met}-induced cell death by $89\% \pm 21\%$ ($P = .022$) in OPM2^{R175H} and $36\% \pm 9\%$ in LPI^{E286K} cells ($P = .034$), respectively (Figure 3D-E).

PRIMA-1^{Met} impaired GSH metabolism

Because PRIMA-1^{Met} induced ROS production, we assessed whether endogenous GSH depletion by BSO, an irreversible inhibitor of γ-glutamyl cysteine-synthase (γ-GCS), would favor PRIMA-1^{Met}-induced cell death. Neither suboptimal concentration of PRIMA-1^{Met} (10 µM) nor BSO (0.5 mM) alone induced any significant cell death (median, 4% and 6%, respectively) in 27 HMCLs, but they had significant synergy in all but XG7^{wt} and JIM3^{R273S} (median value, 93%; $P < .0001$; Figure 4A and supplemental Figure 2A). However, the synergy was recovered in XG7^{wt} and JIM3^{R273S} cells by increasing the doses of PRIMA-1^{Met} (Figure 4B). The efficacy of the combination was not related to TP53 status (Figure 4C; $P = .78$), as confirmed in JN3^{neg} cells in which BSO increased PRIMA-1^{Met}-induced caspase 3 activation and Noxa expression (supplemental Figure 2B). Addition of NAC also inhibited cell death induced by the combination of PRIMA-1^{Met}

Figure 2. PRIMA-1^{Met} did not increase expression of the p53 target genes p21 and DR5 but did increase the expression of Noxa. (A) PRIMA-1^{Met} did not induce the expression of the p53 target gene p21. XG6 (TP53^{wt}), OPM2 (TP53^{R175H}), and JN3 (TP53^{neg}) cells were treated overnight with 35 µM PRIMA-1^{Met}, with or without 5 mM NAC. Protein expression was assessed using western blotting. (B) PRIMA-1^{Met} did not increase the expression of the p53 target gene DR5. Cells, treated as described in the legend of Figure 2A, were stained with control-PE immunoglobulin or anti-DR5-PE mAbs, and fluorescence was analyzed on a FACsCalibur. The ratio of fluorescence was determined by dividing the specific fluorescence mean by the control fluorescence mean. Control staining of untreated and treated cells was identical and is not represented in the figure. The data represent 1 experiment out of 3.



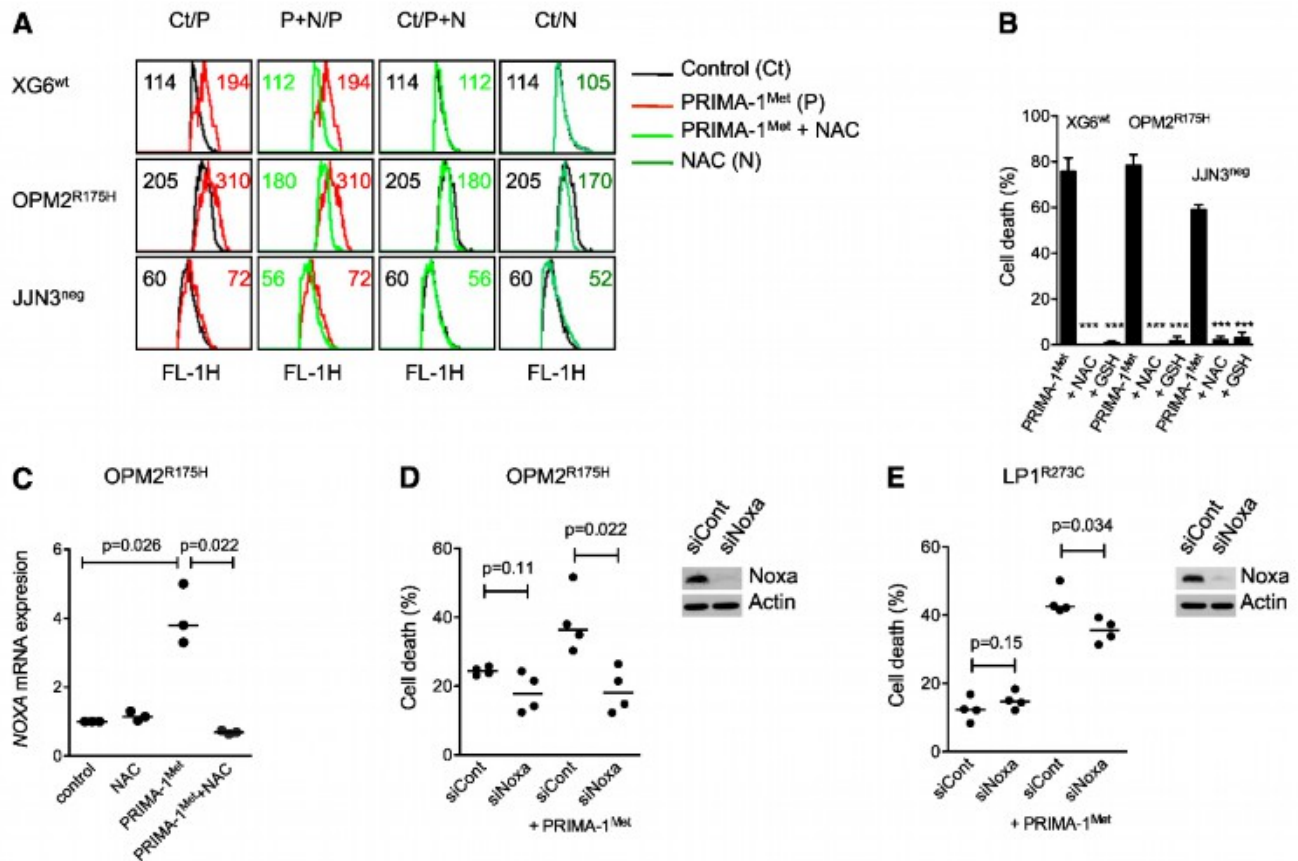


Figure 3. Induction of ROS and Noxa was involved in myeloma cell death. (A) PRIMA-1^{Mct} induced ROS production. XG6 (TP53^{wt}), OPM2 (TP53^{R175H}), and JJN3 (TP53^{neg}) cells (0.5×10^6 /mL) were incubated overnight with 20 μ M (JJN3) or 30 μ M (XG6, OPM2) PRIMA-1^{Mct} in the presence or absence of 5 mM NAC. CellROX reagent (5 μ M) was added to the cell culture for the last 30 minutes, at 37°C. Cells were washed in phosphate-buffered saline, and fluorescence was analyzed on FACSCalibur. (B) ROS scavengers NAC and GSH-MEE inhibited PRIMA-1^{Mct}-induced cell death. Cells were treated with PRIMA-1^{Mct} for 2 days in the presence or absence of NAC or GSH-MEE (5 mM). Cell death was assessed using Apo2.7 staining. The data represent the mean \pm SEM of at least 3 experiments. *** $P < .001$. (C) PRIMA-1^{Mct} increased the expression of NOXA mRNA. OPM2 cells were treated overnight with 30 μ M PRIMA-1^{Mct} in the presence or absence of NAC (5 mM). The expression of NOXA mRNA was performed using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction with the TaqMan probe. The data represent 3 independent experiments. (D-E) Transient silencing of Noxa inhibited PRIMA-1^{Mct}-induced cell death. OPM2 cells (D) or LP1 cells (E) were transfected with 100 pmol siCont or siNOXA (Life Technologies). At 72 hours, cells were treated for 24 hours with 100 μ M PRIMA-1^{Mct}, and cell death was assessed using flow cytometry (Apo2.7 staining). The data represent 4 independent experiments. Noxa expression was assessed using western blotting 72 hours after siRNA transfection.

with BSO by more than 90% in XG6, OPM2, and JJN3 (Figure 4D). Of note, the addition of BSO increased ROS production induced by PRIMA-1^{Mct}, as illustrated in OPM2 cells (Figure 4E). In contrast, BSO did not synergize with nutlin3a in TP53^{wt} HMCLs (supplemental Figure 1E), nor did it overcome resistance to nutlin3a in OPM2^{R175H} or JJN3^{neg} cells (data not shown).

Because depletion of GSH induced by BSO synergized with PRIMA-1^{Mct}, we assessed whether PRIMA-1^{Mct} impaired GSH content. As shown in Figure 4F, PRIMA-1^{Mct} induced depletion in GSH content (GSH+GSSG). The decrease in GSH content induced by PRIMA-1^{Mct} was $52\% \pm 10\%$, $75\% \pm 8\%$, and $100\% \pm 5\%$ in OPM2, JJN3, and XG6 cells, respectively. As expected, BSO decreased GSH content by $80\% \pm 4\%$, $81\% \pm 5\%$, and $73\% \pm 2\%$ in XG6, OPM2, and JJN3, respectively (Figure 4F). Combination of PRIMA-1^{Mct} with BSO induced a total depletion in GSH content. In contrast, GSH content was slightly decreased ($30\% \pm 10\%$) in nutlin3a-treated XG6 cells (supplemental Figure 1F).

Synthesis of GSH successively involves γ -GCS and GSS enzymes.³⁰ PRIMA-1^{Mct} did not significantly modify expression of GCLM (regulatory subunit of γ -GCS) or GSS, indicating that GSH depletion was not caused by disappearance of any enzymes (supplemental Figure 3A). Expression of GSS, but not that of γ GCS

(GCLM or GCLC), was correlated with the LD₅₀ PRIMA-1^{Mct} values (Figure 4G). Using siGSS RNA transfection, we showed that decrease in GSS expression in OPM2 cells increased their sensitivity to 25 μ M PRIMA-1^{Mct} by twofold: cell death was $18\% \pm 4\%$ and $39\% \pm 5\%$ in siControl and siGSS cells, respectively ($P = .026$; Figure 4H), and GSH content was 31 ± 10 and 20 ± 6 μ M in siControl and siGSS cells, respectively ($P = .03$).

HS5 stromal cells protected myeloma from PRIMA-1^{Mct}, but not from PRIMA-1^{Mct} plus BSO

Because the microenvironment can protect tumor cells, we assessed whether stromal cells could prevent PRIMA-1^{Mct}-induced myeloma cell death. Indeed, HS5 cells inhibited cell death induced by PRIMA-1^{Mct} by 50% in the 3 cell lines ($P = .03$), but they were unable to prevent PRIMA-1^{Mct}+BSO-induced cell death (supplemental Figure 3B). This inhibition was associated with a decrease in ROS production, in Noxa induction, and in GSH depletion (supplemental Figure 3C). Indeed, the mean global increase in GSH content induced by stromal cells was 1.23 ± 1.5 , 2.0 ± 2.7 ($P < .05$), and 1.36 ± 0.5 in control, PRIMA-1^{Mct}, and PRIMA-1^{Mct}+BSO-treated cell lines (supplemental Figure 3D). In contrast, stromal cells did not protect XG6 from nutlin3a-induced cell death (supplemental Figure 3G).

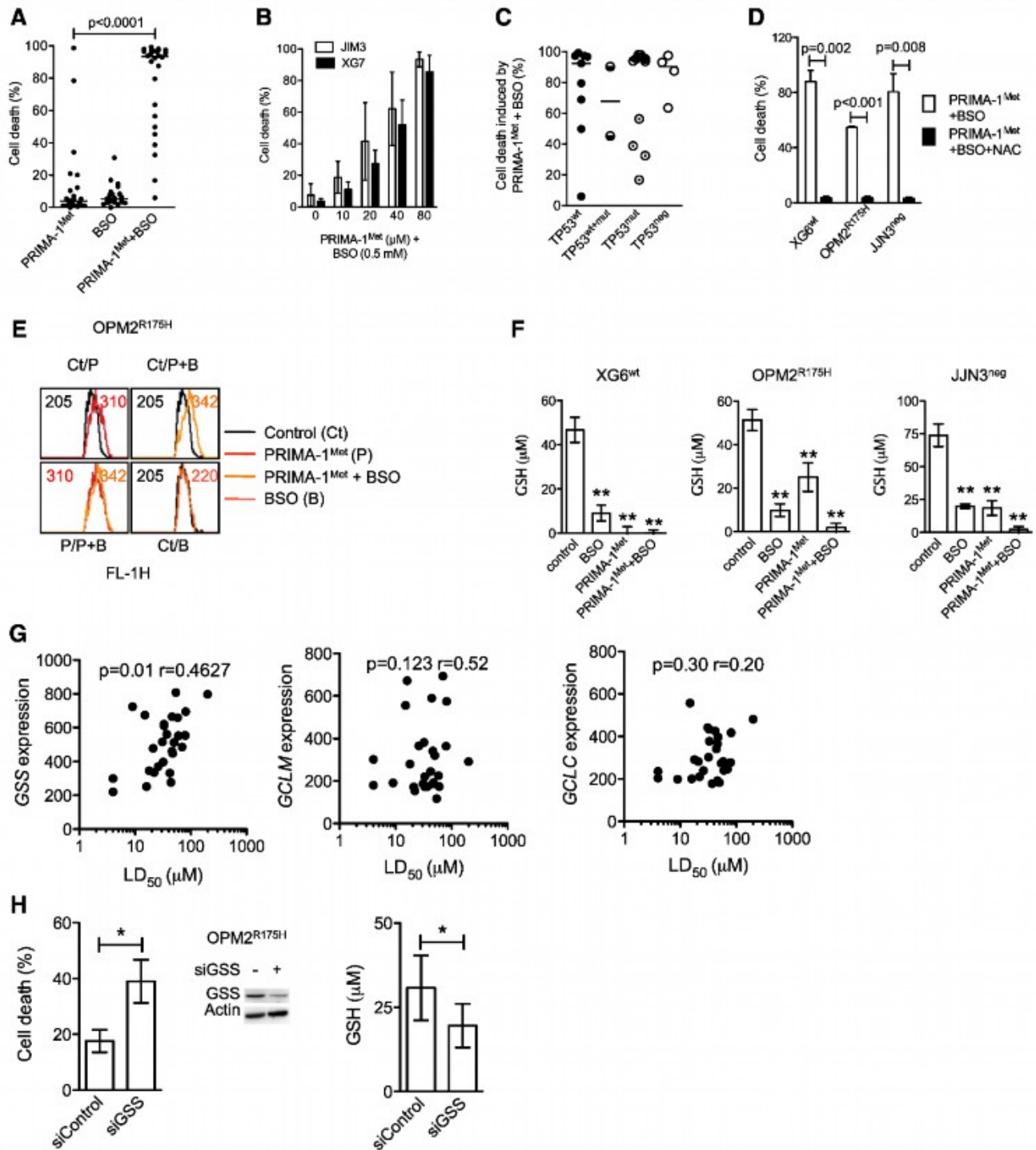


Figure 4. PRIMA-1^{Met} impaired GSH metabolism in HMCLs. (A) BSO synergized with PRIMA-1^{Met}. Cells were incubated for 48 hours with suboptimal doses of PRIMA-1^{Met} (10 μ M) and BSO (0.5 mM), and cell death was assessed using Apo2.7 staining. Each plot represents the mean cell death observed for each of the 27 HMCLs (obtained with 3 independent experiments). (B) Increasing doses of PRIMA-1^{Met} restored synergy with BSO. XG7 and JIM3 cells were incubated for 48 hours with serial concentrations of PRIMA-1^{Met} (10–80 μ M) in the presence of 0.5 mM BSO. The data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (C) Synergy between PRIMA-1^{Met} and BSO was independent of TP53 status. Median cell death induced by PRIMA-1^{Met} (10 μ M) and BSO (0.5 mM) for each cell line was plotted against the TP53 status. (D) NAC overcame PRIMA-1^{Met} and BSO synergy. Cells were incubated for 48 hours in the presence of PRIMA-1^{Met} (10 μ M) and BSO (0.5 mM), with or without NAC (5 mM). The data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (E) BSO increased ROS production induced by PRIMA-1^{Met}. OPM2 (0.5 \times 10⁶ cells/mL) was incubated overnight with 30 μ M PRIMA-1^{Met} or with 10 μ M PRIMA-1^{Met} and 0.5 mM BSO. CellROX reagent (5 μ M) was added to the cell culture for the last 30 minutes, at 37°C. Cells were washed in phosphate-buffered saline, and fluorescence was analyzed on FACSCalibur. (F) PRIMA-1^{Met} induced GSH depletion. Cells (0.5 \times 10⁶ cells/mL) were treated overnight with PRIMA-1^{Met} alone (30 μ M), BSO alone (0.5 mM), or a combination (10 μ M and 0.5 mM). Cells were lysed in acidic buffer (10 \times 10⁶ cells/mL), and GSH content was determined using a colorimetric kit by following the instructions of the manufacturer. The data represent the mean \pm SEM of 4 experiments. ***P* < .01. (G) Sensitivity of myeloma cells to PRIMA-1^{Met} correlated with GSS expression. Expression of GSS or of the 2 subunits of γ GCS (*GCLM* and *GCLC*) was plotted against LD₅₀ PRIMA-1^{Met} values. Correlation was assessed by Spearman test. (H) Silencing of GSS increased sensitivity to PRIMA-1^{Met}. OPM2 cells were incubated for 3 days with siControl or siGSS RNA and treated with 25 μ M PRIMA-1^{Met} for the last 24 hours. Cell death was assessed by Apo2.7 staining. The data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Expression of GSS (representative experiment) and GSH content (*n* = 4) was determined at 72 hours. **P* < .05.

PRIMA-1^{Met} induced cell death in primary cells irrespective of del17p status and synergized with BSO

The effect of PRIMA-1^{Met} was further assessed using primary cells (25 samples from 23 consecutive patients). Cell death was assessed by the loss of CD138 expression, and modulation of DR5 expression was used as a surrogate for the activation of the p53 pathway, as previously described and illustrated in Figure 5A.²⁴ PRIMA-1^{Met}, which significantly reduced myeloma survival ($P = .0067$ Wilcoxon matched-pairs signed rank test), induced a median cell death of 55% (Figure 5B and Table 1). The sensitivity of myeloma cells taken from PCL or MM patients was not significantly different ($P = .34$). Although NAC ($n = 9$) or GSH-MEE ($n = 6$) inhibited cell death ($P = .009$ and $P = .036$, respectively), the addition of BSO increased PRIMA-1^{Met}-induced cell death (87.5% of median cell death vs 32% with PRIMA-1^{Met} alone; $P = .037$; $n = 6$; and 0% with BSO alone). PRIMA-1^{Met} was more efficient than nutlin3a at inducing myeloma cell death (55% vs 7%, respectively; Figure 5B). The presence of a hemi-deletion of the 17p chromosome (del17p) negatively impairs overall patient survival, regardless of treatment, and TP53 mutations were found in samples harboring a del17p.⁸ Samples displayed a 17p deletion in a minor (<50%, considered as del17p-) or major (>50%, considered as del17p+) fraction of cells. Cell death induced by PRIMA-1^{Met} was not different in samples with or without del17p ($P = .24$, Mann-Whitney test; Figure 5C). PRIMA-1^{Met} induced a decrease in DR5 expression in primary samples (median fold increase, 0.92; $n = 18$; $P = .0166$; Figure 5D), whether harboring a del17p or not (median fold increase, 0.93 [$n = 5$; $P = .0625$], and median fold increase, 0.93 [$n = 11$; $P = .0942$], respectively; Figure 5E-F). Moreover, no correlation was found between the proportion of cells with del17p and the modulation in DR5 expression ($P = .23$, Spearman test; Figure 5G). In contrast, nutlin3a induced a significant increase in DR5 expression (median value, 1.25; $n = 16$; $P < .001$), which was significant in samples without del17p (median fold increase, 1.38; $n = 11$; $P = .001$), but not in samples with del17p (median fold increase, 1.10; $n = 5$; $P = .31$; Figure 5D-F). The increase in DR5 expression induced by nutlin3a was negatively correlated with the proportion of del17p within the samples ($P < .001$; Figure 5H). Finally, the increase in DR5 expression induced by nutlin-3a, but not by PRIMA-1^{Met}, was significantly higher in samples without del17p (Figure 5I). Thus, in primary myeloma cells, PRIMA-1^{Met}, in contrast to nutlin3a, did not increase DR5 expression and, instead, induced cell death irrespective of del17p status in synergy with BSO.

PRIMA-1^{Met} synergized with BSO in vivo in a xenograft model

We assessed PRIMA-1^{Met} efficiency at preventing myeloma growth, both alone and in combination with BSO. SCID-beige mice bearing JN3 tumor cells received either no treatment (control), PRIMA-1^{Met} (18 mg/kg, intravenous injection), BSO (10 mM, drinking water), or a combination of BSO and PRIMA-1^{Met}. PRIMA-1^{Met} (20 mg/kg) was previously shown to be efficient in preventing SAOS2 growth in vivo.¹⁵ BSO (30 mM) was evaluated in combination with melphalan.³¹ Mice were treated with 10 mM BSO in drinking water because this concentration was shown to reduce GSH content in the liver.³² Treatments were performed daily for 4 days, stopped for 2 days, and then performed again for another 4 days (as indicated by arrows in Figure 6A). Mice were then killed at day 16 because control and BSO-treated tumors exceeded the authorized tumor load. Body weight was not significantly affected by any treatments: The variation of weight between day 5 and day 15 was $102.2\% \pm 3.0\%$,

$102.4\% \pm 3.3\%$, $99.0\% \pm 2.2\%$, and $98.8\% \pm 2.7\%$ for control, BSO-treated, PRIMA-1^{Met}-treated, and PRIMA-1^{Met}+BSO-treated mice, respectively (Figure 6B). The presence of BSO did not significantly modify tumor growth ($P > .05$, 2-way analysis of variance test). In contrast, PRIMA-1^{Met} significantly impaired tumor growth ($P < .001$), and its combination with BSO further inhibited tumor growth ($P < .05$). Tumor volume increased by 6.2-, 5.0-, 2.5-, and 1.05-fold in control, BSO-treated, PRIMA-1^{Met}-treated, and PRIMA-1^{Met}+BSO-treated mice, respectively. Tumor size tended to increase during treatment with PRIMA-1^{Met}; the mean tumor size was $93.0 \pm 7.4 \text{ mm}^3$ and $228.8 \pm 67.3 \text{ mm}^3$ at day 6 and day 16, respectively ($P = .18$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). In contrast, in the presence of PRIMA-1^{Met} and BSO, the tumors failed to increase in size; mean tumor volume was $91.4 \pm 5.9 \text{ mm}^3$ and $106 \pm 30.6 \text{ mm}^3$ at day 6 and day 16, respectively ($P = .7$). In another set of mice, tumors were removed after 4 days of treatment to analyze expression of caspase 3 (Figure 6C). The level of procaspase 3 was decreased in tumors from mice treated with PRIMA-1^{Met}±BSO (Figure 6D).

Discussion

In this study, we assessed the efficacy of PRIMA-1^{Met}, a p53 targeted drug selected for its ability to reactivate mutant p53 proteins, in inducing apoptosis in myeloma cell lines ($n = 27$) and primary myeloma cells ($n = 23$), both in vitro and in vivo. The TP53 status of HMCLs and primary cells was assessed by direct sequencing of reverse transcription-polymerase chain reaction products and by the presence of deletion of the short arm of chromosome 17, del17p, as previously described.²⁴ We showed that PRIMA-1^{Met} induced myeloma cell death, irrespective of TP53 status. Moreover, HMCLs lacking p53 expression (as well as p53 isoforms, data not shown), such as JN3 or KMS11, were as sensitive as TP53^{mut} or TP53^{wt} HMCLs. In primary cells, we showed that 10 μM PRIMA-1^{Met} induced cell death in primary samples (median cell death, 50%) without significant differences between samples with or without del17p, and PRIMA-1^{Met}, in contrast to nutlin3a, did not induce any increase in DR5 expression. Using 3 HMCLs expressing either a wild-type p53 protein (XG6) or a R175H mutant protein harboring a mutation that could be reactivated by PRIMA-1^{Met} (OPM2), or expressing no p53 protein (JN3), we showed that PRIMA-1^{Met} did not reactivate p53 target genes such as *CDKN1A* or *TNFRSF10B* but, rather, increased expression of *NOXA* and induced production of ROS. In the presence of the ROS scavengers NAC or GSH-MEE, cell death, Noxa expression, and ROS production induced by PRIMA-1^{Met} were prevented. In contrast, NAC did not prevent cell death or Noxa increase induced by nutlin3a. We show that PRIMA-1^{Met}, but not nutlin3a, induced the depletion of GSH content. Moreover, irreversible inhibition of γGCS by BSO synergized with PRIMA-1^{Met} in cell lines, in primary samples, and in vivo. Involvement of GSH metabolism was further confirmed in GSS-silenced cells, which became more sensitive to PRIMA-1^{Met}. BSO did not synergize with nutlin3a or RITA (another MDM2/p53 inhibitor, data not shown), which confirms that the mechanism of cell death induced by PRIMA-1^{Met} is different from that induced by p53 stabilization.

Similar data showing the ability of PRIMA-1^{Met} to kill tumor cells independent of p53 were recently reported in several tumor models, including myeloma.¹⁹⁻²¹ Of note, PRIMA-1^{Met} was isolated from the chemical library by a phenotypic screening that assessed the alternative sensitivity of Saos-2-His-273 cells carrying tetracycline-regulated mutant p53.³³ In contrast, nutlin3a was

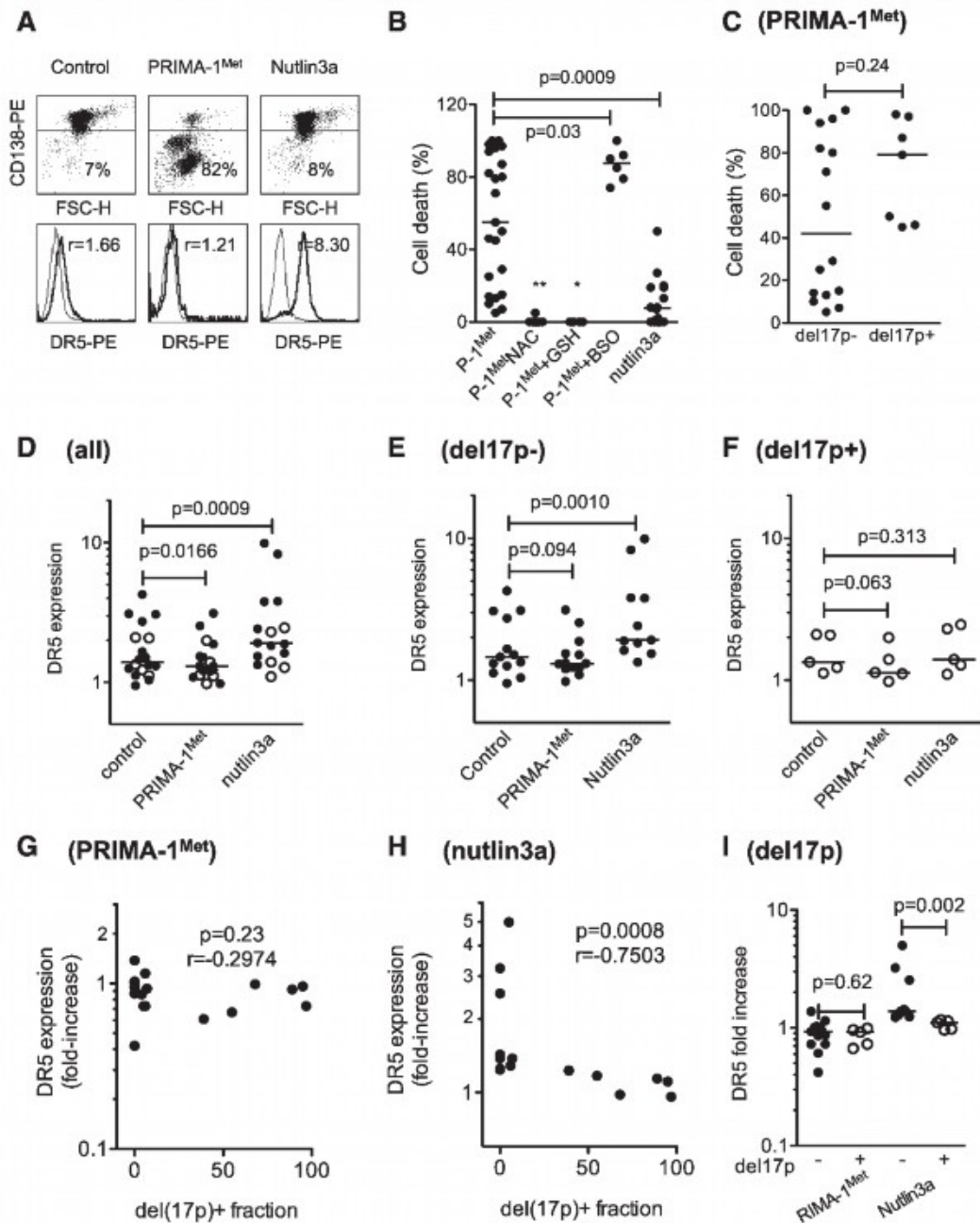


Figure 5. PRIMA-1^{Met} induced cell death in primary cells, irrespective of TP53 status, and synergized with BSO. (A) PRIMA-1^{Met} induced cell death in primary cells. Purified myeloma cells (sample 10; Table 1) were treated overnight with PRIMA-1^{Met} (10 μ M) or nutlin3a (10 μ M) and stained with CD138-PE (cytogram), control-PE, or anti-DR5-PE (histogram) mAbs to assess cell death (loss of CD138 staining) or DR5 expression level. The thin line represents control staining, and the thick line is DR5 staining. (B) PRIMA-1^{Met} induced primary myeloma cell death and synergized with BSO but was antagonized by NAC or GSH-MEE. Primary myeloma cells were isolated from the bone marrow or peripheral blood of patients with MM or plasma cell leukemia. Cells were incubated overnight in the presence or absence of PRIMA-1^{Met} (10 μ M), BSO (0.5 mM), NAC (5 mM), GSH-MEE (5 mM), or nutlin3a (10 μ M). BSO, NAC, and GSH-MEE did not induce any myeloma cell death (data not shown). Cell death was assessed by the loss of CD138 staining, as described previously. (C) PRIMA-1^{Met}-induced cell death was independent of del17p status. The TP53 status of primary cells was assessed, using fluorescence in situ hybridization, by defining the percentage of myeloma cells lacking the short arm of chromosome 17 (del17p), as previously reported.²⁴ In this cohort, deletion was considered negative when a minority of cells harbored a 17p deletion (range, 0%-39%), and positive when more than 50% of cells harbored the deletion (range, 50%-97%; Table 1). Samples 6' and 22' were excluded from this analysis to analyze independent samples. (D-F) PRIMA-1^{Met}, in contrast to nutlin3a, did not increase DR5 expression in primary cells. Cells were treated overnight with PRIMA-1^{Met} (10 μ M) or nutlin3a (10 μ M) and were stained with control-PE or anti-DR5-PE mAbs. DR5 expression was calculated by dividing the specific mean fluorescence (DR5) of untreated and treated cells by the control staining of untreated and treated cells, respectively. The variation of DR5 expression was analyzed in the whole samples (D) and in samples without (E) or with (F) del17p. (G) Modulation in DR5 expression induced by PRIMA-1^{Met} was not correlated with del17. The fold-increase in DR5 expression was plotted against the percentage of cells with del17p within the samples. (H) Modulation in DR5 expression induced by nutlin3a was inversely correlated to del17p. The fold-increase in DR5 expression was plotted against the percentage of cells with del17p within the samples. (I) Modulation in DR5 expression induced by nutlin3a, but not by PRIMA-1^{Met}, was significantly higher in samples without del17p than in samples with del17p. * $P < .05$; *** $P < .001$.

isolated in a biochemical screen via its direct binding to MDM2.³⁴ These different screening strategies may, at least in part, explain why PRIMA-1^{Met} has activities beyond binding to p53. Although

PRIMA-1^{Met} was not specifically linked to p53, the drug was able to kill myeloma cells such as OPM2 or JJN3, which are resistant to the alkylating drugs melphalan and bendamustine.²⁶ Of major

Table 1. PRIMA-1^{Met} induced cell death in primary cells

Sample	Patient's characteristics				Cell death				Ratio of DR5 expression				DR5 fold increase			
	Disease	Status	Origin	del17p	PRIMA1 ^{Met}	PRIMA1 ^{Met} +NAC	PRIMA1 ^{Met} +GSH	PRIMA1 ^{Met} +BSO	Nutlin3a	Control	PRIMA1 ^{Met}	Nutlin3a	PRIMA1 ^{Met}	Nutlin3a	PRIMA1 ^{Met}	Nutlin3a
1	pPCL	D	PB	0%	80%	—	—	—	0%	0.95	1.31	2.42	1.38	2.55		
2	MM	R	BM	0%	71%	—	—	—	0%	1.46	1.51	1.83	1.03	1.25		
3	sPCL	R	PB	0%	29%	5%	—	—	19%	1.31	1.32	1.62	1.01	1.24		
4	sPCL	R	PB	0%	13%	0%	0%	82%	2%	1.51	1.54	1.89	1.02	1.25		
5	MM	R	BM	0%	100%	0%	0%	100%	0%	3.07	1.30	9.92	0.42	3.23		
6	pPCL	D	BM	0%	14%	0%	0%	74%	0%	—	—	—	—	—		
6'	pPCL	D	PB	0%	6%	0%	0%	98%	0%	—	—	—	—	—		
7	sPCL	R	PB	0%	5%	0%	0%	85%	50%	—	—	—	—	—		
8	MM	D	BM	0%	79%	—	—	—	0%	1.12	0.98	1.54	0.87	1.38		
9	MM	D	BM	0%	46%	—	—	—	0%	1.34	1.23	1.92	0.95	1.43		
10	MM	D	BM	4%	100%	0%	0%	—	—	1.26	1.09	—	0.86	—		
11	MM	D	BM	4%	15%	0%	—	—	—	—	—	—	—	—		
12	MM	D	BM	5%	82%	—	—	—	8%	1.66	1.21	6.30	0.73	5.00		
13	pPCL	D	BM	6%	25%	—	—	—	20%	1.04	1.20	1.34	1.15	1.29		
14	MM	D	BM	6%	10%	0%	0%	—	—	4.27	3.13	—	0.73	—		
15	MM	D	BM	7%	7%	—	—	—	13%	2.73	2.54	3.78	0.93	1.38		
16	MM	R	BM	39%	94%	—	—	—	8%	3.10	1.88	3.81	0.61	1.23		
17	MM	D	BM	55%	98%	—	—	—	—	2.10	1.40	2.46	0.67	1.17		
18	sPCL	R	PB	68%	45%	—	—	—	27%	1.12	1.11	1.10	0.99	0.98		
19	pPCL	D	PB	89%	87%	—	—	90%	19%	1.23	1.13	1.40	0.92	1.14		
20	MM	D	BM	90%	55%	—	—	—	1%	—	—	—	—	—		
21	sPCL	R	PB	95%	97%	—	—	—	7%	2.08	2.00	2.30	0.96	1.11		
22	pPCL	D	BM	96%	50%	0%	—	79%	—	—	—	—	—	—		
22'	pPCL	D	PB	96%	51%	0%	—	96%	—	—	—	—	—	—		
23	pPCL	D	PB	97%	96%	—	—	—	11%	1.34	0.98	1.28	0.73	0.96		

Primary myeloma cells were purified (samples 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 20, 22, and 23) or not (samples 1, 3, 4, 7, 10, 13, 18, 19, and 21), with CD138-conjugated magnetic beads, and incubated overnight in RPMI1640 supplemented with 5% fetal calf serum and 3 ng/mL interleukin 6, with or without nutlin3a (10 μM), PRIMA-1^{Met} (10 μM), NAC (5 mM), GSH (5 mM), or BSO (0.5 mM), as indicated. Cell death was assessed by the loss of CD138 staining. Levels of DR5 expression were assessed by direct staining with anti-DR5-PE or control-PE mAb of untreated (control) or PRIMA-1^{Met}, or nutlin3a-treated cells, and was expressed as the ratio of the specific fluorescence mean to that of control staining in untreated and treated cells. Samples 6' and 22' were peripheral blood samples from patients 6 and 22 and were not considered for statistical analyses. Dash indicates not done. BM, bone marrow; D, diagnosis; P, primary; PB, peripheral blood; PCL, plasma cell leukemia; R, relapse; s, secondary.

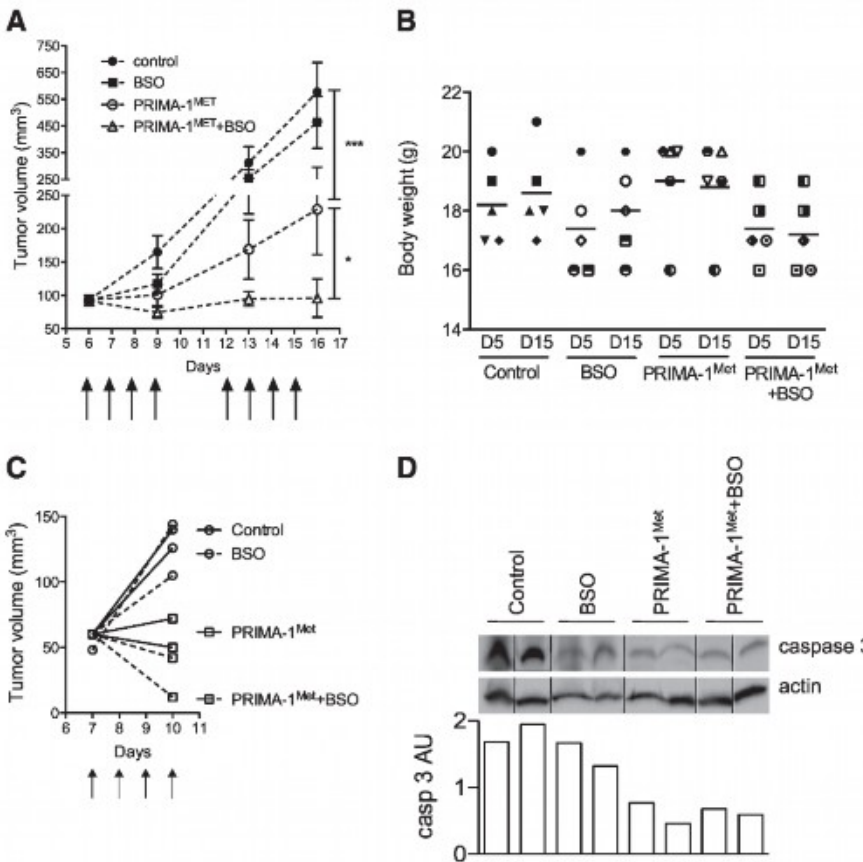


Figure 6. PRIMA-1^{Met} synergized with BSO in vivo. (A) PRIMA-1^{Met} and PRIMA-1^{Met}+BSO treatment inhibited in vivo tumor growth. Seven-week-old female SCID-beige mice were subcutaneously injected with 10×10^6 JJN3 cells. After 6 days, 20 mice bearing similar tumor loads were selected and randomly divided into 4 groups receiving no treatment (control), 18 mg/kg PRIMA-1^{Met} (intravenous injection), 10 mM BSO (drinking water), or 18 mg/kg PRIMA-1^{Met} and 10 mM BSO. Treatment was performed daily for 4 days, stopped, and then resumed for 4 additional days. Mice were killed the day after the final treatment (day 15). The tumor volume was assessed at days 6, 9, 13, and 16. * $P < .05$; *** $P < .001$. (B) PRIMA-1^{Met} and PRIMA-1^{Met}+BSO did not significantly alter body weight. The figure represents the body weights assessed at days 5 and 15 for each mouse (1 symbol per mouse). (C-D) PRIMA-1^{Met} and PRIMA-1^{Met}+BSO treatment increased caspase 3 activity. Eight mice were subcutaneously injected with 10×10^6 JJN3 cells. After 7 days, mice received no treatment (control), 18 mg/kg PRIMA-1^{Met} (intravenous injection), 10 mM BSO (drinking water), or 18 mg/kg PRIMA-1^{Met} and 10 mM BSO over the course of 4 days. Mice were killed 4 hours after the last treatment, and tumors were disrupted with a dounce homogenizer in 0.4% Triton X-100. Expression of proteins was analyzed by western blotting. Expression of procaspase 3 (arbitrary unit) was normalized, using actin expression.

interest, Peng et al recently reported that PRIMA-1^{Met} targeted the selenoprotein thioredoxin reductase 1 and converted it into a NADPH oxidase enzyme.³⁵ Our data show that PRIMA-1^{Met} induced a depletion of GSH content (GSH + GSSG), suggesting an inhibition of GSH synthesis. Moreover, silencing of GSS increased sensitivity of OPM2 cells to PRIMA-1^{Met}, confirming that GSH plays a central role.

Because NAC or GSH-MEE can, either indirectly via γ GCS or directly, increase intracellular GSH content, their ability to block PRIMA-1^{Met}-induced cell death could be related to an increase in GSH content. Indeed, PRIMA-1^{Met}-induced cell death was fully prevented by NAC or GSH-MEE, as well as partly by another ROS scavenger, L-ascorbic acid (50% of inhibition, data not shown). However, because NAC overcame the BSO-PRIMA-1^{Met} synergy and because BSO is an irreversible inhibitor of γ GCS, NAC cannot only act as a source of GSH. This suggests that beyond their ability to neutralize ROS and regenerate GSH, NAC or GSH-MEE can directly interact with PRIMA-1^{Met} to neutralize it, as shown by Lambert et al.¹⁶ The depletion of GSH by BSO did not induce cell death and did not induce ROS production. Thus, PRIMA-1^{Met}-induced GSH depletion is necessary but not sufficient to induce cell death. Indeed, because PRIMA-1^{Met} can convert the antioxidant activity of thioredoxin into a prooxidant activity and because thioredoxin reductase and GSH peroxidase are essential to neutralize ROS, it appears that PRIMA-1^{Met}-treated cells do not have any functional detoxifying metabolism and cannot face ROS.

The mechanism of increase in Noxa expression induced by PRIMA-1^{Met} remains unclear. Recently, Saha et al reported that PRIMA-1^{Met}-induced cell death was mediated by Noxa, via p73 in myeloma cell lines.²¹ Although we also showed that Noxa silencing in OPM2 or LP1 cells decreased cell death induced by PRIMA-1^{Met},

we failed to find any increase in p73 expression (data not shown) or in p53/p73 target genes such as p21. P73 is not constitutively expressed in myeloma cells because of its silencing by DNA methylation, and it seems unlikely that PRIMA-1^{Met} inhibits DNA methylation within 24 hours in cell lines or in primary cells, which do not proliferate.³⁶ Myeloma cells are sensitive to ROS, and ROS production is involved in melphalan or bendamustine-induced myeloma cell death. Indeed, although NAC and GSH partly prevent melphalan-induced tumor death, BSO synergizes with melphalan.^{26,37-39} The melphalan plus BSO combination was also assessed in phase 1 studies, which reported that the toxicity was acceptable.^{40,41} However, no phase 3 study is available to determine the ultimate efficacy of that combination. We show in the JJN3-SCID xenograft model that 18 mg/kg PRIMA-1^{Met} was enough to inhibit tumor growth and that addition of BSO induced tumor regression. PRIMA-1^{Met} (100 mg/kg) was also shown to reduce tumor growth in the RPMI8226 xenograft model and to synergize with dexamethasone or doxorubicine.²¹ In both RPMI8226 and JJN3 xenograft models, mouse body weight remained stable, excluding the possibility of major toxicity from PRIMA-1^{Met}. Thus, evaluating the combined results, it appears that PRIMA-1^{Met} is effective against myeloma cells, both in vitro and in vivo, and that its efficacy is increased when it is used in combination with myeloma-approved drugs or BSO.

In JJN3-SCID mice, administration of PRIMA-1^{Met} was performed to mimic the reported assessment of PRIMA-1^{Met}/APR-246 in patients who received APR-246 once per day for 4 consecutive days over the course of 1 or 2 weeks.¹⁷ This phase 1 study, which involved patients with prostate cancer and hematologic malignancies, including myeloma, established that the maximum tolerated dose is 60 mg/kg. The authors reported that the tumor load of 2 patients with TP53^{mut} tumors decreased during treatment. Our

in vivo experiments demonstrated that BSO significantly increased PRIMA-1^{Met} efficiency.

In summary, PRIMA-1^{Met}, alone or in combination with BSO, is potent against myeloma cells in vitro and in vivo, independent of p53 expression and TP53 status.

Acknowledgments

We thank Tumorotheque Institut Régional du Cancer Nantes-Atlantique (Centre Hospitalo-Universitaire and Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes, France) for providing us with purified myeloma cells.

B.T. was supported by a grant from Institut National du Cancer. This work was supported by a grant from Fondation Française pour la Recherche Contre le Myélome et les Gammopathies Monoclonales.

References

- Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-2165.
- Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*. 2012;119(16):3668-3683.
- Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, et al; International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*. 2011;117(18):4696-4700.
- Avet-Loiseau H, Lelou X, Rousset M, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4630-4634.
- Dimopoulos MA, Kastritis E, Christoulas D, et al. Treatment of patients with relapsed/refractory multiple myeloma with lenalidomide and dexamethasone with or without bortezomib: prospective evaluation of the impact of cytogenetic abnormalities and of previous therapies. *Leukemia*. 2010;24(10):1769-1778.
- Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*. 1998;92(3):802-809.
- Schilling G, Hansen T, Shimoni A, et al. Impact of genetic abnormalities on survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(6):1250-1255.
- Lodé L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010;95(11):1973-1976.
- Bodet L, Gomez-Bougie P, Touzeau C, et al. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood*. 2011;118(14):3901-3910.
- Touzeau C, Dousset C, Le Guillou S, et al. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(1):210-212.
- Lane DP, Cheek CF, Lain S. p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(9):a001222.
- Selivanova G. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(1):46-56.
- Brown CJ, Cheek CF, Verma CS, Lane DP. Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(1):53-62.
- Liu YY. Resuscitating wild-type p53 expression by disrupting ceramide glycosylation: a novel approach to target mutant p53 tumors. *Cancer Res*. 2011;71(20):6295-6299.
- Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002;8(3):282-288.
- Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*. 2009;15(5):376-388.
- Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(29):3633-3639.
- Grinter SZ, Liang Y, Huang SY, Hyder SM, Zou X. An inverse docking approach for identifying new potential anti-cancer targets. *J Mol Graph Model*. 2011;29(6):795-799.
- Ali D, Jönsson-Videsäter K, Deneberg S, et al. APR-246 exhibits anti-leukemic activity and synergism with conventional chemotherapeutic drugs in acute myeloid leukemia cells. *Eur J Haematol*. 2011;86(3):206-215.
- Russo D, Ottaggio L, Foggetti G, et al. PRIMA-1 induces autophagy in cancer cells carrying mutant or wild type p53. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1904-1913.
- Saha MN, 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(11):2331-2341.
- Chiron D, Maïga S, Surget S, et al. Autocrine insulin-like growth factor 1 and stem cell factor but not interleukin 6 support self-renewal of human myeloma cells. *Blood Cancer J*. 2013;3:e120.
- Moreaux J, Klein B, Bataille R, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011;96(4):574-582.
- Surget S, Chiron D, Gomez-Bougie P, et al. Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer Res*. 2012;72(17):4562-4573.
- Chiron D, Surget S, Maïga S, et al. The peripheral CD138+ population but not the CD138- population contains myeloma clonogenic cells in plasma cell leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2012;156(5):679-683.
- Surget S, Lemieux-Blanchard E, Maïga S, et al. Bendamustine and melphalan similarly kill myeloma cells through ROS production and activation of the p53 pathway and do not overcome resistance to each other [published online ahead of print February 17, 2014]. *Leuk Lymphoma*.
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, et al. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood*. 2006;108(4):1346-1352.
- Descamps G, Gomez-Bougie P, Tamburini J, et al. The cap-translation inhibitor 4EGI-1 induces apoptosis in multiple myeloma through Noxa induction. *Br J Cancer*. 2012;106(10):1660-1667.
- Chiron D, Maïga S, Descamps G, et al. Critical role of the NOTCH ligand JAG2 in self-renewal of myeloma cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48(4):247-253.
- Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3143-3153.
- Siemann DW, Beyers KL. In vivo therapeutic potential of combination thiol depletion and alkylating chemotherapy. *Br J Cancer*. 1993;68(6):1071-1079.
- Kakuni M, Morita M, Matsuo K, et al. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol Lett*. 2012;214(1):9-18.
- Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):2011-2018.
- Vassiliev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004;303(5659):844-848.

Authorship

Contribution: B.T., G.D., and S.M. performed experiments and participated in the design of the study; L.L. and C.G. provided purified myeloma samples and performed chromosomal analyses; S.M.-L. and T.O. performed in vivo experiments; P.M. and S.L.G. provided myeloma primary samples, participated in the design of the study, and reviewed the paper; M.A. participated in the design of the study and reviewed the paper; and C.P.-D. designed the study and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Catherine Pellat-Deceunynck, INSERM, UMR 892, Centre de Recherches en Cancérologie Nantes Angers, IRS-UN, 8, quai Moncoussu, Nantes, BP70721 F-44007 France; e-mail: catherine.pellat-deceunynck@inserm.fr.

35. Peng X, Zhang MQ, Conserva F, et al. APR-246/PRIMA-1MET inhibits thioredoxin reductase 1 and converts the enzyme to a dedicated NADPH oxidase. *Cell Death Dis.* 2013;4:e881.
36. Stanganelli C, Arbellide J, Fantl DB, Corrado C, Slavutsky I. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Ann Hematol.* 2010;89(2):191-199.
37. Anderson CP, Reynolds CP. Synergistic cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) and intensive melphalan (L-PAM) for neuroblastoma cell lines established at relapse after myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30(3):135-140.
38. Biroccio A, Benassi B, Fiorentino F, Zupi G. Glutathione depletion induced by c-Myc downregulation triggers apoptosis on treatment with alkylating agents. *Neoplasia.* 2004;6(3):195-206.
39. Muldoon LL, Walker-Rosenfeld SL, Hale C, Purcell SE, Bennett LC, Neuwelt EA. Rescue from enhanced alkylator-induced cell death with low molecular weight sulfur-containing chemoprotectants. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(3):797-805.
40. Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD, et al. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(23):1789-1796.
41. Gallo JM, Brennan J, Hamilton TC, et al. Time-dependent pharmacodynamic models in cancer chemotherapy: population pharmacodynamic model for glutathione depletion following modulation by buthionine sulfoximine (BSO) in a Phase I trial of melphalan and BSO. *Cancer Res.* 1995;55(20):4507-4511.

Article 4. Allogeneic stem cell transplantation for patients with mantle cell lymphoma who failed autologous stem cell transplantation: a national survey of the SFGM-TC

Bone Marrow Transplantation, 2016

Tessoulin B, Ceballos P, Chevallier P, Blaise D, Tournilhac O, Gauthier J, Maillard N, Tabrizi R, Choquet S, Carras S, Ifrah N, Guillermin G, Mohty M, Tilly H, Socie G, Cornillon J, Hermine O, Daguindau É, Bachy E, Girault S, Marchand T, Oberic L, Reman O, Leux C, Le Gouill S.

Résumé:

La poly-chimiothérapie associée au rituximab suivie d'une intensification thérapeutique avec autogreffe (ASCT) est le standard de traitement des lymphomes à cellules du manteau (LCM) au diagnostic pour les sujets jeunes et au diagnostic. En dépit de ce traitement intensif, les patients restent à haut risque de rechute au cours du temps. La société française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) a conduit une étude nationale sur les allogreffes de moelle à conditionnement réduit (RIC-Allo-SCT) chez les patients en rechute post-autogreffe (n=106). Les durées médianes de rechute post-ASCT et entre ASCT et RIC-Allo-SCT étaient de 28 mois et 3.6 années, respectivement, 60% des patients ayant reçu au moins 3 lignes de traitement avec l'allogreffe. Les conditionnements de RIC-Allo-SCT étaient hétérogènes. Des réactions aiguës du greffon contre l'hôte (GvHD) sévères (III/IV) ont été diagnostiquées dans 20% des patients, et une GvHD chronique extensive dans 28 patients. Le suivi médian était de 45 mois post-RIC-Allo-SCT, avec une survie sans progression médiane de 30m et une survie globale de 62m. La mortalité liée au traitement était estimée à 28% à 1an. Au total, 52 patients sont décédés, dont 34 de toxicités et 11 de leur lymphome. Le statut de réponse avant allogreffe était la seule variable prédictive de la survie sans progression et de la survie globale.

- Notre étude a mis en évidence que de nouvelles stratégies sont nécessaires dans le LCM, en particulier pour améliorer la réponse pré-allogreffe, réduire la toxicité liée au traitement et les risques de rechute à court et long terme.

ORIGINAL ARTICLE

Allogeneic stem cell transplantation for patients with mantle cell lymphoma who failed autologous stem cell transplantation: a national survey of the SFGM-TC

B Tessoulin^{1,2}, P Ceballos³, P Chevallier¹, D Blaise⁴, O Tournilhac⁵, J Gauthier⁶, N Maillard⁷, R Tabrizi⁸, S Choquet⁹, S Carras¹⁰, N Ifrah¹¹, G Guillermin¹², M Mohty¹³, H Tilly¹⁴, G Socie¹⁵, J Cornillon¹⁶, O Hermine¹⁷, É Daguindau¹⁸, E Bachy¹⁹, S Girault²⁰, T Marchand²¹, L Oberic²², O Reman²³, C Leux²⁴ and S Le Gouill^{1,2,25}

Poly-chemotherapy plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation (auto-SCT) is standard care for untreated young patients with mantle cell lymphoma (MCL). Despite this intensive treatment, transplant patients remain highly susceptible to relapse over time. The French SFGM-TC performed a national survey on reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation (RIC-allo-SCT) for fit relapsed/refractory patients who failed after auto-SCT ($n = 106$). Median times of relapse after auto-SCT, and from auto-SCT to RIC-allo-SCT were 28 months and 3.6 years, respectively. Sixty per cent of patients received at least three lines of treatment before RIC-allo-SCT. Conditioning regimens for RIC-allo-SCT were heterogeneous. Twenty patients experienced grade III/IV aGvHD, extensive cGvHD was reported in 28 cases. Median follow-up after RIC-allo-SCT was 45 months. Median PFS after RIC-allo-SCT was 30.1 months and median overall survival was 62 months. Treatment-related mortality (TRM) at 1 year and 3 years were estimated at 28% and 32%, respectively. A total of 52 patients died; major causes of death were related to toxicity ($n = 34$) and MCL ($n = 11$). Patients in good response before RIC-allo-SCT experienced a better PFS and OS. Our work highlights the need for new RIC-allo-SCT MCL-tailored approaches to reduce TRM, and early and late relapse.

Bone Marrow Transplantation (2016) 51, 1184–1190; doi:10.1038/bmt.2016.102; published online 25 April 2016

INTRODUCTION

First-line treatment of mantle cell lymphoma (MCL) is adapted to age and comorbidities.¹ The ESMO conference consensus recommends treating young and fit patients (nearly half of all patients) with an immuno-chemotherapy induction including high-dose aracytine followed by autologous stem cell transplantation (auto-SCT).² CR after auto-SCT was successful in 80% of cases, but all patients, including good responders, remain highly susceptible to relapse over time. The recent EBMT study shows that median overall survival (OS) of patients who relapsed after auto-SCT is 19 months.³ For relapse or refractory patients with chemo-resistant disease, allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) appears to be a curative treatment given the graft versus MCL effect (GV-MCL).^{4,5} Given the median age at diagnosis is 65–70y,⁶ reduced-intensity conditioning regimens (RIC-allo-SCT) are the main options for patients who fail after auto-SCT. Therefore, the outcome of patients who previously received auto-SCT, relapsed and then underwent RIC-allo-SCT rescue is an important topic in clinical practice. Published data regarding

allo-SCT in MCL remain sparse, with discrepancies between studies regarding median progression-free survival (PFS), OS and treatment-related mortality (TRM).^{7–11} Studies on allo-SCT in MCL include heterogeneous groups of patients treated or untreated with rituximab. Many patients did not undergo auto-SCT before allo-SCT and conditioning regimens were not always RIC. Therefore, the *Société Française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire* group (SFGM-TC) performed a database retrospective study, restricted to MCL patients who relapsed after auto-SCT, addressing the topic of RIC-allo-SCT rescue.

MATERIALS AND METHODS

Study design, patient selection and response assessment

All patients with MCL reported in the SFGM-TC registry, relapsed after auto-SCT and then underwent RIC-allo-SCT were eligible for the present study. Patients who received a tandem auto-SCT followed by RIC-allo-SCT (defined by a delay between auto-SCT and RIC-allo-SCT inferior to 3 months) were excluded. Patients with MCL were defined according to

¹Department of Hematology, University Hospital, Nantes, France; ²INSERM team 10 UMR 892, CRCNA, Nantes, France; ³Department of Hematology, University Hospital, Montpellier, France; ⁴Department of Hematology, Paoli Calmettes, Marseille, France; ⁵Department of Hematology, University Hospital, Clermont-Ferrand, France; ⁶Department of Hematology, University Hospital, Lille, France; ⁷Department of Hematology, University Hospital, Poitiers, France; ⁸Department of Hematology, University Hospital, Bordeaux, France; ⁹Department of Hematology, Pitié Salpêtrière, Paris, France; ¹⁰Department of Hematology, University Hospital, Grenoble, France; ¹¹Department of Hematology, University Hospital, Angers, France; ¹²Department of Hematology, University Hospital, Brest, France; ¹³Department of Hematology, University Hospital-Saint Antoine, Paris, France; ¹⁴Department of Hematology, Centre Henri-Becquerel, Rouen, France; ¹⁵Department of Hematology, Saint Louis Hospital, Paris, France; ¹⁶Department of Hematology, Institut de Cancérologie de la Loire, Saint Etienne, France; ¹⁷Department of Hematology, Necker Hospital, Paris, France; ¹⁸Department of Hematology, University Hospital, Besançon, France; ¹⁹Department of Hematology, University hospital, Lyon, France; ²⁰Department of Hematology, University Hospital, Limoges, France; ²¹Department of Hematology, University Hospital, Rennes, France; ²²University Cancer Institute, Toulouse, France; ²³Department of Hematology, University Hospital, Caen, France; ²⁴Department of Epidemiology, University Hospital of Nantes, Nantes, France and ²⁵Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), CHU de Nantes, Nantes, France. Correspondence: Professor S Le Gouill, Department of Hematology, University Hospital, place Alexis Ricordeau, Nantes 44000, France. E-mail: steven.legouill@chu-nantes.fr

Article 5. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma

Blood, 2016

Chiron D, Bellanger C, Papin A, **Tessoulin B**, Dousset C, Maiga S, Moreau A, Esbelin J, Trichet V, Chen-Kiang S, Moreau P, Touzeau C, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C.

Résumé:

Le lymphome à cellules du manteau est une hémopathie lymphoïde maligne, de diffusion hématogène précoce. Cependant, la prolifération des cellules tumorales ne s'exprime que dans les tissus lymphoïdes, ce qui suggère un rôle majeur du microenvironnement tumoral. Les cellules tumorales de 21 patients ont été co-cultivées avec un environnement de cellules stromales ou « lymphoïde-like »(exprimant le CD40L). Les résultats démontrent que seul l'environnement « lymphoïde-like » permet la prolifération des cellules tumorales. De plus, ce modèle de co-culture CD40L permet la récapitulation du programme transcriptionnel des cellules de LCM intra-tumoraux. Cette prolifération s'associe également à un dérèglement des protéines de la famille Bcl-2 (surexpression de Bcl-XI), en faveur d'une perte du priming mitochondrial. Cette surexpression est inhibée par l'anti-CD20 de deuxième génération « obinutuzumab ». Finalement, nous montrons que le niveau de priming mitochondrial est corrélé à la sensibilité au venetoclax et aux alkylants, illustrant le rôle probablement majeur du microenvironnement dans la prolifération et la résistance tumorales.

LYMPHOID NEOPLASIA

Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma

David Chiron,^{1,2} Céline Bellanger,^{1,2,*} Antonin Papin,^{1,2,*} Benoit Tessoulin,¹⁻³ Christelle Dousset,^{1,2,4} Sophie Maiga,^{1,2} Anne Moreau,⁵ Julie Esbelin,⁶ Valérie Trichet,^{2,7} Selina Chen-Kiang,⁸ Philippe Moreau,^{1,3} Cyrille Touzeau,^{1,3} Steven Le Guillou,¹⁻³ Martine Amiot,^{1,2} and Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2}

¹Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Nantes, Nantes, France; ²Groupement De Recherche 3697 Micronit, CNRS, Tours, France; ³Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, ⁴Centre d'Investigation Clinique, INSERM, ⁵Service d'Anatomie Pathologique, and ⁶Service de Gynécologie et Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ⁷Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; and ⁸Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, Cornell University, NY

Key Points

- CD40L plus cytokines induces cell-cycle progression and loss of mitochondrial priming, leading to drug resistance in MCL.
- CD40L plus cytokines mimics in situ molecular profiles and allows the development of new approaches by integrating the role of the microenvironment.

Mantle cell lymphoma (MCL) accumulates in lymphoid organs, but disseminates early on in extranodal tissues. Although proliferation remains located in lymphoid organs only, suggesting a major role of the tumor ecosystem, few studies have assessed MCL microenvironment. We therefore cocultured primary circulating MCL cells from 21 patients several weeks *ex vivo* with stromal or lymphoid-like (CD40L) cells to determine which interactions could support their proliferation. We showed that coculture with lymphoid-like cells, but not stromal cells, induced cell-cycle progression, which was amplified by MCL-specific cytokines (insulin-like growth factor-1, B-cell activating factor, interleukin-6, interleukin-10). Of interest, we showed that our model recapitulated the MCL in situ molecular signatures (ie, proliferation, NF- κ B, and survival signatures). We further demonstrated that proliferating MCL harbored an imbalance in Bcl-2 family expression, leading to a consequent loss of mitochondrial priming. Of interest, this loss of priming was overcome by the type II anti-CD20 antibody obinutuzumab, which counteracted Bcl- κ L induction through NF- κ B inhibition. Finally, we showed that the mitochondrial priming directly correlated with the sensitivity toward venetoclax and alkylating drugs. By

identifying the microenvironment as the major support for proliferation and drug resistance in MCL, our results highlight a selective approach to target the lymphoma niche. (*Blood*. 2016;128(24):2808-2818)

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare but incurable subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL) deriving from immunoglobulin M+ (IgM⁺) CD5⁺ B cells, which initially accumulate in secondary lymphoid organs (LO) such as the lymph nodes or spleen. Hallmarks of MCL include aberrant activation of the cyclin D1/CDK4 complex, which supports unrestrained cell-cycle progression, and deregulation of the apoptotic machinery that leads to drug resistance.^{1,2} Recently, progress in high-throughput technology provided considerable advancement in our understanding of secondary intrinsic alterations in MCL, such as SOX11 aberrant expression or frequent mutations of *ATM/TP53*, NF- κ B regulatory genes, and Notch receptors.³⁻⁵

As described in other B-cell malignancies,^{6,7} extrinsic signaling is believed to favor MCL growth, survival, and migration.⁸ Interactions come from multiple microenvironments and support both nodal and extranodal manifestations (bone marrow, gastrointestinal), as highlighted by the early dissemination observed in most MCL patients at presentation. However, there is relatively little information regarding the

nature of surrounding cells and soluble factors and the resulting molecular regulations induced in MCL. Further investigations that integrate the key role of the microenvironment are now needed to overcome tumor drug resistance in protective niches. The benefits of such an approach have been recently reinforced by studies reporting that selective inhibition of BTK or phosphatidylinositol 3-kinase δ , critical kinases of the B-cell receptor (BCR) and CXCR4 pathways, prevents the homing of MCL, leading to peripheral lymphocytosis.⁹⁻¹² However, the consequences of cell egress in the peripheral blood (PB) on proliferation and survival are still unclear and need further investigations.

In situ, lymphoma B cells are in close contact with cells of immune origin, including CD40L-expressing T cells or macrophages, and mesenchymal cells such as specialized stromal or follicular dendritic cells.^{8,13} Few studies have shown that coculture with stromal cells promoted MCL cell survival through several mechanisms, such as a decrease in Bim expression¹⁴ or cell adhesion-mediated drug resistance.¹⁵ However, regulations induced by coculture are still

Submitted 3 June 2016; accepted 22 September 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 3 October 2016; DOI 10.1182/blood-2016-06-720490.

*C.B. and A.P. contributed equally to this manuscript.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2016 by The American Society of Hematology

Article 6. Carboplatin instead of cisplatin in combination with dexamethasone, high-dose cytarabine with or without rituximab (DHAC+/-R) is an effective treatment with low toxicity in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas.

Annals of Hematology, 2017

Tessoulin B, Thomare P, Delande E, Moynard J, Gastinne T, Moreau A, Bossard C, Mahé B, Blin N, Dubruille V, Touzeau C, Boudreault JS, Perrin F, Lok A, Guillaume T, Garnier A, Peterlin P, Gallas P, Chevallier P, Moreau P, Le Gouill S.

Résumé :

Le DHAP (haute dose de cytarabine, dexaméthasone et cisplatine) avec et sans Rituximab (DHAP+/-R) est un des régimes les plus utilisés pour les hémopathies lymphoïdes en rechute ou réfractaires. Cependant, la néphrotoxicité du cisplatine rend nécessaire l'essai de nouveaux sels de platine de remplacement. Nous avons réalisé une étude monocentrique rétrospective pour évaluer l'incorporation du carboplatine (DHAC+/-R), pour évaluer sa toxicité en vie réelle. 199 patients ont reçu la combinaison DHAC+/-R au cours de l'étude. Les toxicités hématologiques de grade ≥ 3 ont été majoritairement des thrombopénies (n=101) et des anémies (n=95). Les neutropénies de grade ≥ 3 étaient rares (n=10). Nous n'avons pas constaté de néphropathie de grade ≥ 3 , et une seule neurotoxicité significative. Par ailleurs, 94% des patients en réponse et prévus pour une autogreffe ont pu en bénéficier.

- Au total, le DHAC+/-R est une stratégie légitime en pratique quotidienne et ne met pas en péril la collecte des cellules souches périphériques ni l'autogreffe.

Carboplatin instead of cisplatin in combination with dexamethasone, high-dose cytarabine with or without rituximab (DHAC+/-R) is an effective treatment with low toxicity in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas

B. Tessoulin^{1,2} · P. Thomare³ · E. Delande³ · J. Moynard³ · T. Gastinne¹ · A. Moreau⁴ · C. Bossard⁴ · B. Mahé¹ · N. Blin¹ · V. Dubruille¹ · C. Touzeau¹ · J. S. Boudreault¹ · F. Perrin¹ · A. Lok¹ · T. Guillaume¹ · A. Garnier¹ · P. Peterlin¹ · P. Gallas¹ · P. Chevallier¹ · P. Moreau¹ · Steven Le Gouill^{1,2,5}

Received: 27 October 2016 / Accepted: 16 March 2017 / Published online: 3 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The DHAP regimen (high-dose cytarabine in combination with dexamethasone and cisplatin) with or without rituximab (DHAP+/-R) is one of the most common regimens in daily practice. It is considered the standard treatment for relapse or refractory Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Cisplatin nephrotoxicity is a major concern, and other platinum compounds are being tried. We performed a monocentric retrospective analysis to evaluate the use of carboplatin, so-called DHAC+/-R regimen. The purpose was to assess the toxicity of the DHAC+/-R regimen in real-life. The Dexamethasone, Cytarabine, Carboplatin (DHAC) regimen consisted of carboplatin AUC = 5 mg/ml/min (targeted area under the curve with Calvert's formula) on day 1, cytarabine 2 g/m² twice a day on day 2 and IV dexamethasone 40 mg from days 1 to 4. Rituximab was administrated at

375 mg/m² on day 1 for CD20+ NHL. The interval between courses was 21 days. During the period considered, 199 patients received DHAC+/-R. For the entire cohort, median follow-up is 24 months (range, 2–82), median OS is not reached (NR), estimated 2-year OS is 75% (95% CI, 69–83) and median progression-free survival (PFS) is 46 months (95% CI, 22–NA). Of 144 patients scheduled for autologous stem cell transplantation (ASCT), 102 (71%, NA = 2) were in response after DHAC+/-R and all except 4 underwent ASCT. Grade ≥ 3 haematological toxicities were mainly thrombocytopenia (*n* = 101) and anaemia (*n* = 95). Grade ≥ 3 neutropenia occurred in 10 patients. No grade ≥ 3 renal and one grade 3 neurological toxicity were reported. DHAC+/-R is feasible in daily practice, provides good response rates and jeopardises neither stem cell collection nor ASCT.

B. Tessoulin and P. Thomare have contributed equally to this work

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00277-017-2981-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Steven Le Gouill
steven.legouill@chu-nantes.fr

¹ Service d'hématologie clinique, CHU de Nantes, place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France

² INSERM, UMR892, Equipe 10, Nantes, France

³ Pharmacy Clinical Oncology Unit (UPCO), Department of Pharmacy, University Hospital of Nantes, Nantes, France

⁴ Department of Pathology, University Hospital of Nantes, Nantes, France

⁵ INSERM, CIC 004, Nantes University Hospital, Nantes, France

Keywords Carboplatin · Lymphoma · Cytarabine · DHAC

Introduction

Hodgkin's (H) and non-Hodgkin's (NH) lymphomas are commonly treated upfront with an anthracycline-based chemotherapy regimen, plus rituximab for CD20 positive entities. At relapse, salvage therapies are adapted according to several parameters, e.g. type of lymphoma, previous lines of treatment, duration of response, age, planned autograft or allograft. In 1988, Velasquez et al. reported the use of high-dose cytarabine in combination with dexamethasone and cisplatin, so-called DHAP regimen [1]. DHAP has been one of the most commonly used salvage regimens worldwide for nearly three decades. In the PARMA study [2], for instance, relapsed and

Article 7. Decitabine and Melphalan Fail to Reactivate p73 in p53 Deficient Myeloma Cells.

International Journal of Molecular Sciences, 2017

Gillardin PS, Descamps G, Maiga S, **Tessoulin B**, Djamai H, Lucani B, Chiron D, Moreau P, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C, Moreau-Aubry A.


Résumé :

Compte-tenu du recouvrement partiel des programmes transcriptionnels de p53 et p73, nous avons étudié la méthylation du promoteur de *TP73* et la possibilité de sa réexpression par l'utilisation d'un agent déméthylant (Decitabine). *TP73* est peu exprimé dans les HMCLs, en particulier dans les lignées *TP53^{Abn}*. Cette faible expression résulte de la méthylation du promoteur de *TP73*, cependant bien que l'utilisation d'un agent hypométhylant ait augmenté la transcription de *TP73*, aucune majoration protéique n'a été détectée. De plus l'utilisation d'alkylants (sel de platine et melphalan) a permis la stabilisation de la protéine p73 dans les lignées *TP53^{sauvage}* seulement, sans synergie avec la décitabine dans les lignées *TP53^{Mut}*.



Brief Report

Decitabine and Melphalan Fail to Reactivate p73 in p53 Deficient Myeloma Cells

Pierre-Samuel Gillardin ¹, Géraldine Descamps ¹, Sophie Maiga ¹, Benoit Tessoulin ¹, Hanane Djamaï ¹, Benedetta Lucani ¹, David Chiron ¹ , Philippe Moreau ^{1,2}, Steven Le Gouill ^{1,2}, Martine Amiot ¹, Catherine Pellat-Deceunynck ^{1,*} and Agnès Moreau-Aubry ¹

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, 44007 Nantes, France; pierre.gillardin@etu.univ-nantes.fr (P.-S.G.); geraldine.descamps@univ-nantes.fr (G.D.); sophie.maiga@inserm.fr (S.M.); benoit.tessoulin@chu-nantes.fr (B.T.); djamaï.hanane@gmail.com (H.D.); benedetta.lucani@gmail.com (B.L.); david.chiron@inserm.fr (D.C.); philippe.moreau@chu-nantes.fr (P.M.); steven.legouill@chu-nantes.fr (S.L.G.); martine.amiot@inserm.fr (M.A.); agnes.aubry@univ-nantes.fr (A.M.-A.)

² Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU, 44093 Nantes, France

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

Received: 25 November 2017; Accepted: 22 December 2017; Published: 23 December 2017

Abstract: (1) Background: *TP53* deficiency remains a major adverse event in Multiple Myeloma (MM) despite therapeutic progresses. As it is not possible to target *TP53* deficiency with pharmacological agents, we explored the possibility of activating another p53 family member, p73, which has not been well studied in myeloma. (2) Methods: Using human myeloma cell lines (HMCLs) with normal or abnormal *TP53* status, we assessed *TP73* methylation and expression. (3) Results: Using microarray data, we reported that *TP73* is weakly expressed in 47 HMCLs and mostly in *TP53* wild type (*TP53*^{wt}) HMCLs ($p = 0.0029$). Q-RT-PCR assays showed that *TP73* was expressed in 57% of *TP53*^{wt} HMCLs (4 out of 7) and 11% of *TP53* abnormal (*TP53*^{abn}) HMCLs (2 out of 18) ($p = 0.0463$). We showed that *TP73* is silenced by methylation in *TP53*^{abn} HMCLs and that decitabine increased its expression, which, however, remained insufficient for significant protein expression. Alkylating drugs increased expression of *TP73* only in *TP53*^{wt} HMCLs but failed to synergize with decitabine in *TP53*^{abn} HMCLs. (4) Conclusions: Decitabine and melphalan does not appear as a promising combination for inducing p73 and bypassing p53 deficiency in myeloma cells.

Keywords: multiple myeloma; p53; p73; CpG methylation; decitabine; 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 (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) 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 [1]. 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* [2]. Mutations of *TP53* were exclusively found in myeloma cells displaying a hemi-deletion of the short arm of chromosome 17 (del17p) [3]. The frequency of *TP53* mutations, which is low at diagnosis (around 3%), increases with relapses and is high in plasma cell leukemia (PCL, >30%) and human myeloma cell lines (HMCLs, >70%), these latter mostly deriving from extramedullary MM and mainly from PCL [4–8]. Loss of function of mutant p53 is believed to be related to conformation deficiency: therefore, small molecules, such as

Article 8. Diagnostic and management of life-threatening Adult-Onset Still Disease: a French nationwide multicenter study and systematic literature review.

Critical Care, 2018

Néel A, Wahbi A, **Tessoulin B**, Boileau J, Carpentier D, Decaux O, Fardet L, Geri G, Godmer P, Goujard C, Maisonneuve H, Mari A, Pouchot J, Ziza JM, Bretonnière C, Hamidou M.

Résumé :

La maladie de Still de l'adulte est une pathologie systémique inflammatoire rare. Peu de patients développent des complications avec atteinte d'organe menaçant le pronostic vital. Nous avons récapitulé dans cette étude les phénotypes et différentes évolutions de ces patients « Still graves », au travers d'une cohorte de cas de plusieurs unités de surveillance continue et de revue de la littérature.

20 patients ont été inclus, principalement (90%) au diagnostic, qui présentaient de la fièvre (100%), une pharyngite (65%), un rash cutané (65%) et des arthromyalgies (55%). La ferritine était particulièrement élevée (médiane : 29110ng/mL). Des détresses respiratoires aiguës, un état de choc et de défaillance multiviscérale sont intervenus chez 15, 10 et 7 patients, respectivement. L'hémophagocytose a été mise en évidence chez 8 patients, 2 patients sont décédés. Le délai diagnostic et l'instauration d'un traitement spécifique a été long, tous les patients ont reçu une corticothérapie avec 50% de réponse. Des 50% de patients en échec de corticothérapie, seul l'anakinra (anti IL-1 α/β) a montré une efficacité.

Avec cette étude, nous mettons en évidence que le « Still grave » est une manifestation rare, justifiant l'admission en service de soins continus et mimant un sepsis d'étiologie inconnue. Le pronostic à long terme est bon.


- Ce premier article est suivi d'un deuxième article avec établissement d'un score pronostic et analyse multifactorielle (MFA), en cours de soumission.

RESEARCH

Open Access



Diagnostic and management of life-threatening Adult-Onset Still Disease: a French nationwide multicenter study and systematic literature review

Antoine Néel^{1†}, Anaïs Wahbi^{1†} , Benoit Tessoulin², Julien Boileau³, Dorothée Carpentier¹, Olivier Decaux⁵, Laurence Fardet⁶, Guillaume Geri⁷, Pascal Godmer⁸, Cécile Goujard⁹, Hervé Maisonneuve¹⁰, Arnaud Mari¹¹, Jacques Pouchot¹², Jean-Marc Ziza¹³, Cédric Bretonnière^{14,15} and Mohamed Hamidou¹

Abstract

Background: Adult-onset Still disease (AOSD) is a rare systemic inflammatory disorder. A few patients develop organ complications that can be life-threatening. Our objectives were to describe the disease course and phenotype of life-threatening AOSD, including response to therapy and long-term outcome.

Methods: A multicenter case series of intensive care medicine (ICU) patients with life-threatening AOSD and a systematic literature review.

Results: Twenty patients were included. ICU admission mostly occurred at disease onset (90%). Disease manifestations included fever (100%), sore throat (65%), skin rash (65%), and arthromyalgia (55%). Serum ferritin was markedly high (median: 29,110 ng/mL). Acute respiratory failure, shock and multiple organ failure occurred in 15 (75%), 10 (50%), and 7 (35%) cases, respectively. Hemophagocytosis was demonstrated in eight cases. Two patients died. Treatment delay was significant. All patients received corticosteroids. Response rate was 50%. As second-line, intravenous immunoglobulins were ineffective. Anakinra was highly effective. After ICU discharge, most patients required additional treatment. Literature analysis included 79 cases of AOSD with organ manifestations, which mainly included reactive hemophagocytic syndrome (42%), acute respiratory failure (34%), and cardiac complications (23%). Response rate to corticosteroids was 68%. Response rates to IVIGs, cyclosporin, and anakinra were 50%, 80%, and 100%, respectively.

Conclusions: AOSD should be recognized as a rare cause of sepsis mimic in patients with fever of unknown origin admitted to the ICU. The diagnosis relies on a few simple clinical clues. Early intensive treatment may be discussed. IVIGs should be abandoned. Long-term prognosis is favorable.

Keywords: Adult onset Still disease, Reactive hemophagocytic syndrome, Shock, Differential diagnosis, Anakinra, Cyclosporin, Intravenous immunoglobulins, ICU

* Correspondence: anaïs.wahbi@gmail.com

†Equal contributors

¹Service de Médecine Interne, PHU3, CHU Hôtel-Dieu, 44093 Nantes, France
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Article 9. Predicting early prognosis of pneumocystis pneumonia in HIV and non-HIV patients: The AlveoPNeumo Score.

Soumis à Intensive Care Medicine

BJ.Gaborit, **B.Tessoulin**, F.Moriot, RM Lavergne, R.Lecomte, P.Leturnier, L.Khatchatourian, C.Bretonnière, N.Asseray, C.Garret, M.Vourch, D.Marest, C.Sagan, F.Raffi, D.Boutoille, J.Reignier

Résumé:

Dans cette étude prospective monocentrique, nous avons étudié les pneumopathies à *Pneumocystis jirovecii*, dont la survenue est associée à une morbi-mortalité importante dans les populations immunodéprimées. L'objectif de l'étude était la construction d'un score pronostic précoce permettant d'identifier les patients les plus graves, qui nécessitent une admission en unité de soins continu (USC). Cette étude, menée au CHU de Nantes incluait tous les patients avec un diagnostic de Pneumocystose, la gravité clinique était définie comme une hypoxémie aiguë avec besoins hauts en oxygène ($FiO_2 > 50\%$). Nous avons analysé les variables prédictives par régression logistique dans la population globale et la population non-HIV. 107 patients ont été inclus en 4 ans, dont 53 avaient des critères de gravité (49.5%) et dont 42% sont décédés dans les 3 premiers mois après leur diagnostic. L'immunodépression était secondaire à une hémopathie maligne (32%), une transplantation d'organe (23%), une infection VIH (18%), une pathologie systémique (11%) ou une tumeur solide (11%). Les facteurs de risque associés à la sévérité étaient l'âge supérieur à 55 ans (Odds Ratio [OR]=2.6, $p < 0.02$), l'hypo-albuminémie $< 27\text{g/L}$ (OR=3.3, $p < 0.001$), la polynucléose neutrophile dans le sang $> 6.5\text{G/L}$ (OR=6.5, $p = 5.5e-7$) et dans le liquide broncho-alvéolaire (BAL) $> 12\%$ (OR=5.7, $p < 0.5e-4$), le score SOFA score > 5 (OR=12, $p < 0.0001$) Les facteurs de protection étaient la séropositivité VIH (OR=0.33, $p = 0.05$), et l'alvéolite sur le BAL (OR = 0.3, $p = 0.01$). En analyse multivariée, deux facteurs étaient associés à la survie à J90 : la tachypnée sous oxygénothérapie haut-débit et le score SOFA ≥ 5 à l'admission en USC. Un score pronostic a été construit à partir de ces variables, les patients présentant un SOFA ≥ 5 et une tachypnée ont deux fois plus de risque de décéder spécifiquement de leur infection que les autres.

- Une étude prospective est lancée pour valider ce score auprès d'autres services d'USC.

Title: Predicting early prognosis of pneumocystis pneumonia in HIV and non-HIV patients: The AlveoPNeumo Score.

Authors: BJ.Gaborit¹, B.Tessoulin², F.Moriot³, RM Lavergne³, R.Lecomte¹, P.Leturnier¹, L.Khatchatourian¹, C.Bretonnière⁴, N.Asseray¹, C.Garret⁴, M.Vourch⁴, D.Marest⁴, C.Sagan⁵, F.Raffi¹, D.Boutoille¹, J.Reignier⁴.

Affiliations :

1. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Nantes and CIC 1413, INSERM, Nantes, France.

2. INSERM, Unité Mixte de Recherche 892, Nantes, France; Université de Nantes, Nantes, France; Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6299, Nantes, France; Service d'Hématologie, Centre Hospitalo-Universitaire Nantes, Nantes, France

3. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU Nantes, Nantes, France.

4. CHU Nantes, PHU3, Medical Intensive Care Unit, place A. Ricordeau, Nantes, F-44093, France ; Nantes University, UPRES EA 3826, Laboratory of clinical and experimental therapeutics of infections, IRS2-Nantes Biotech, F-44200, France.

5. INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France.

First Correspondence :

Benjamin Gaborit Department of Infectious Diseases, University Hospital of Nantes and CIC 1413, INSERM, Nantes, France.

Telephone number : 00332 40 08 33 15

Fax number : 00332 40 08 33 09

E-mail: Benjamin.gaborit@chu-nantes.fr

Article 10. BH3 mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3 mimetics in myeloma treatment.

En révision, Blood 2018

Gomez-Bougie P^{1,2}, Tessoulin B^{*1,2}, Maiga S^{*1,2}, Bourcier J^{#1}, Bonnet A^{#1,2}, Tessoulin B¹, Rodriguez M³, Le Gouill S^{1,2}, Touzeau C^{1,2}, Moreau P^{1,2}, Pellat-Deceunynck C¹, Amiot M^{1,2}

Résumé:

Les BH3 mimétiques représentent à la fois une stratégie thérapeutique contemporaine et d'avenir pour les hémopathies malignes, favorisant le relargage de facteurs pro-apoptotiques de la famille BCL2. D'après des données issues majoritairement des HMCLs, le MM repose principalement sur MCL1 pour sa survie. Nous avons utilisé une « boîte à outils BH3 » pour étudier la dépendance (BCL2, BCL-XL ou MCL1) de 60 patients atteints de MM au diagnostic et à la rechute. Afin de déterminer les groupes de réponse et de dépendances avec l'utilisation d'un nombre réduit de doses de chaque BH3-mimétique, une analyse de densité consolidée par k-means a été réalisée. Alors que la dépendance à BCL2 est importante au diagnostic et à la rechute (52% et 41%, principalement dans le groupe CCND1), la dépendance à MCL1 est plus fréquente à la rechute (69% vs 33%), suggérant une plasticité cellulaire favorisant MCL1. La dépendance à BCLXL est mineure, au diagnostic et à la rechute. Par ailleurs, nous identifions un groupe de patients non dépendant aux BH3 mimétiques utilisés, principalement dans le groupe sans translocation. D'un point de vue mécanistique, nous démontrons la dépendance du MCL1 mimétique A1210477 à BAK pour induire la perméabilisation mitochondriale. L'ensemble de nos résultats supporte l'utilisation du venetoclax (BCL2 mimétique) et d'un MCL1 mimétique pour une évaluation clinique au diagnostic et à la rechute, avec la réalisation conjointe de ce test compagnon cytologique simple.

Références

- Abdouni, H.S., King, J.J., Ghorbani, A., Fifield, H., Berghuis, L., and Larijani, M. (2018). DNA/RNA hybrid substrates modulate the catalytic activity of purified AID. *Mol. Immunol.* **93**, 94-106.
- Affer, M., Chesi, M., Chen, W.D., Keats, J.J., Demchenko, Y.N., Tamizhmani, K., Garbitt, V.M., Riggs, D.L., Brents, L.A., Roschke, A.V., et al. (2014). Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* **28**, 1725-1735.
- Agirre, X., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Larráyoz, M.J., Lahortiga, I., Valgañón, M., García-Delgado, M., and Vizmanos, J.L. (2003). TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol. Carcinog.* **38**, 201-208.
- Alagpulinsa, D.A., Ayyadevara, S., Yaccoby, S., and Reis, R.J.S. (2016). A Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Dinaciclib, Impairs Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to PARP Inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 241-250.
- Alexandrova, E.M., and Moll, U.M. (2012). Role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma* **53**, 2116-2129.
- Álvarez-Prado, Á.F., Pérez-Durán, P., Pérez-García, A., Benguria, A., Torroja, C., Yébenes, V.G. de, and Ramiro, A.R. (2018). A broad atlas of somatic hypermutation allows prediction of activation-induced deaminase targets. *J. Exp. Med.* **215**, 761-771.
- Alzrigat, M., Párraga, A.A., Agarwal, P., Zureigat, H., Österborg, A., Nahi, H., Ma, A., Jin, J., Nilsson, K., Öberg, F., et al. (2016). EZH2 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *Oncotarget* **8**, 10213-10224.
- Amariglio, N., and Rechavi, G. (1993). Insertional mutagenesis by transposable elements in the mammalian genome. *Environ. Mol. Mutagen.* **21**, 212-218.
- An, G., Li, Z., Tai, Y.-T., Acharya, C., Li, Q., Qin, X., Yi, S., Xu, Y., Feng, X., Li, C., et al. (2015). The Impact of Clone Size on the Prognostic Value of Chromosome Aberrations by Fluorescence In Situ Hybridization in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2148-2156.
- Andrysik, Z., Galbraith, M.D., Guarnieri, A.L., Zaccara, S., Sullivan, K.D., Pandey, A., MacBeth, M., Inga, A., and Espinosa, J.M. (2017). Identification of a core TP53 transcriptional program with highly distributed tumor suppressive activity. *Genome Res.* **27**, 1645-1657.
- 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- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* **12**, 115-130.

- Aoubala, M., Murray-Zmijewski, F., Khoury, M.P., Fernandes, K., Perrier, S., Bernard, H., Prats, A.-C., Lane, D.P., and Bourdon, J.-C. (2011). p53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 18, 248-258.
- Arai, N., Nomura, D., Yokota, K., Wolf, D., Brill, E., Shohat, O., and Rotter, V. (1986). Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3232-3239.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N. Engl. J. Med.* 335, 91-97.
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., et al. (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 376, 1311-1320.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.-L., and Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 98, 3082-3086.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Minvielle, S., and Bataille, R. (2002). Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 99, 2185-2191.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., et al. (2007). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 109, 3489-3495.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.
- 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.
- Balakumaran, A., Robey, P.G., Fedarko, N., and Landgren, O. (2010). Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10, 465-480.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., and Prives, C. (2002). The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* 21, 9-21.

Barlogie, B., Alexanian, R., Dicke, K.A., Zagars, G., Spitzer, G., Jagannath, S., and Horwitz, L. (1987). High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood* 70, 869-872.

Barretina, J., Taylor, B.S., Banerji, S., Ramos, A.H., Lagos-Quintana, M., Decarolis, P.L., Shah, K., Socci, N.D., Weir, B.A., Ho, A., et al. (2010). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* 42, 715-721.

Bassères, D.S., and Baldwin, A.S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25, 6817-6830.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol. Rev.* 247, 172-183.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172-184.

Baughn, L.B., Liberto, M.D., Wu, K., Toogood, P.L., Louie, T., Gottschalk, R., Niesvizky, R., Cho, H., Ely, S., Moore, M.A.S., et al. (2006). A Novel Orally Active Small Molecule Potently Induces G1 Arrest in Primary Myeloma Cells and Prevents Tumor Growth by Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4/6. *Cancer Res.* 66, 7661-7667.

Baz, R.C., Martin, T.G., Lin, H.-Y., Zhao, X., Shain, K.H., Cho, H.J., Wolf, J.L., Mahindra, A., Chari, A., Sullivan, D.M., et al. (2016). Randomized multicenter phase 2 study of pomalidomide, cyclophosphamide, and dexamethasone in relapsed refractory myeloma. *Blood* 127, 2561-2568.

Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A.J. (2010). The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001198.

Ben David, Y., Prideaux, V.R., Chow, V., Benchimol, S., and Bernstein, A. (1988). Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* 3, 179-185.

Bergsagel, D.E., Sprague, C.C., Austin, C., and Griffith, K.M. (1962). Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. IV. L-Phenylalanine mustard (NSC-8806). *Cancer Chemother. Rep.* 21, 87-99.

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.

Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol. Cell. Biol.* 24, 985-996.

Bieging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 359-370.

Blanes, M., Lahuerta, J.J., González, J.D., Ribas, P., Solano, C., Alegre, A., Bladé, J., San Miguel, J.F., Sanz, M.A., and de la Rubia, J. (2013). Intravenous busulfan and melphalan as a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a matched comparison to a melphalan-only approach. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 19, 69-74.

Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., and Tarlinton, D.M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* 201, 545-554.

Blokhin, N., Larionov, L., Perevodchikova, N., Chebotareva, L., and Merkulova, N. (1958). [Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 68, 1128-1132.

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

Bolli, N., Li, Y., Sathiaselan, V., Raine, K., Jones, D., Ganly, P., Cocito, F., Bignell, G., Chapman, M.A., Sperling, A.S., et al. (2016). A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 6, e467.

Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., and Stark, G.R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 975-990.

Boudreault, J.-S., Touzeau, C., and Moreau, P. (2017). Triplet combinations in relapsed/refractory myeloma: update on recent phase 3 trials. *Expert Rev. Hematol.* 10, 207-215.

Bourdon, J.-C., Khoury, M.P., Diot, A., Baker, L., Fernandes, K., Aoubala, M., Quinlan, P., Purdie, C.A., Jordan, L.B., Prats, A.-C., et al. (2011). p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R7.

Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S.S., Johnson, T.M., Jarvis, L.A., Kozak, M.M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E.J., McLaughlin, M.E., et al. (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* 145, 571-583.

Brooks, C.L., Li, M., Hu, M., Shi, Y., and Gu, W. (2007). The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26, 7262-7266.

Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2002). Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 23, 2011-2018.

Carrasco, D.R., Tonon, G., Huang, Y., Zhang, Y., Sinha, R., Feng, B., Stewart, J.P., Zhan, F., Khatry, D., Protopopova, M., et al. (2006). High-resolution genomic profiles

define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 9, 313-325.

Carreras, E., Rosiñol, L., Terol, M.J., Alegre, A., de Arriba, F., García-Laraña, J., Bello, J.L., García, R., León, A., Martínez, R., et al. (2007). Veno-occlusive disease of the liver after high-dose cytoreductive therapy with busulfan and melphalan for autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma patients. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 13, 1448-1454.

Cavo, M., Petrucci, M.T., Raimondo, F.D., Zamagni, E., Gamberi, B., Crippa, C., Marzocchi, G., Grasso, M., Ballanti, S., Vincelli, D.I., et al. (2016). Upfront Single Versus Double Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Intergroup, Multicenter, Phase III Study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM Trial). *Blood* 128, 991-991.

Ceccaldi, R., Sarangi, P., and D'Andrea, A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 337-349.

Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 295-304.

Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., and Poon, R.Y.C. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell. Biol.* 24, 3536-3551.

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

Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D.W., and Anderson, K.C. (1997). Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 89, 227-234.

Chavan, S.S., He, J., Tytarenko, R., Deshpande, S., Patel, P., Bailey, M., Stein, C.K., Stephens, O., Weinhold, N., Petty, N., et al. (2017). Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying RB1 as an independent prognostic marker. *Blood Cancer J.* 7, e535.

Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005a). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.

Chen, Q., Van der Sluis, P.C., Boulware, D., Hazlehurst, L.A., and Dalton, W.S. (2005b). The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 106, 698-705.

Chesi, M., Nardini, E., Lim, R.S., Smith, K.D., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (1998). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92, 3025-3034.

Chesi, M., 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.

Chi, P., Allis, C.D., and Wang, G.G. (2010). Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 10, 457-469.

Chng, W.J., and Fonseca, R. (2008). Cell lines of hyperdiploid myeloma, are we there yet? *Br. J. Haematol.* 140, 579-581.

Chng, W., Gonzalez-Paz, N., Price-Troska, T., Jacobus, S., Rajkumar, S., Oken, M., Kyle, R., Henderson, K., Van Wier, S., Greipp, P., et al. (2008a). Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 22.

Chng, W., Huang, G., Chung, T., Ng, S., Gonzalez-Paz, N., Troska-Price, T., Mulligan, G., Chesi, M., Bergsagel, P., and Fonseca, R. (2011). Clinical and Biological Implications of MYC Activation: A common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 25, 1026-1035.

Chng, W.J., Braggio, E., Mulligan, G., Bryant, B., Remstein, E., Valdez, R., Dogan, A., and Fonseca, R. (2008b). The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood* 111, 1603-1609.

Chng, W.J., Chung, T.-H., Kumar, S., Usmani, S., Munshi, N., Avet-Loiseau, H., Goldschmidt, H., Durie, B., and Sonneveld, P. (2016). Gene signature combinations improve prognostic stratification of multiple myeloma patients. *Leukemia* 30, 1071-1078.

Choi, M., Kipps, T., and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* 15, 1781-1791.

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.

Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., et al. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353-360.

Chung, T.-H., Mulligan, G., Fonseca, R., and Chng, W.J. (2013). A novel measure of chromosome instability can account for prognostic difference in multiple myeloma. *PLoS One* 8, e66361.

Cohen, A.D., Garfall, A.L., Stadtmauer, E.A., Lacey, S.F., Lancaster, E., Vogl, D.T., Weiss, B.M., Ambrose, D.E., Nelson, A.M., Chen, F., et al. (2017). Safety and Efficacy of B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) with Cyclophosphamide Conditioning for Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood* 130, 505-505.

Cota, R.R., Teixidó-Travesa, N., Ezquerro, A., Eibes, S., Lacasa, C., Roig, J., and Lüders, J. (2017). MZT1 regulates microtubule nucleation by linking γ TuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. *J. Cell Sci.* 130, 406-419.

Cottini, F., Hideshima, T., Suzuki, R., Tai, Y.-T., Bianchini, G., Richardson, P.G., Anderson, K.C., and Tonon, G. (2015). Synthetic lethal approaches exploiting DNA damage in aggressive myeloma. *Cancer Discov.* 5, 972-987.

Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.-G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M., and Hainaut, P. (2002). DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* 21, 6722-6728.

Cox, C., Bignell, G., Greenman, C., Stabenau, A., Warren, W., Stephens, P., Davies, H., Watt, S., Teague, J., Edkins, S., et al. (2005). A survey of homozygous deletions in human cancer genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4542-4547.

Cunningham, D., Paz-Ares, L., Milan, S., Powles, R., Nicolson, M., Hickish, T., Selby, P., Treleavan, J., Viner, C., and Malpas, J. (1994). High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12, 759-763.

Dai, C., and Gu, W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 16, 528-536.

Damaj, G., Malard, F., Hulin, C., Caillot, D., Garidi, R., Royer, B., Marit, G., Stoppa, A.M., Banos, A., Morineau, N., et al. (2012). Efficacy of bendamustine in relapsed/refractory myeloma patients: results from the French compassionate use program. *Leuk. Lymphoma* 53, 632-634.

Das, D.S., Das, A., Ray, A., Song, Y., Samur, M.K., Munshi, N.C., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2017). Blockade of Deubiquitylating Enzyme USP1 Inhibits DNA Repair and Triggers Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 4280-4289.

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

De Rocco, D., Bottega, R., Cappelli, E., Cavani, S., Criscuolo, M., Nicchia, E., Corsolini, F., Greco, C., Borriello, A., Svahn, J., et al. (2014). Molecular analysis of Fanconi anemia: the experience of the Bone Marrow Failure Study Group of the Italian Association of Pediatric Onco-Hematology. *Haematologica* 99, 1022-1031.

Debes-Marun, C.S., Dewald, G.W., Bryant, S., Picken, E., Santana-Dávila, R., González-Paz, N., Winkler, J.M., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., et al. (2003). Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 17, 427-436.

Decaux, O., Lodé, L., Magrangeas, F., Charbonnel, C., Gouraud, W., Jézéquel, P., Attal, M., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Bataille, R., et al. (2008). Prediction of

Survival in Multiple Myeloma Based on Gene Expression Profiles Reveals Cell Cycle and Chromosomal Instability Signatures in High-Risk Patients and Hyperdiploid Signatures in Low-Risk Patients: A Study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J. Clin. Oncol.* 26, 4798-4805.

Dell'Orso, S., Fontemaggi, G., Stambolsky, P., Goeman, F., Voellenkle, C., Levrero, M., Strano, S., Rotter, V., Oren, M., and Blandino, G. (2011). ChIP-on-chip analysis of in vivo mutant p53 binding to selected gene promoters. *Omics J. Integr. Biol.* 15, 305-312.

Demchenko, Y.N., and Kuehl, W.M. (2010). A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 1, 59-68.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science* 274, 430-432.

Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: The mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191-202.

Díaz-Rodríguez, E., Álvarez-Fernández, S., Chen, X., Paiva, B., López-Pérez, R., García-Hernández, J.L., San Miguel, J.F., and Pandiella, A. (2011). Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. *PloS One* 6, e27583.

Dib, A., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., and Kuehl, W.M. (2007). Methylation and expression of the p16INK4A tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Blood* 109, 1337-1338.

Dickens, N.J., Walker, B.A., Leone, P.E., Johnson, D.C., Brito, J.L., Zeisig, A., Jenner, M.W., Boyd, K.D., Gonzalez, D., Gregory, W.M., et al. (2010). Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 1856-1864.

Diehl, S.A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Haren, S.D. van, Kwakkenbos, M.J., Yasuda, E., Beaumont, T., Scheeren, F.A., and Spits, H. (2008). STAT3-Mediated Up-Regulation of BLIMP1 Is Coordinated with BCL6 Down-Regulation to Control Human Plasma Cell Differentiation. *J. Immunol.* 180, 4805-4815.

Dimopoulos, K., Gimsing, P., and Grønbæk, K. (2013). Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 91, 95-105.

Dimopoulos, M.A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N.J., Usmani, S.Z., Rabin, N., Orłowski, R.Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., et al. (2016). Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 1319-1331.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Jr, C.A.M., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Dötsch, V., Bernassola, F., Coutandin, D., Candi, E., and Melino, G. (2010). p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a004887.

Dousset, C., Maïga, S., Gomez-Bougie, P., Le Coq, J., Touzeau, C., Moreau, P., Le Gouill, S., Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Moreau-Aubry, A., et al. (2016). BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*

Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Krömer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., et al. (1998). Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 92, 802-809.

Drexler, H.G., and Matsuo, Y. (2000). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk. Res.* 24, 681-703.

Durie, B.G.M., Kyle, R.A., Belch, A., Bensinger, W., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Comenzo, R., Djulbegovic, B., Fantl, D., et al. (2003). Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* 4, 379-398.

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

Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 8763-8767.

Elnenaï, M.O., Gruszka-Westwood, A.M., A'Hernt, R., Matutes, E., Sirohi, B., Powles, R., and Catovsky, D. (2003). Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* 88, 529-537.

Engeland, K. (2018). Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* 25, 114-132.

Ezponda, T., Dupéré-Richer, D., Will, C.M., Small, E.C., Varghese, N., Patel, T., Nabet, B., Popovic, R., Oyer, J., Bulic, M., et al. (2017). UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. *Cell Rep.* 21, 628-640.

Facon, T., Mary, J.Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J.L., Guillemin, G., Chaletteix, C., et al. (2007). Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *The Lancet* 370, 1209-1218.

Facon, T., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J.V., Belch, A., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N.J., et al. (2018). Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma. *Blood* 131, 301-310.

Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* *57*, 1083-1093.

Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L., and Engeland, K. (2016). The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* *44*, 164-174.

Flaman, J.M., Waridel, F., Estreicher, A., Vannier, A., Limacher, J.M., Gilbert, D., Iggo, R., and Frebourg, T. (1996). The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* *12*, 813-818.

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.

Foo, R.S.-Y., Chan, L.K.W., Kitsis, R.N., and Bennett, M.R. (2007a). Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2. *J. Biol. Chem.* *282*, 5529-5535.

Foo, R.S.-Y., Nam, Y.-J., Ostreicher, M.J., Metzli, M.D., Whelan, R.S., Peng, C.-F., Ashton, A.W., Fu, W., Mani, K., Chin, S.-F., et al. (2007b). Regulation of p53 tetramerization and nuclear export by ARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20826-20831.

Gajjar, M., Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., and Fåhræus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell* *21*, 25-35.

Garderet, L., Beohou, E., Caillot, D., Stoppa, A.M., Touzeau, C., Chretien, M.L., Karlin, L., Moreau, P., Fontan, J., Blaise, D., et al. (2016). Upfront autologous stem cell transplantation for newly diagnosed elderly multiple myeloma patients: a prospective multicenter study. *Haematologica* *101*, 1390-1397.

Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., Lange, J. de, Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* *18*, 1239-1247.

Gertz, M.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Greipp, P.R., Litzow, M.R., Henderson, K.J., Wier, S.A.V., Ahmann, G.J., and Fonseca, R. (2005). Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* *106*, 2837-2840.

Giglia-Mari, G., and Sarasin, A. (2003). TP53 mutations in human skin cancers. *Hum. Mutat.* *21*, 217-228.

Girardini, J.E., Napoli, M., Piazza, S., Rustighi, A., Marotta, C., Radaelli, E., Capaci, V., Jordan, L., Quinlan, P., Thompson, A., et al. (2011). A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Cell* *20*, 79-91.

Gisselsson, D., Jin, Y., Lindgren, D., Persson, J., Gisselsson, L., Hanks, S., Sehic, D., Mengelbier, L.H., Øra, I., Rahman, N., et al. (2010). Generation of trisomies in cancer

cells by multipolar mitosis and incomplete cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20489-20493.

Göhler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., and Deppert, W. (2002). Specific Interaction of p53 with Target Binding Sites Is Determined by DNA Conformation and Is Regulated by the C-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 41192-41203.

Gong, J.-N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C.D., Garnier, J.-M., Khaw, S.L., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M.J., et al. (2016). Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood* *128*, 1834-1844.

Gonzalez-Paz, N., Chng, W.J., McClure, R.F., Blood, E., Oken, M.M., Van Ness, B., James, C.D., Kurtin, P.J., Henderson, K., Ahmann, G.J., et al. (2007). Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood* *109*, 1228-1232.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* *481*, 306-313.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127-1130.

Greipp, P.R., Miguel, J.S., Durie, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A., et al. (2005). International Staging System for Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* *23*, 3412-3420.

Grover, R., Sharathchandra, A., Ponnuswamy, A., Khan, D., and Das, S. (2011). Effect of mutations on the p53 IRES RNA structure: implications for de-regulation of the synthesis of p53 isoforms. *RNA Biol.* *8*, 132-142.

Gururajan, M., Haga, C.L., Das, S., Leu, C.-M., Hodson, D., Josson, S., Turner, M., and Cooper, M.D. (2010). MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. *Int. Immunol.* *22*, 583-592.

Haber, D., and Harlow, E. (1997). Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat. Genet.* *16*, 320-322.

Hanel, W., Marchenko, N., Xu, S., Yu, S.X., Weng, W., and Moll, U. (2013). Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* *20*, 898-909.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* *18*, 2195-2224.

Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 613-626.

Herrero, A.B., Rojas, E.A., Misiewicz-Krzeminska, I., Krzeminski, P., and Gutiérrez, N.C. (2016). Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 2003.

Hervioux, L., Kassambara, A., Boireau, S., Robert, N., Requirand, G., Vincent, L., Seckinger, A., Goldschmidt, H., Hose, D., Cavalli, G., et al. (2016). Targeting EZH2 in Multiple Myeloma Could be Promising for a Subgroup of MM Patients in Combination with IMiDs. *Blood* 128, 311-311.

Heuck, C.J., Mehta, J., Bhagat, T., Gundabolu, K., Yu, Y., Khan, S., Chrysofakis, G., Schinke, C., Tariman, J., Vickrey, E., et al. (2013). Myeloma Is Characterized by Stage-Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *J. Immunol.* 190, 2966-2975.

Heuck, C.J., Jethava, Y., Khan, R., Rhee, F. van, Zangari, M., Chavan, S., Robbins, K., Miller, S.E., Matin, A., Mohan, M., et al. (2016). Inhibiting MEK in MAPK pathway-activated myeloma. *Leukemia* 30, 976-980.

Hideshima, T., Ikeda, H., Chauhan, D., Okawa, Y., Raje, N., Podar, K., Mitsiades, C., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Carrasco, R.D., et al. (2009). Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114, 1046-1052.

Hillengass, J., Fechtner, K., Weber, M.-A., Bäuerle, T., Ayyaz, S., Heiss, C., Hielscher, T., Moehler, T.M., Egerer, G., Neben, K., et al. (2010). Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1606-1610.

Hinds, P., Finlay, C., and Levine, A.J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63, 739-746.

Hodge, D.R., Peng, B., Cherry, J.C., Hurt, E.M., Fox, S.D., Kelley, J.A., Munroe, D.J., and Farrar, W.L. (2005). Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 65, 4673-4682.

Hose, D., Rème, T., Hielscher, T., Moreaux, J., Messner, T., Seckinger, A., Benner, A., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., Zhou, Y., et al. (2011). Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica* 96, 87-95.

Hultcrantz, M. (2017). Genomic Landscape and Mechanisms of Disease Evolution and Progression in Multiple Myeloma. *Am. J. Hematol. Oncol.* 13.

Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Staudt, L.M. (2004). Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 5, 191-199.

Jaber, S., Toufektchan, E., Lejour, V., Bardot, B., and Toledo, F. (2016). p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nat. Commun.* 7, 11091.

Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2010). The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.

Joerger, A.C., Rajagopalan, S., Natan, E., Veprintsev, D.B., Robinson, C.V., and Fersht, A.R. (2009). Structural evolution of p53, p63, and p73: Implication for heterotetramer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 17705-17710.

Joerger, A.C., Wilcken, R., and Andreeva, A. (2014). Tracing the Evolution of the p53 Tetramerization Domain. *Struct. England* *1993* *22*, 1301-1310.

Jurczyszyn, A., Castillo, J.J., Avivi, I., Czepiel, J., Davila, J., Vij, R., Fiala, M.A., Gozzetti, A., Grząsko, N., Milunovic, V., et al. (2018). Secondary plasma cell leukemia: a multicenter retrospective study of 101 patients. *Leuk. Lymphoma* *0*, 1-6.

Kabashima, K., Haynes, N.M., Xu, Y., Nutt, S.L., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2006). Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J. Exp. Med.* *203*, 2683-2690.

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., et al. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* *90*, 809-819.

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.

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* *502*, 333-339.

Kastritis, E., Mouloupoulos, L.A., Terpos, E., Koutoulidis, V., and Dimopoulos, M.A. (2014). The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia* *28*, 2402-2403.

Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., and Ishioka, C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8424-8429.

Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., and Tanaka, H. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* *332*, 83-85.

Keats, J.J., Chesi, M., Egan, J.B., Garbitt, V.M., Palmer, S.E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P.R., Baker, A.S., Dispenzieri, A., et al. (2012). Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* *120*, 1067-1076.

Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* *256*, 827-830.

Kim, M.P., and Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ.* 25, 161-168.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761-763.

Klusmann, I., Rodewald, S., Müller, L., Friedrich, M., Wienken, M., Li, Y., Schulz-Heddergott, R., and Dobbelstein, M. (2016). p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. *Cell Rep.* 17, 1845-1857.

Konishi, H., Mohseni, M., Tamaki, A., Garay, J.P., Croessmann, S., Karnan, S., Ota, A., Wong, H.Y., Konishi, Y., Karakas, B., et al. (2011). Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17773-17778.

Kristinsson, S.Y., Holmberg, E., and Blimark, C. (2013). Treatment for high-risk smoldering myeloma. *N. Engl. J. Med.* 369, 1762-1763.

Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.

Kuiper, R., Broyl, A., de Knecht, Y., van Vliet, M.H., van Beers, E.H., van der Holt, B., el Jarari, L., Mulligan, G., Gregory, W., Morgan, G., et al. (2012). A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 26, 2406-2413.

Kuiper, R., Duin, M. van, Vliet, M.H. van, Broijl, A., Holt, B. van der, Jarari, L. el, Beers, E.H. van, Mulligan, G., Avet-Loiseau, H., Gregory, W.M., et al. (2015). Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood* 126, 1996-2004.

Kumar, A., Priya, A., Ahmed, T., Grundström, C., Negi, N., and Grundström, T. (2018). Regulation of the DNA Repair Complex during Somatic Hypermutation and Class-Switch Recombination. *J. Immunol.* 200, 4146-4156.

Kumar, S.K., Dingli, D., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Rajkumar, S.V., Litzow, M.R., and Gertz, M.A. (2008). Autologous stem cell transplantation in patients of 70 years and older with multiple myeloma: Results from a matched pair analysis. *Am. J. Hematol.* 83, 614-617.

Kung, G., Dai, P., Deng, L., and Kitsis, R.N. (2014). A novel role for the apoptosis inhibitor ARC in suppressing TNF α -induced regulated necrosis. *Cell Death Differ.* 21, 634-644.

Kyle, R.A., and Greipp, P.R. (1980). Smoldering Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 302, 1347-1349.

Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 23, 3-9.

Ladetto, M., Pagliano, G., Ferrero, S., Cavallo, F., Drandi, D., Santo, L., Crippa, C., De Rosa, L., Pregno, P., Grasso, M., et al. (2010). Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and

dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 2077-2084.

Laganà, A., Perumal, D., Melnekoff, D., Readhead, B., Kidd, B.A., Leshchenko, V., Kuo, P.-Y., Keats, J., DeRome, M., Yesil, J., et al. (2018). Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 32, 120-130.

Lambert, J.M.R., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Söderqvist, M., Segerbäck, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J.N. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 15, 376-388.

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.

Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.-A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 861-872.

Laptenko, O., Shiff, I., Freed-Pastor, W., Zupnick, A., Mattia, M., Freulich, E., Shamir, I., Kadouri, N., Kahan, T., Manfredi, J., et al. (2015). The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Mol. Cell* 57, 1034-1046.

Larrea, C.F. de, Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Ludwig, H., Usmani, S., Vesole, D.H., Hajek, R., Miguel, J.F.S., Sezer, O., Sonneveld, P., et al. (2013). Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 27, 780-791.

Larsen, J.T., Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Kyle, R.A., Katzmann, J.A., and Rajkumar, S.V. (2013). Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 27, 941-946.

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

Laurie, N.A., Donovan, S.L., Shih, C.-S., Zhang, J., Mills, N., Fuller, C., Teunisse, A., Lam, S., Ramos, Y., Mohan, A., et al. (2006). Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 444, 61-66.

Lazo, P.A. (2017). Reverting p53 activation after recovery of cellular stress to resume with cell cycle progression. *Cell. Signal.* 33, 49-58.

Leonova, K., Safina, A., Nesher, E., Sandlesh, P., Pratt, R., Burkhart, C., Lipchick, B., Gitlin, I., Frangou, C., Koman, I., et al. (2018). TRAIN (Transcription of Repeats Activates INterferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. *ELife* 7, e30842.

Leonova, K.I., Brodsky, L., Lipchick, B., Pal, M., Novototskaya, L., Chenchik, A.A., Sen, G.C., Komarova, E.A., and Gudkov, A.V. (2013). p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E89-98.

Leroy, B., Anderson, M., and Soussi, T. (2014). TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum. Mutat.* 35, 672-688.

Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749-758.

Li, D., Marchenko, N.D., Schulz, R., Fischer, V., Velasco-Hernandez, T., Talos, F., and Moll, U.M. (2011). Functional Inactivation of Endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 Causes Aberrant Stabilization of Mutant p53 in Human Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* 9, 577-588.

Li, H., Kaminski, M.S., Li, Y., Yildiz, M., Ouillette, P., Jones, S., Fox, H., Jacobi, K., Saiya-Cork, K., Bixby, D., et al. (2014). Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 123, 1487-1498.

Li, X., Pennisi, A., Zhan, F., Sawyer, J.R., Shaughnessy, J.D., and Yaccoby, S. (2007). Establishment and exploitation of hyperdiploid and non-hyperdiploid human myeloma cell lines. *Br. J. Haematol.* 138, 802-811.

Li, Y.-Z., Lu, D.-Y., Tan, W.-Q., Wang, J.-X., and Li, P.-F. (2008). p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC. *Mol. Cell. Biol.* 28, 564-574.

Lin, K.I., Lin, Y., and Calame, K. (2000). Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8684-8695.

Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc Transcription by Blimp-1, an Inducer of Terminal B Cell Differentiation. *Science* 276, 596-599.

Linzer, D.I.H., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

Lionetti, M., Barbieri, M., Manzoni, M., Fabris, S., Bandini, C., Todoerti, K., Nozza, F., Rossi, D., Musto, P., Baldini, L., et al. (2016). Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* 7, 21353-21361.

Liu, D.S., Duong, C.P., Haupt, S., Montgomery, K.G., House, C.M., Azar, W.J., Pearson, H.B., Fisher, O.M., Read, M., Guerra, G.R., et al. (2017). Inhibiting the system xc^- /glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat. Commun.* 8, 14844.

Liu, K., Ling, S., and Lin, W.-C. (2011). TopBP1 mediates mutant p53 gain of function through NF-Y and p63/p73. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4464-4481.

Liu, Y., Chen, C., Xu, Z., Scuoppo, C., Rillaan, C.D., Gao, J., Spitzer, B., Bosbach, B., Kasthuber, E.R., Baslan, T., et al. (2016). Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature* 531, 471-475.

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.

Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., et al. (2014). Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Cell* 25, 91-101.

López-Corral, L., Gutiérrez, N.C., Vidriales, M.B., Mateos, M.V., Rasillo, A., García-Sanz, R., Paiva, B., and Miguel, J.F.S. (2011). The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 1692-1700.

López-Corral, L., Mateos, M.V., Corchete, L.A., Sarasquete, M.E., Rubia, J. de la, Arriba, F. de, Lahuerta, J.-J., García-Sanz, R., Miguel, J.F.S., and Gutiérrez, N.C. (2012). Genomic analysis of high-risk smoldering multiple myeloma. *Haematologica* 97, 1439-1443.

Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Gouraud, W., Lodé, L., Decaux, O., Godmer, P., Garderet, L., Voillat, L., Facon, T., Stoppa, A.M., et al. (2013). Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 27, 473-481.

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.

Mailankody, S., Kazandjian, D., Korde, N., Roschewski, M., Manasanch, E., Bhutani, M., Tajeja, N., Kwok, M., Zhang, Y., Zingone, A., et al. (2017). Baseline mutational patterns and sustained MRD negativity in patients with high-risk smoldering myeloma. *Blood Adv.* 1, 1911-1918.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238.

Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I.M., and Roccaro, A.M. (2012). Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.

Manier, S., Salem, K.Z., Park, J., Landau, D.A., Getz, G., and Ghobrial, I.M. (2017). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 100-113.

Mantovani, A., and Garlanda, C. (2006). Inflammation and multiple myeloma: the Toll connection. *Leukemia* 20, 937-938.

Marcel, V., Petit, I., Murray-Zmijewski, F., Gouillet de Rugy, T., Fernandes, K., Meuray, V., Diot, A., Lane, D.P., Aberdam, D., and Bourdon, J.-C. (2012). Diverse p63 and p73 isoforms regulate $\Delta 133p53$ expression through modulation of the internal TP53 promoter activity. *Cell Death Differ.* 19, 816-826.

Marchesini, M., Ogoti, Y., Fiorini, E., Aktas Samur, A., Nezi, L., D'Anca, M., Storti, P., Samur, M.K., Ganan-Gomez, I., Fulciniti, M.T., et al. (2017). ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 32, 88-100.e6.

Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323-335.

Martin, S.K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D.J., and Zannettino, A.C.W. (2011). The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia* 25, 1533-1542.

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.

Mass, R.E. (1962). A comparison of the effect of prednisone and a placebo in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Chemother. Rep.* 16, 257-259.

Masuda, H., Mori, R., Yukawa, M., and Toda, T. (2013). Fission yeast MOZART1/Mzt1 is an essential γ -tubulin complex component required for complex recruitment to the microtubule organizing center, but not its assembly. *Mol. Biol. Cell* 24, 2894-2906.

Mateos, M.-V., Dimopoulos, M.A., Cavo, M., Suzuki, K., Jakubowiak, A., Knop, S., Doyen, C., Lucio, P., Nagy, Z., Kaplan, P., et al. (2018). Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 378, 518-528.

Matlashewski, G., Pim, D., Banks, L., and Crawford, L. (1987). Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res.* 1, 77-85.

Maura, F., Petljak, M., Lionetti, M., Cifola, I., Liang, W., Pinatel, E., Alexandrov, L.B., Fullam, A., Martincorena, I., Dawson, K.J., et al. (2018). Biological and prognostic impact of APOBEC-induced mutations in the spectrum of plasma cell dyscrasias and multiple myeloma cell lines. *Leukemia* 32, 1043-1047.

McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z., et al. (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* 66, 8109-8115.

McElwain, T.J., and Powles, R.L. (1983). High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet Lond. Engl.* 2, 822-824.

Meek, D.W., and Anderson, C.W. (2009). Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000950.

Melchor, L., Brioli, A., Wardell, C.P., Murison, A., Potter, N.E., Kaiser, M.F., Fryer, R.A., Johnson, D.C., Begum, D.B., Wilson, S.H., et al. (2014). Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 28, 1705-1715.

Merz, M., Jauch, A., Hielscher, T., Bochtler, T., Schönland, S.O., Seckinger, A., Hose, D., Bertsch, U., Neben, K., Raab, M.S., et al. (2018). Prognostic significance of cytogenetic heterogeneity in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv.* 2, 1-9.

Moll, U.M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 1001-1008.

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.

Moreau, P., Facon, T., Attal, M., Hulin, C., Michallet, M., Maloisel, F., Sotto, J.-J., Guilhot, F., Marit, G., Doyen, C., et al. (2002). Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myélome 9502 randomized trial. *Blood* 99, 731-735.

Moreau, P., Avet-Loiseau, H., Facon, T., Attal, M., Tiab, M., Hulin, C., Doyen, C., Garderet, L., Randriamalala, E., Araujo, C., et al. (2011). Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 118, 5752-5758.

Moreau, P., Cavo, M., Sonneveld, P., Rosinol, L., Attal, M., Pezzi, A., Goldschmidt, H., Lahuerta, J.J., Marit, G., Palumbo, A., et al. (2014). Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 2173-2180.

Moreau, P., Hulin, C., Macro, M., Caillot, D., Chaletteix, C., Roussel, M., Garderet, L., Royer, B., Brechignac, S., Tiab, M., et al. (2016a). VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood* 127, 2569-2574.

Moreau, P., Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N.J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B.W., Jackson, S.R., et al. (2016b). Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 374, 1621-1634.

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.

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

Morselli, E., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Vicencio, J.M., Soussi, T., and Kroemer, G. (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 7, 3056-3061.

Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A., and Benchimol, S. (1985). Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* 314, 633-636.

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* 15, 2-8.

Neri, P., Ren, L., Gratton, K., Stebner, E., Johnson, J., Klimowicz, A., Duggan, P., Tassone, P., Mansoor, A., Stewart, D.A., et al. (2011). Bortezomib-induced "BRCAness" sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors. *Blood* 118, 6368-6379.

Neri, P., Duggan, P., Gratton, K., Ren, L., Johnson, J., Slaby, J., Stewart, D.A., Keats, J.J., and Bahlis, N.J. (2012). Phase I Study of the PARP1-2 Inhibitor Veliparib in Combination with Bortezomib in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Blood* 120, 1862-1862.

Nicolas, L., Cols, M., Choi, J.E., Chaudhuri, J., and Vuong, B. (2018). Generating and repairing genetically programmed DNA breaks during immunoglobulin class switch recombination. *F1000Research* 7, 458.

Niesvizky, R., Badros, A.Z., Costa, L.J., Ely, S.A., Singhal, S.B., Stadtmauer, E.A., Haideri, N.A., Yacoub, A., Hess, G., Lentzsch, S., et al. (2015). Phase 1/2 study of cyclin-dependent kinase (CDK)4/6 inhibitor palbociclib (PD-0332991) with bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 56, 3320-3328.

Nieto, M., Samper, E., Fraga, M.F., González de Buitrago, G., Esteller, M., and Serrano, M. (2004). The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* 23, 735-743.

Nieto, Y., Valdez, B.C., Pingali, S.R., Bassett, R., Delgado, R., Nguyen, J., Shah, N., Popat, U., Jones, R.B., Andersson, B.S., et al. (2017). High-dose gemcitabine, busulfan, and melphalan for autologous stem-cell transplant in patients with relapsed or refractory myeloma: a phase 2 trial and matched-pair comparison with melphalan. *Lancet Haematol.* 4, e283-e292.

Nikkilä, J., Parpys, A.C., Pylkäs, K., Bose, M., Huo, Y., Borgmann, K., Rapakko, K., Nieminen, P., Xia, B., Pospiech, H., et al. (2013). Heterozygous mutations in PALB2 cause DNA replication and damage response defects. *Nat. Commun.* 4, 2578.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

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

Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860.

Onodera, N., McCabe, N.R., and Rubin, C.M. (1992). Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 80, 203-208.

Oracki Sarah A., Walker Jennifer A., Hibbs Margaret L., Corcoran Lynn M., and Tarlinton David M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237, 140-159.

Orlowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.-L., Elliott, P.J., Pien, C.S., et al. (2002). Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 4420-4427.

Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H.M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J.J., Facon, T., et al. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* 33, 2863-2869.

Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A.K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M.V., et al. (2016). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 754-766.

Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.

Pavletich, N.P., Chambers, K.A., and Pabo, C.O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* 7, 2556-2564.

Pawarode, A., Mineishi, S., Reddy, P., Braun, T.M., Khaled, Y.A., Choi, S.W., Magenau, J.M., Harris, A.C., Connelly, J.A., Kitko, C.L., et al. (2016). Reducing Treatment-Related Mortality Did Not Improve Outcomes of Allogeneic Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for High-Risk Multiple Myeloma: A University of Michigan Prospective Series. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 22, 54-60.

Pawlyn, C., Melchor, L., Murison, A., Wardell, C.P., Brioli, A., Boyle, E.M., Kaiser, M.F., Walker, B.A., Begum, D.B., Dahir, N.B., et al. (2015). Coexistent hyperdiploidy does

not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood* 125, 831-840.

Pawlyn, C., Kaiser, M.F., Heuck, C., Melchor, L., Wardell, C.P., Murison, A., Chavan, S., Johnson, D.C., Begum, D., Dahir, N., et al. (2016). The spectrum and clinical impact of epigenetic modifier mutations in myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 5783-5794.

Pawlyn, C., Bright, M.D., Buros, A.F., Stein, C.K., Walters, Z., Aronson, L.I., Mirabella, F., Jones, J.R., Kaiser, M.F., Walker, B.A., et al. (2017a). Overexpression of *EZH2* in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J.* 7, e549.

Pawlyn, C., Bright, M.D., Buros, A.F., Stein, C.K., Walters, Z., Aronson, L.I., Mirabella, F., Jones, J.R., Kaiser, M.F., Walker, B.A., et al. (2017b). Overexpression of *EZH2* in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood Cancer J.* 7, e549.

Pawlyn, C., Loehr, A., Ashby, C., Tytarenko, R., Deshpande, S., Sun, J., Fedorchak, K., Mughal, T., Davies, F.E., Walker, B.A., et al. (2018). Loss of heterozygosity as a marker of homologous repair deficiency in multiple myeloma: a role for PARP inhibition? *Leukemia* 1.

Pellat-Deceunynk, C., Amiot, M., Bataille, R., Riet, I.V., Camp, B.V., Omede, P., and Boccadoro, M. (1995). Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after [letter]. *Blood* 86, 4001-4002.

Peng, X., Zhang, M.-Q.-Z., Conserva, F., Hosny, G., Selivanova, G., Bykov, V.J.N., Arnér, E.S.J., and Wiman, K.G. (2013). APR-246/PRIMA-1MET inhibits thioredoxin reductase 1 and converts the enzyme to a dedicated NADPH oxidase. *Cell Death Dis.* 4, e881.

Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). *TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26, 2157-2165.

Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., and Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21, 7435-7451.

Pichiorri, F., Suh, S.-S., Rocci, A., De Luca, L., Taccioli, C., Santhanam, R., Zhou, W., Benson, D.M., Hofmainster, C., Alder, H., et al. (2010). Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 18, 367-381.

Pogribny, I.P., Pogribna, M., Christman, J.K., and James, S.J. (2000). Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis. *Cancer Res.* 60, 588-594.

Puthier, D., Bataille, R., and Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol.* 29, 3945-3950.

Puzio-Kuter, A.M. (2011). The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes Cancer* 2, 385-391.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.

Quesnel, B., Preudhomme, C., Oscier, D., Lepelley, P., Hooghe, M.C., Facon, T., Zandecki, M., and Fenaux, P. Over-expression of the MDM2 gene is found in some cases of haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 88, 415-418.

Raj, N., and Attardi, L.D. (2017). The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7.

Rajkumar, S.V., Larson, D., and Kyle, R.A. (2011). Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 365, 474-475.

Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., et al. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15, e538-e548.

Ray, P.S., Grover, R., and Das, S. (2006). Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep.* 7, 404-410.

Rees, M.G., Seashore-Ludlow, B., Cheah, J.H., Adams, D.J., Price, E.V., Gill, S., Javaid, S., Coletti, M.E., Jones, V.L., Bodycombe, N.E., et al. (2016). Correlating chemical sensitivity and basal gene expression reveals mechanism of action. *Nat. Chem. Biol.* 12, 109-116.

Romagnoli, M., Desplanques, G., Maïga, S., Legouill, S., Dreano, M., Bataille, R., and Barillé-Nion, S. (2007). Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 6010-6018.

Roulois, D., Loo Yau, H., Singhanian, R., Wang, Y., Danesh, A., Shen, S.Y., Han, H., Liang, G., Jones, P.A., Pugh, T.J., et al. (2015). DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell* 162, 961-973.

Royer, B., Minvielle, S., Diouf, M., Roussel, M., Karlin, L., Hulin, C., Arnulf, B., Macro, M., Cailleres, S., Brion, A., et al. (2016). Bortezomib, Doxorubicin, Cyclophosphamide, Dexamethasone Induction Followed by Stem Cell Transplantation for Primary Plasma Cell Leukemia: A Prospective Phase II Study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 2125-2132.

Rustandi, R.R., Baldisseri, D.M., and Weber, D.J. (2000). Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta-beta). *Nat. Struct. Biol.* 7, 570-574.

Saldaña-Meyer, R., and Recillas-Targa, F. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* 6, 1068-1077.

Saldaña-Meyer, R., González-Buendía, E., Guerrero, G., Narendra, V., Bonasio, R., Recillas-Targa, F., and Reinberg, D. (2014). CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes Dev.* 28, 723-734.

Samur, M.K., Minvielle, S., Gulla, A., Fulciniti, M., Cleynen, A., Samur, A.A., Szalat, R., Shamma, M., Magrangeas, F., Tai, Y.-T., et al. (2018). Long intergenic non-coding RNAs have an independent impact on survival in multiple myeloma. *Leukemia* 1.

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

San-Miguel, J.F., Hungria, V.T.M., Yoon, S.-S., Beksac, M., Dimopoulos, M.A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W.W., Günther, A., Nakorn, T.N., Siritanaratkul, N., et al. (2016). Overall survival of patients with relapsed multiple myeloma treated with panobinostat or placebo plus bortezomib and dexamethasone (the PANORAMA 1 trial): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 3, e506-e515.

Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M.V., and Fersht, A.R. (2002). Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J. Mol. Biol.* 323, 491-501.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501-2514.

Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Lamy, L., Ngo, V.N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., et al. (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 454, 226-231.

Shankavaram, U.T., Varma, S., Kane, D., Sunshine, M., Chary, K.K., Reinhold, W.C., Pommier, Y., and Weinstein, J.N. (2009). CellMiner: a relational database and query tool for the NCI-60 cancer cell lines. *BMC Genomics* 10, 277.

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

Shaughnessy, J.D., Qu, P., Usmani, S., Heuck, C.J., Zhang, Q., Zhou, Y., Tian, E., Hanamura, I., van Rhee, F., Anaissie, E., et al. (2011). Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood* 118, 3512-3524.

Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat. Rev. Cancer* 6, 663-673.

Shvarts, A., Bazuine, M., Dekker, P., Ramos, Y.F.M., Steegenga, W.T., Merckx, G., van Ham, R.C.A., van der Houven van Oordt, W., van der Eb, A.J., and Jochemsen,

A.G. (1997). Isolation and Identification of the Human Homolog of a New p53-Binding Protein, Mdmx. *Genomics* 43, 34-42.

Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., et al. (1999). Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341, 1565-1571.

Smit, A.F. (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 657-663.

Sohn, E.J., Shin, M.J., Eum, W.S., Kim, D.W., Yong, J.I., Ryu, E.J., Park, J.H., Cho, S.B., Cha, H.J., Kim, S.J., et al. (2016). Tat-NOL3 protects against hippocampal neuronal cell death induced by oxidative stress through the regulation of apoptotic pathways. *Int. J. Mol. Med.* 38, 225-235.

Sonneveld, P., Goldschmidt, H., Rosiñol, L., Bladé, J., Lahuerta, J.J., Cavo, M., Tacchetti, P., Zamagni, E., Attal, M., Lokhorst, H.M., et al. (2013). Bortezomib-Based Versus Nonbortezomib-Based Induction Treatment Before Autologous Stem-Cell Transplantation in Patients With Previously Untreated Multiple Myeloma: A Meta-Analysis of Phase III Randomized, Controlled Trials. *J. Clin. Oncol.* 31, 3279-3287.

Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K.C., Chng, W.-J., Moreau, P., Attal, M., Kyle, R.A., et al. (2016). Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 127, 2955-2962.

Soumerai, J.D., Zelenetz, A.D., Moskowitz, C.H., Palomba, M.L., Hamlin, P.A., Noy, A., Straus, D.J., Moskowitz, A.J., Younes, A., Matasar, M.J., et al. (2017). The PARP Inhibitor Veliparib Can Be Safely Added to Bendamustine and Rituximab and Has Preliminary Evidence of Activity in B-Cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 4119-4126.

Soussi, T., and Wiman, K.G. (2015). TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* 22, 1239-1249.

Soussi, T., Caron de Fromentel, C., Méchali, M., May, P., and Kress, M. (1987). Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* 1, 71-78.

Soussi, T., Caron de Fromentel, C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.

Stambolsky, P., Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Siegfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., et al. (2010). Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 17, 273-285.

Stewart, A.K., Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., Hájek, R., Rosiñol, L., Siegel, D.S., Mihaylov, G.G., et al. (2015). Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma.

- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccharini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., et al. (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J. Biol. Chem.* 277, 18817-18826.
- Su, X., Chakravarti, D., Cho, M.S., Liu, L., Gi, Y.J., Lin, Y.-L., Leung, M.L., El-Naggar, A., Creighton, C.J., Suraokar, M.B., et al. (2010). *TAp63* suppresses metastasis through coordinate regulation of *Dicer* and miRNAs. *Nature* 467, 986-990.
- Sullivan, K.D., Galbraith, M.D., Andrysiak, Z., and Espinosa, J.M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* 25, 133-143.
- Surget, S., Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets Ther.* 7, 57-68.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529-533.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2301-2306.
- Swisher, E.M., Lin, K.K., Oza, A.M., Scott, C.L., Giordano, H., Sun, J., Konecny, G.E., Coleman, R.L., Tinker, A.V., O'Malley, D.M., et al. (2017). Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 18, 75-87.
- Sykes, S.M., Stanek, T.J., Frank, A., Murphy, M.E., and McMahon, S.B. (2009). Acetylation of the DNA Binding Domain Regulates Transcription-independent Apoptosis by p53. *J. Biol. Chem.* 284, 20197-20205.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — T_{FH} cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 412-426.
- 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.
- Teufel, D.P., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (2009). Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2. *Oncogene* 28, 2112-2118.
- Thomas, M., Pim, D., and Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690-7700.
- Tiedemann, R.E., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R.A., Santana-Davila, R., Price-Troska, T., Van Wier, S.A., Chng, W.J., Ketterling, R.P., Gertz, M.A., Henderson, K., et al. (2008). Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 22, 1044-1052.
- Tiedemann, R.E., Zhu, Y.X., Schmidt, J., Xin Shi, C., Sereduk, C., Yin, H., Mousses, S., and Stewart, A.K. (2012). Identification of molecular vulnerabilities in human

multiple myeloma cells by RNAi lethality screening of the druggable genome. *Cancer Res.* 72, 757-768.

Tikkanen, T., Leroy, B., Fournier, J.L., Risques, R.A., Malcikova, J., and Soussi, T. (2018). Seshat: A Web service for accurate annotation, validation, and analysis of TP53 variants generated by conventional and next-generation sequencing. *Hum. Mutat.* 39, 925-933.

Tong, Q., Mazur, S.J., Rincon-Arano, H., Rothbart, S.B., Kuznetsov, D.M., Cui, G., Liu, W.H., Gete, Y., Klein, B.J., Jenkins, L., et al. (2015). An acetyl-methyl switch drives a conformational change in p53. *Struct. Lond. Engl.* 1993 23, 322-331.

Tourigny, M.R., Ursini-Siegel, J., Lee, H., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Franklin, D.S., Ely, S., Chen, M., Qin, X.-F., Xiong, Y., et al. (2002). CDK inhibitor p18(INK4c) is required for the generation of functional plasma cells. *Immunity* 17, 179-189.

Touzeau, C., and Moreau, P. (2016). How I treat extramedullary myeloma. *Blood* 127, 971-976.

Trudel, S., Lendvai, N., Popat, R., Voorhees, P.M., Reeves, B., Libby, E.N., Richardson, P.G., Anderson, L., Sutherland, H., Yong, K., et al. (2017). Deep and Durable Responses in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM) Treated with Monotherapy GSK2857916, an Antibody Drug Conjugate Against B-Cell Maturation Antigen (BCMA): Preliminary Results from Part 2 of Study BMA117159. *Blood* 130, 741-741.

Tutt, A., Robson, M., Garber, J.E., Domchek, S.M., Audeh, M.W., Weitzel, J.N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R.K., et al. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet Lond. Engl.* 376, 235-244.

Usmani, S.Z., Heuck, C., Mitchell, A., Szymonifka, J., Nair, B., Hoering, A., Alsayed, Y., Waheed, S., Haider, S., Restrepo, A., et al. (2012). Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica* 97, 1761-1767.

Vaclová, T., Gómez-López, G., Setién, F., Bueno, J.M.G., Macías, J.A., Barroso, A., Urioste, M., Esteller, M., Benítez, J., and Osorio, A. (2015). DNA repair capacity is impaired in healthy *BRCA1* heterozygous mutation carriers. *Breast Cancer Res. Treat.* 152, 271-282.

Valente, L.J., Gray, D.H.D., Michalak, E.M., Pinon-Hofbauer, J., Egle, A., Scott, C.L., Janic, A., and Strasser, A. (2013). p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep.* 3, 1339-1345.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.

Walerych, D., Lisek, K., Sommaggio, R., Piazza, S., Ciani, Y., Dalla, E., Rajkowska, K., Gaweda-Walerych, K., Ingallina, E., Tonelli, C., et al. (2016). Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat. Cell Biol.* *18*, 897-909.

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., Wardell, C.P., Brioli, A., Boyle, E., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Johnson, D.C., Ross, F.M., Davies, F.E., et al. (2014a). Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J.* *4*, e191.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Melchor, L., Brioli, A., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Mirabella, F., Lopez-Corral, L., Humphray, S., Murray, L., et al. (2014b). Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia* *28*, 384-390.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Murison, A., Boyle, E.M., Begum, D.B., Dahir, N.M., Proszek, P.Z., Melchor, L., Pawlyn, C., Kaiser, M.F., et al. (2015a). APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat. Commun.* *6*, 6997.

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. (2015b). 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.

Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P., Ashby, T.C., Bauer, M., Davies, F.E., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., et al. (2018). Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* *2018-03-840132*.

Wang, B., Xiao, Z., and Ren, E.C. (2009). Redefining the p53 response element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 14373-14378.

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.

Welch, J.S., Petti, A.A., Miller, C.A., Fronick, C.C., O'Laughlin, M., Fulton, R.S., Wilson, R.K., Baty, J.D., Duncavage, E.J., Tandon, B., et al. (2016). TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* *375*, 2023-2036.

- Weston-Bell, N., Gibson, J., John, M., Ennis, S., Pfeifer, S., Cezard, T., Ludwig, H., Collins, A., Zojer, N., and Sahota, S.S. (2013). Exome sequencing in tracking clonal evolution in multiple myeloma following therapy. *Leukemia* 27, 1188-1191.
- Wienken, M., Moll, U.M., and Dobbelstein, M. (2017). Mdm2 as a chromatin modifier. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 74-80.
- Will, K., Warnecke, G., Wiesmüller, L., and Deppert, W. (1998). Specific interaction of mutant p53 with regions of matrix attachment region DNA elements (MARs) with a high potential for base-unpairing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13681-13686.
- Wong, K.Y., Huang, X., and Chim, C.S. (2012). DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. *Carcinogenesis* 33, 1629-1638.
- Wu, P., Tang, Y., He, J., Qi, L., Jiang, W., and Zhao, S. (2013). ARC is highly expressed in nasopharyngeal carcinoma and confers X-radiation and cisplatin resistance. *Oncol. Rep.* 30, 1807-1813.
- Wu, V., Moshier, E., Leng, S., Barlogie, B., Cho, H.J., Jagannath, S., Madduri, D., Mazumdar, M., Parekh, S., and Chari, A. (2018). Risk stratification of smoldering multiple myeloma: predictive value of free light chains and group-based trajectory modeling. *Blood Adv.* 2, 1470-1479.
- Wylie, A., Jones, A.E., D'Brot, A., Lu, W.-J., Kurtz, P., Moran, J.V., Rakheja, D., Chen, K.S., Hammer, R.E., Comerford, S.A., et al. (2016). p53 genes function to restrain mobile elements. *Genes Dev.* 30, 64-77.
- Xiao, B., Freedman, B.S., Miller, K.E., Heald, R., and Marko, J.F. (2012). Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly. *Mol. Biol. Cell* 23, 4864-4871.
- Xu, J., Qian, J., Hu, Y., Wang, J., Zhou, X., Chen, H., and Fang, J.-Y. (2014). Heterogeneity of Li-Fraumeni Syndrome links to unequal gain-of-function effects of p53 mutations. *Sci. Rep.* 4, 4223.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305-316.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714-718.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., et al. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99-103.
- Yarde, D.N., Oliveira, V., Mathews, L., Wang, X., Villagra, A., Boulware, D., Shain, K.H., Hazlehurst, L.A., Alsina, M., Chen, D.-T., et al. (2009). Targeting the Fanconi

Anemia/BRCA Pathway Circumvents Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* *69*, 9367-9375.

Yu, H., Yang, L., Fu, Y., Gao, M., and Tian, L. (2017). Clinicopathological significance of the p16 hypermethylation in multiple myeloma, a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* *8*, 83270-83279.

Yuan, J., Luo, K., Zhang, L., Cheville, J.C., and Lou, Z. (2010). USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* *140*, 384-396.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* *108*, 2020-2028.

Zhou, G., Wang, J., Zhao, M., Xie, T.-X., Tanaka, N., Sano, D., Patel, A.A., Ward, A.M., Sandulache, V.C., Jasser, S.A., et al. (2014). Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. *Mol. Cell* *54*, 960-974.

(1998). Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *16*, 3832-3842.

Titre : Identification par séquençage de l'exome de la dérégulation des voies de signalisation dans le myélome multiple et leurs conséquences fonctionnelles, notamment sur la voie p53.

Mots clés : Myélome Multiple, Whole Exon Sequencing, TP53

Résumé : Au sein des hémopathies malignes B, les plasmocytoses malignes (myélome multiple [MM] et leucémie à plasmocyte [PCL]) occupent une place particulière par leur biologie et leurs aspects cliniques. Biologiquement, elles présentent une forte proportion d'anomalies oncogéniques (*RAS*, *c-MYC*) et de fréquentes altérations de la voie p53 (*CDKN2A^{Del}*, *TP53^{Del/Mut}*) qui conduisent, cliniquement, à l'inefficacité des traitements cytostatiques conventionnels. Des lignées cellulaires de MM (HMCLs) qui recouvrent en partie la diversité des patients ont été générées depuis 50 ans. Nous avons caractérisé l'exome complet de 33 lignées cellulaires humaines de MM. Les mutations faux-sens sont les plus fréquentes (92%). Les HMCLs portent entre 307 et 916 mutant par lignée, *TP53* étant le gène le plus muté (67%). Des pertes bi-alléliques des voies du cycle cellulaire (*CDKN2C*, *RB1*), de la voie NFκB (*TRAF3*, *BIRC2*) et de la voie p53 (*TP53*, *CDKN2A*) sont fréquentes.

La fréquence des mutations/délétion est semblable à celle des patients (e.g. *DIS3*, *PRDM1*, *KRAS*), ou majorée (e.g. *TP53*, *CDKN2C*, *NRAS*, *PRKD2*). La voie MAPK est la plus altérée (82% des HMCLs), principalement par des mutants de *RAS*. Jamais décrites, les HMCLs présentent des altérations des voies épigénétiques (73%), de l'anémie de Fanconi (54%) et très peu d'anomalies directes de la machinerie apoptotique. Nous avons mis en relation les données d'expression, de mutation/délétion et de réponse aux traitements et démontré que l'efficacité de plusieurs traitements est indépendante des mutations. Finalement, le développement de stratégies prenant en compte ces altérations peu décrites dans le MM (Fanconi, Epigénétique) sont nécessaires.

Title : Assessment by Whole Exon Sequencing of pathway dysregulations in Multiple Myeloma and their functional impacts, notably on p53 pathway.

Keywords : Multiple Myeloma, TP53, Whole Exon Sequencing

Abstract : Among B Cell malignancies, plasma-cell malignancies (multiple myeloma [MM] and plasma cell leukemia [PCL]) harbor particular biological and clinical insights. Biologically, they present with both a high frequency of oncogenic abnormalities (*RAS*, *c-MYC*) and a high frequency of p53 pathway abnormalities (*CDKN2A^{Del}*, *TP53^{Del/Mut}*). Those two latter leading to chemo-resistance to conventional cytostatic drugs. Human myeloma cell lines (HMCLs) are widely used for their representation of primary myeloma cells as they cover patient diversity, although not fully. We performed whole-exon sequencing of 33 HMCLs, which were established over the last 50 years. Missense mutations were the most frequent mutations (92%). HMCLs harbored between 307 and 916 mutations per sample, with *TP53* being the most mutated gene (67%). Recurrent bi-allelic losses were found in genes involved in cell cycle regulation (*RB1*, *CDKN2C*),

the NFκB pathway (*TRAF3*, *BIRC2*) and the p53 pathway (*TP53*, *CDKN2A*). Frequency of mutations/deletions in HMCLs were either similar to that of patients (e.g. *DIS3*, *PRDM1*, *KRAS*), or highly increased (e.g. *TP53*, *CDKN2C*, *NRAS*, *PRKD2*). MAPK was the most altered pathway (82% of HMCLs), mainly by *RAS* mutants. Surprisingly, HMCLs displayed alterations in epigenetic (73%) and Fanconi anemia (54%) and few alterations in apoptotic machinery. We further identified mutually exclusive and associated mutations/deletions in genes involved in the MAPK and p53 pathways as well as in chromatin regulator/modifier genes. Finally, by combining the gene expression profile, gene mutation, gene deletion and drug response, we demonstrated that several targeted drugs overcome or bypass some mutations.