



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
2010

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 8 octobre 2010

par **Lise MORLON** épouse **MONNE**
née le 5 mai 1983

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Intérêt de l'immunophénotypage
plasmocytaire dans le myélome multiple

Membres du Jury

Président : M. le Professeur T. LECOMPTE PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy

Juges : Mme le Docteur V. LATGER-CANNARD (Directeur de thèse) PH, CHU de Nancy
Mme le Professeur MC. BENE PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy
M. le Professeur C. VIGNERON Faculté de Pharmacie de Nancy
M. le Docteur C. HULIN PH, CHU de Nancy

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2010-2011

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT	Toxicologie, sécurité sanitaire

Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	Sémiologie
--------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	Anglais
--------------------------	---------

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET	Directeur
---------------------------	-----------

SERMENT DES APOTHICAIRES

*J*e jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

*D*e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

*Q*ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

*Q*ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

À notre Président de jury

Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE

PU-PH, chef du service d'Hématologie Biologique et chef du pôle Laboratoires, CHU de Nancy

J'ai été honorée d'apprendre l'Hématologie Biologique à vos côtés.

Je vous remercie pour la qualité de votre enseignement et pour votre confiance en m'ayant accueillie dans votre service au cours de mon Internat de Biologie Médicale.

Votre grande connaissance, votre rigueur, votre pertinence et votre esprit critique demeureront pour moi une référence.

Que ce travail, que vous nous faites l'honneur de juger, témoigne de toute ma gratitude et de mon profond respect.

À notre Directeur de Thèse

Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD

PH, service d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy

Je te remercie sincèrement de m'avoir confié ce travail et de m'avoir guidée avec délicatesse et pertinence dans l'élaboration de cette thèse.

Que l'aboutissement de ce travail témoigne de toute ma reconnaissance.

À nos juges

Monsieur le Professeur Claude VIGNERON

Professeur émérite et Doyen honoraire, Faculté de Pharmacie de Nancy

Vous m'avez fait découvrir les richesses de l'Hématologie avec une grande pédagogie.

Vos conseils bienveillants m'ont guidée tout au long de mes études.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Professeur Marie-Christine BENE

PU-PH, laboratoire d'Immunologie, CHU de Nancy

C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges.

Soyez assurée de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Cyrille HULIN

PH, service d'Hématologie Adulte, CHU de Nancy

Vous me faites l'honneur de siéger à ce jury de thèse en qualité de clinicien.

Soyez assuré de ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, en collaborant avec le service d'Hématologie biologique.

À tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce travail ...

Françoise, Marie-Reine, Isaline et Gillou

Techniciens du secteur cytométrie en flux, service d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy

Virginie

Attachée de recherche clinique, service d'Hématologie Adulte, CHU de Nancy

Je vous remercie tous très sincèrement.

À tout le service d'Hématologie Biologique, techniciens, biologistes ...

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience. Apprendre à vos côtés a été un réel plaisir.

Je garderai un excellent souvenir de mes stages dans le service ... Merci !

À mes parents

Vous avez été à mes côtés tout au long de ces années, avec un amour et une patience sans faille : toujours présents, toujours disponibles, toujours à l'écoute. Chacun à votre manière, vous m'avez accompagnée dans mes choix, motivée dans les moments de doute, soutenue dans les difficultés. Vous avez toujours cru en moi, et vous avez su me donner confiance.

Difficile d'exprimer tout l'amour, l'admiration et la reconnaissance que j'ai pour vous...

De tout mon cœur, je vous dis un immense merci, et je vous dédie cette thèse.

À mes frères, Pierre et Xavier

À notre trio soudé par de merveilleux souvenirs d'enfance, et au bonheur toujours présent d'être réunis tous les trois.

À mes grands-parents

Votre regard à la fois discret et admiratif a toujours beaucoup compté pour moi.

À ma marraine Edith, à mon parrain Christian

Pour l'intérêt sincère qu'ils ont porté à mon parcours.

À toute ma famille

À Jean-Christophe

Pour son Amour, tous les jours, dans chaque chose...

À ma belle-famille

À Stéphanie & Laurent et Muriel & Guillaume

Pour notre amitié à mes yeux si précieuse et enrichissante.

À tous mes amis et à mes co-internes

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INDEX DES FIGURES & TABLEAUX	10
INTRODUCTION & OBJECTIFS DU TRAVAIL	15
- I - POINT BIBLIOGRAPHIQUE	18
La lignée plasmocytaire physiologique	19
1. Lymphopoïèse et immunopoïèse B	20
1.1. <i>La lymphopoïèse B</i>	20
1.1.1. Localisation	
1.1.2. Les différents stades de développement	
1.1.3. Évolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse	
1.1.4. Cytokines, chemokines et contact avec le stroma	
1.2. <i>L'immunopoïèse, vers le lymphocyte B mémoire et le plasmocyte</i>	24
1.2.1. Localisation	
1.2.2. Phase pré-centre germinatif	
1.2.3. Réaction du centre germinatif	
1.2.4. Différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte	
1.2.5. Adressage des cellules B au cours de l'immunopoïèse	
2. Les immunoglobulines	33
2.1. <i>Structures et caractéristiques</i>	33
2.1.1. La superfamille des immunoglobulines	
2.1.2. Caractéristiques structurales des immunoglobulines	
2.1.3. Relations structure-fonctions	
2.1.4. Les différentes classes d'immunoglobulines	
2.2. <i>Biosynthèse</i>	36
2.3. <i>Modifications au cours de la différenciation lymphocytaire B</i>	37
2.3.1. Recombinaison génétique au cours de la lymphopoïèse	
2.3.2. Mutation somatique et <i>switch</i> isotypique	
3. Le plasmocyte normal	42
3.1. <i>La fin de la différenciation plasmocytaire</i>	42
3.1.1. Migration	
3.1.2. Maturation	
3.2. <i>Caractéristiques morphologiques</i>	45
3.3. <i>Caractéristiques phénotypiques</i>	46
Le myélome multiple	47
1. Définition	47
2. Épidémiologie	48

3. Physiopathologie du myélome multiple	49
3.1. <i>Origine du myélome</i>	49
3.2. <i>Cytogénétique et altérations moléculaires</i>	50
3.2.1. Anomalies de nombre	
3.2.2. Anomalies structurales	
3.2.3. Autres anomalies	
3.2.4. Synthèse : pathogénèse moléculaire du myélome	
3.3. <i>Interactions avec le micro-environnement médullaire</i>	53
3.3.1. Molécules d'adhésion	
3.3.2. Cytokines et chemokines	
3.3.3. Angiogénèse	
3.4. <i>Mécanismes de l'ostéopathie associée au myélome</i>	56
3.4.1. Augmentation de la résorption osseuse	
3.4.2. Diminution de l'activité ostéoblastique	
4. Conséquences cliniques de l'expansion clonale myélomateuse	58
4.1. <i>Atteinte osseuse</i>	58
4.2. <i>Atteinte rénale</i>	59
4.3. <i>Manifestations neurologiques</i>	60
4.4. <i>Amylose AL</i>	61
4.5. <i>Complications infectieuses</i>	61
4.6. <i>Syndrome d'hyperviscosité</i>	62
4.7. <i>Autres</i>	62
5. Biologie du myélome	63
5.1. <i>Exploration de l'immunoglobuline monoclonale</i>	63
5.1.1. Analyse du sérum	
5.1.2. Analyse des urines	
5.1.3. Intérêt du dosage des chaînes légères libres sériques	
5.2. <i>Autres paramètres biochimiques</i>	68
5.3. <i>Hémogramme</i>	69
5.4. <i>Myélogramme</i>	70
5.4.1. Plasmocytose médullaire	
5.4.2. Autres lignées cellulaires	
5.4.3. Morphologie plasmocytaire	
5.5. <i>Cytogénétique</i>	75
6. Diagnostic	77
6.1. <i>Critères diagnostiques</i>	77
6.2. <i>Diagnostic différentiel</i>	78
7. Critères pronostiques	80
7.1. <i>Facteurs pronostiques individuels</i>	80
7.2. <i>Classifications pronostiques</i>	82
7.2.1. Classification de Durie et Salmon	

7.2.2. <i>International Staging System</i>	
7.2.3. Classifications morphologiques	
7.2.4. Classifications cytogénétiques et moléculaires	
8. Prise en charge thérapeutique	85
8.1. <i>Traitement anti-tumoral</i>	85
8.1.1. Indications	
8.1.2. Thérapeutiques disponibles	
8.1.3. Schémas thérapeutiques	
8.1.4. Perspectives thérapeutiques	
8.2. <i>Critères de réponse</i>	89
L'immunophénotypage plasmocytaire	91
1. Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte normal	91
2. Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte myélomateux	94
3. Place de l'immunophénotypage plasmocytaire dans la prise en charge des pathologies du plasmocyte	98
3.1. <i>Intérêt diagnostique</i>	98
3.2. <i>Intérêt pronostique</i>	100
3.3. <i>Intérêt thérapeutique</i>	104
3.3.1. Identification de cibles thérapeutiques potentielles	
3.3.2. Évaluation de la réponse au traitement et de la maladie résiduelle	
3.4. <i>En pratique</i>	106
3.4.1. Marqueurs de repérage	
3.4.2. Marqueurs de malignité	
- II - PATIENTS & METHODES	109
1. Patients et prélèvements	110
1.1. <i>Patients</i>	110
1.2. <i>Prélèvements pour l'immunophénotypage plasmocytaire</i>	110
1.2.1. Types de prélèvements	
1.2.2. Transport, stockage et contrôle des échantillons	
2. Matériel	112
2.1. <i>Appareils</i>	112
2.2. <i>Réactifs</i>	112
3. Méthodes : immunophénotypage plasmocytaire	114
3.1. <i>Préparation des cellules</i>	114
3.2. <i>Immunomarquages</i>	114
3.3. <i>Lyse érythrocytaire</i>	116
3.4. <i>Analyse cytométrique</i>	116
4. Autres paramètres et données clinico-biologiques analysés	119

1. Caractéristiques clinico-biologiques de la population	122
1.1. <i>Diagnostics, classifications et histoire de la maladie</i>	122
1.1.1. Diagnostics	
1.1.2. Classifications	
1.1.3. Histoire de la maladie	
1.2. <i>Caractéristiques démographiques</i>	123
1.3. <i>Clinique</i>	125
1.4. <i>Paramètres biologiques recommandés pour le diagnostic de myélome</i>	125
1.4.1. Composant monoclonal sérique et urinaire	
1.4.2. Autres paramètres biochimiques	
1.4.3. Paramètres hématologiques	
1.4.4. Cytogénétique	
1.5. <i>Suivi, traitement et survie</i>	133
2. L'immunophénotypage plasmocytaire	136
2.1. <i>Prélèvements et identification des cellules à phénotyper</i>	136
2.2. <i>Phénotypes plasmocytaires obtenus dans la population étudiée</i>	136
2.2.1. Validation biologique de la technique	
2.2.2. Analyse marqueur par marqueur	
2.2.3. Analyse par phénotype	
2.3. <i>Phénotype plasmocytaire et survie</i>	143
2.4. <i>Phénotype plasmocytaire et réponse au traitement</i>	144
2.5. <i>Phénotype plasmocytaire et anomalies cytogénétiques</i>	149
3. Analyse de cas particuliers	152
4. Limites	165

- IV - CONCLUSION & PERSPECTIVES**167**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**176**

ANNEXES**187**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide desoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
APC	allophycocyanine
ARN	acide ribonucléique
β_2m	β_2 -microglobuline
BCR	<i>B cell receptor</i>
BOM	biopsie ostéomédullaire
CD	<i>cluster</i> de différenciation
CDR	<i>complementary determining region</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLL	chaîne légère libre
CMF	cytométrie en flux
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRP	<i>C reactive protein</i>
CSH	cellule souche hématopoïétique
Da	dalton
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EMN	<i>European Myeloma Network</i>
EPS	électrophorèse des protéines sériques
EPU	électrophorèse des protéines urinaires
Fab	fragment fixant l'antigène
Fc	fragment cristallisable
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
HEV	<i>high endothelial venules</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
ICAM	<i>inter cellular adhesion molecule</i>
IEP	immunoélectrophorèse
IF	immunofixation
Ig	immunoglobuline

IGF-1	<i>insulin growth factor-1</i>
IGF-1R	<i>insulin growth factor-1 receptor</i>
IL	interleukine
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique
ISS	<i>International Staging System</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
LCA	<i>leukocyte common antigen</i>
LDH	lactate deshydrogénases
LFA	<i>leukocyte function antigen</i>
MadCAM-1	<i>mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MGG	May-Grünwald Giemsa
MGUS	<i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
MM	myélome multiple
MP	maladie progressive
MS	maladie stable
MW	maladie de Waldenström
N/C	rapport nucléo-cytoplasmique
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OS	<i>overall survival</i>
ψ CL	pseudo chaînes légères
PBJ	protéinurie de Bence Jones
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCL	<i>plasma cell leukemia</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	phycoérythrine
PerCP-Cy5.5	peridin chlorophyll-cyanine 5.5
PFS	<i>progression free survival</i>
PR	plasmocytose réactionnelle
RANKL	<i>receptor activator for nuclear factor kappa b ligand</i>
RC	réponse complète
RCs	réponse complète sticte
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RP	réponse partielle
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SMM	<i>smoldering myeloma</i>
TBRP	très bonne réponse partielle
TCR	<i>T cell receptor</i>
TDM	tomodensitométrie
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	<i>vascular cell-adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
VS	vitesse de sédimentation
WHO	<i>World Health Organization</i>

INDEX DES FIGURES & TABLEAUX

Figures

<u>Figure 1</u> : Schéma global de la différenciation plasmocytaire.	19
<u>Figure 2</u> : Complexe moléculaire du <i>B cell receptor</i> .	21
<u>Figure 3</u> : Représentations schématisques d'un ganglion lymphatique.	25
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique d'un follicule secondaire.	26
<u>Figure 5</u> : Activation de la cellule B via le <i>B cell receptor</i> et le complexe de co-récepteurs.	27
<u>Figure 6</u> : Activation de la cellule B par la cellule T.	28
<u>Figure 7</u> : Superfamille des immunoglobulines.	33
<u>Figure 8</u> : Structure des immunoglobulines.	34
<u>Figure 9</u> : Migration électrophorétique des différentes classes d'immunoglobulines.	36
<u>Figure 10</u> : Organisation des gènes des chaînes d'immunoglobulines.	37
<u>Figure 11</u> : Réarrangement des gènes d'immunoglobulines, cas de la chaîne lourde.	38
<u>Figure 12</u> : Commutation isotypique des immunoglobulines.	41
<u>Figure 13</u> : <i>Homing</i> des cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse.	43
<u>Figure 14</u> : Plasmocytes observés sur des frottis médullaires colorés au MGG.	45
<u>Figure 15</u> : Rôle des principales cytokines et chemokines dans la physiopathologie du myélome multiple.	55
<u>Figure 16</u> : Radiographie du crâne (profil).	59
<u>Figure 17</u> : Electrophorèses des protéines sériques (gels de migration et profils obtenus par intégration densitométrique).	64

<u>Figure 18</u> : Immunofixation des protéines sériques.	65
<u>Figure 19</u> : Dosage des chaînes légères libres sériques : principe.	67
<u>Figure 20</u> : Frottis sanguins colorés au MGG : rouleau-formation des hématies.	70
<u>Figure 21</u> : Aspect morphologique des cellules plasmocytaires en fonction de leur stade de maturation (frottis médullaires colorés au MGG).	73
<u>Figure 22</u> : Classification morphologique des cellules plasmocytaires selon leur degré de maturité.	73
<u>Figure 23</u> : Anomalies cytoplasmiques des plasmocytes (frottis médullaires colorés au MGG).	74
<u>Figure 24</u> : Anomalies nucléaires des plasmocytes (frottis médullaires colorés au MGG).	75
<u>Figure 25</u> : Mécanisme d'action du bortézomib dans le myélome multiple.	87
<u>Figure 26</u> : Analyse cytométrique des cellules plasmocytaires.	118

Tableaux

<u>Tableau I</u> : Evolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse.	23
<u>Tableau II</u> : Evolution du phénotype B au cours de l'immunopoïèse.	31
<u>Tableau III</u> : Classification de Durie et Salmon.	82
<u>Tableau IV</u> : <i>International Staging System</i> (ISS).	83
<u>Tableau V</u> : Evolution phénotypique au cours de la différenciation plasmocytaire.	93
<u>Tableau VI</u> : Caractéristiques (phénotype, clonalité et cinétique) des principales proliférations plasmocytaires.	99
<u>Tableau VII</u> : Immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiple : marqueurs d'intérêt, profils d'expression et valeur pronostique. Synthèse des données de la littérature.	108
<u>Tableau VIII</u> : Caractéristiques des anticorps monoclonaux utilisés.	113
<u>Tableau IX</u> : Protocole d'immunomarquages.	116
<u>Tableau X</u> : Répartition des patients selon la classification de Durie et Salmon et selon l'ISS.	123
<u>Tableau XI</u> : Données démographiques de la population étudiée.	124
<u>Tableau XII</u> : Données concernant le composant monoclonal sérique et/ou urinaire dans la population étudiée.	126
<u>Tableau XIII</u> : Récapitulatif des paramètres biochimiques dans la population étudiée.	129
<u>Tableau XIV</u> : Récapitulatif des paramètres de l'hémogramme et du myélogramme dans la population étudiée.	131
<u>Tableau XV</u> : Récapitulatif des résultats de cytogénétique (recherche d'anomalies par FISH) dans la population étudiée.	132

<u>Tableau XVI</u> : Récapitulatif des résultats concernant le suivi, le traitement et la survie de la population étudiée.	135
<u>Tableau XVII</u> : Expression des différents marqueurs de malignité dans la population étudiée, en comparaison aux données de la littérature.	138
<u>Tableau XVIII</u> : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés dans la population étudiée, avec les six marqueurs de malignité utilisés.	141
<u>Tableau XIX</u> : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés dans la population étudiée, avec uniquement les quatre principaux marqueurs de malignité utilisés.	142
<u>Tableaux XX a et b</u> : Réponses au traitement et survie de la population étudiée en fonction du profil d'expression des différents marqueurs de malignité.	146-147
<u>Tableau XXI</u> : Réponses au traitement et survie de la population étudiée en fonction du phénotype plasmocytaire.	148
<u>Tableau XXII</u> : Expression des différents marqueurs de malignité en fonction de la présence ou de l'absence des anomalies cytogénétiques del13, del17p et t(4;14).	149
<u>Tableau XXIII</u> : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés en fonction de la présence des anomalies cytogénétiques del13, del17p et t(4;14).	150
<u>Tableau XXIV</u> : Récapitulatif des plasmocytoses périphériques et médullaires des trois patients présentant une leucémie à plasmocytes.	154
<u>Tableau XXV</u> : Critères diagnostiques et caractéristiques du myélome (type et classification) pour les patients n°46 et 48 (phénotypes plasmocytaires « normaux »).	159

INTRODUCTION & OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par l'émergence et l'accumulation dans la moelle osseuse d'un clone de cellules plasmocytaires malignes. C'est une pathologie rare, mais qui touche en grande majorité les sujets âgés, ce qui explique que l'incidence augmente, avec le vieillissement de la population. La prolifération plasmocytaire maligne retentit sur le plan hématologique, biochimique et rhumatologique, avec des conséquences graves puisque, malgré les progrès thérapeutiques réels de ces dernières années, la rechute de la maladie est toujours inéluctable, et le MM reste une maladie incurable à l'heure actuelle.

Par conséquent, le MM est l'objet de nombreux travaux de recherche visant à l'amélioration de la prise en charge des patients, notamment en élargissant l'arsenal thérapeutique « anti-MM » mais aussi (les deux sont en fait liés) en cherchant à approfondir les connaissances sur la biologie de la pathologie, et donc celle du plasmocyte malin.

L'étude immunophénotypique des cellules de la lignée plasmocytaire est réalisée depuis plus de 15 ans. Mais bien que largement utilisé et recommandé selon des référentiels bien établis pour le diagnostic et la prise en charge des hémopathies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs, l'immunophénotypage des cellules malignes ne fait pas partie à ce jour des analyses biologiques de pratique courante dans le MM.

Néanmoins, les données publiées ces dernières années dans la littérature montrent que le phénotype plasmocytaire est aujourd'hui bien établi et permet de différencier les cellules malignes des cellules normales. Elles témoignent de l'intérêt croissant pour l'immunophénotypage plasmocytaire par cytométrie en flux (CMF), avec un bénéfice clinique potentiel pour les patients chez qui le diagnostic de MM (ou autre pathologie plasmocytaire) est suspecté ou établi. La place de cette analyse phénotypique se définit selon trois axes principaux : au diagnostic (diagnostic différentiel, absence de critère(s) de diagnostic usuel(s)), pour le pronostic (valeur pronostique de certains marqueurs phénotypiques) et sur le plan thérapeutique (évaluation de la maladie résiduelle).

L'objet de ce mémoire est d'évaluer la place de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le diagnostic du MM.

Dans une première partie bibliographique, nous développerons les éléments de base préalables à la compréhension de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM. Nous aborderons ainsi le développement et les caractéristiques de la lignée plasmocytaire physiologique, avant de nous intéresser à la biologie du plasmocyte tumoral, son origine et les conséquences de cette

transformation néoplasique. Les critères diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques du MM utilisés en pratique clinique de routine seront également détaillés, ainsi que les paramètres biologiques « habituels » du MM. Nous terminerons cette partie par une revue de la littérature sur l'immunophénotypage du plasmocyte normal et des cellules myélomateuses, afin de situer l'état actuel des connaissances et la place que tient à ce jour l'immunophénotypage plasmocytaire dans le diagnostic différentiel et dans la prise en charge thérapeutique du MM.

La seconde partie du mémoire présentera les résultats d'une étude menée dans le service d'Hématologie Biologique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy, en collaboration avec le service clinique d'Hématologie Adulte. L'immunophénotypage plasmocytaire par CMF y est implanté depuis 2005. À partir de 2007, un protocole d'immunophénotypage en CMF quatre couleurs a été mis en place, dans le but de caractériser le clone plasmocytaire malin sur le plan phénotypique, pour une population de patients répondant aux critères diagnostiques usuels de MM. La synthèse des résultats des analyses phénotypiques réalisées dans le cadre de ce protocole a pour buts :

- de valider le protocole d'immunomarquages et la technique de réalisation de l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF,
- de comparer les données de l'immunophénotypage plasmocytaire par rapport aux autres critères biologiques usuels pour le diagnostic de MM,
- d'interpréter les phénotypes plasmocytaires obtenus, leur hétérogénéité, et les comparer aux données publiées dans la littérature,
- de discuter de la place de l'immunophénotypage plasmocytaire en pratique clinique et des perspectives qu'apportent cette analyse pour l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de MM, notamment avec l'évaluation de la maladie résiduelle.

- | -

POINT BIBLIOGRAPHIQUE

lignée plasmocytaire, myélome multiple
& immunophénotypage

La lignée plasmocytaire physiologique

Le plasmocyte est la cellule terminale de la différenciation lymphocytaire B. Il est, avec les lymphocytes B mémoires, l'aboutissement du processus de sélection et de maturation des cellules B spécifiques d'un antigène. Les lymphocytes B naïfs sont produits dans la moelle osseuse, transitent par le sang périphérique et vont, dans les organes lymphoïdes secondaires, se différencier au contact de l'antigène en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte. Le plasmocyte migre ensuite vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocyte mature synthétisant en grande quantité une protéine extrêmement spécialisée, l'immunoglobuline (Ig), effecteur de la réponse immune humorale.

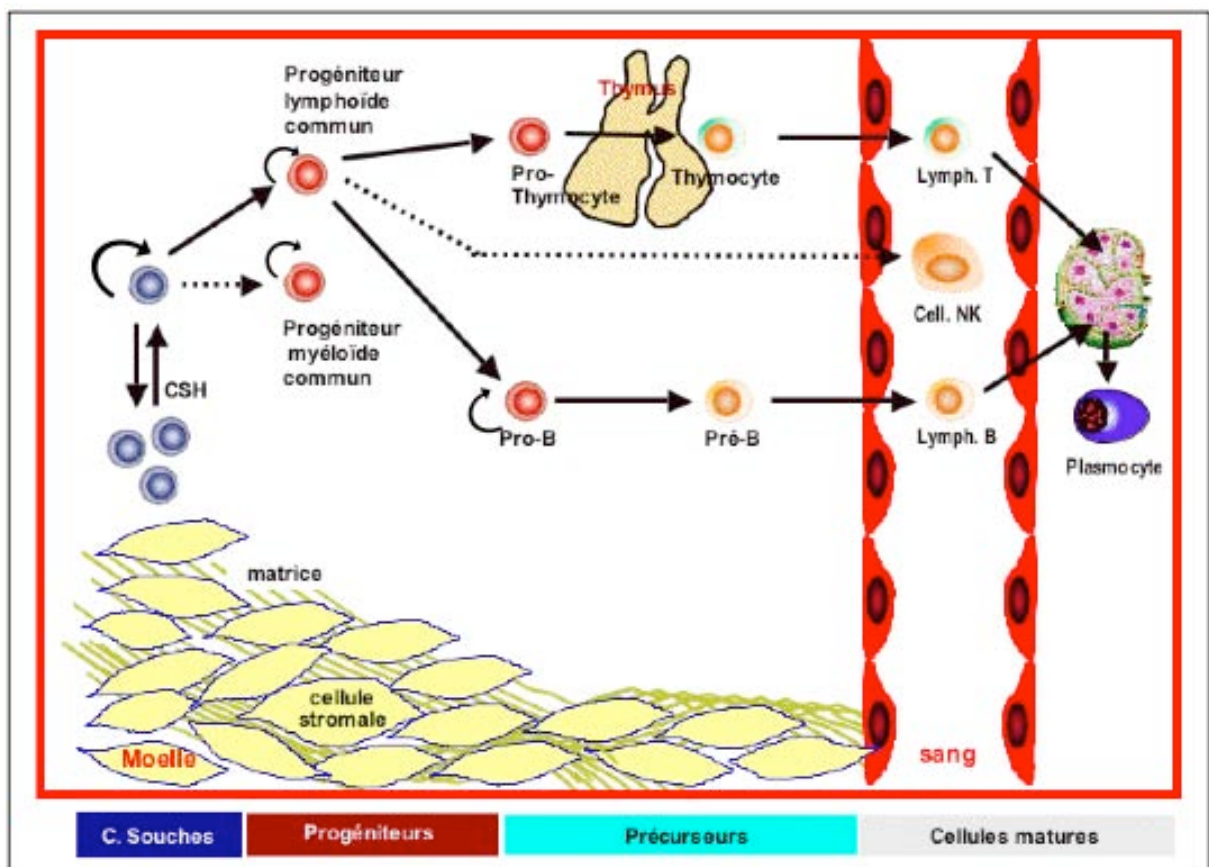


Figure 1 : Schéma global de la différenciation plasmocytaire (d'après Binet et al, 2004).

CSH, cellule souche hématopoïétique.

1. Lymphopoïèse et immunopoïèse B

1.1. La lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B correspond à la production de lymphocytes B à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Elle aboutit à la production de cellules exprimant l'élément fonctionnel majeur de la lignée B, le BCR (*B cell receptor*).

1.1.1. Localisation

La lymphopoïèse B se déroule dans le tissu lymphoïde primaire, c'est-à-dire la moelle osseuse (et le foie chez le fœtus) (*LeBien & Tedder, 2008*).

La moelle osseuse est un organe à la fois myéloïde et lymphoïde. Elle constitue avec le thymus les organes lymphoïdes primaires. Elle contient un tissu lymphoïde diffus, non folliculaire, ayant des interactions étroites avec le tissu de soutien, en particulier les cellules stromales.

1.1.2. Les différents stades de développement (Figure 1)

La différenciation lymphocytaire B commence, dans la moelle osseuse, à partir d'une CSH multipotente ayant la capacité de générer un progéniteur myéloïde commun et un progéniteur lymphoïde commun B, T et NK. À partir de ce progéniteur multipotent se différencient un progéniteur lymphoïde T, qui va migrer dans le thymus, et un progéniteur lymphoïde B, qui reste dans la moelle osseuse (*LeBien & Tedder, 2008*).

- Le premier stade identifié est celui du **lymphocyte pro-B**. Les cellules pro-B sont capables de se renouveler. Elles expriment des antigènes associés aux cellules souches, CD34 et CD117 (*c-kit ; stem cell growth factor receptor*). C'est à ce stade que commence le réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig (*cf paragraphe 2.3.1.*). Les chaînes lourdes des IgM (μ) deviennent alors détectables dans le cytoplasme des cellules (*LeBien, 2000*).
- La deuxième étape de différenciation est celle du **lymphocyte pré-B**, défini par l'apparition à la membrane d'un pré-BCR composé de deux chaînes lourdes μ réarrangées et deux pseudo chaînes légères (ψ CL) (*LeBien, 2000*). Cette Ig membranaire (μ - ψ CL) est associée à un hétérodimère $I\alpha/I\beta$ (CD79a/CD79b). Il existe au stade de la transition pro-B/pré-B un point de contrôle essentiel, au cours

duquel plus de 80% des cellules B sont éliminées par apoptose. Le pré-BCR donne en effet un signal de survie au lymphocyte pré-B, protégeant ainsi de l'apoptose uniquement les cellules qui ont réarrangé leurs chaînes lourdes (*LeBien, 2000*). À ce stade débute également le réarrangement des chaînes légères (*LeBien, 2000*) (*cf* paragraphe 2.3.1.).

▪ Ces événements aboutissent au **lymphocyte B immature** qui exprime le récepteur pour l'antigène, BCR. Il s'agit d'un complexe moléculaire composé de deux éléments associés de manière non covalente, à savoir (*Figure 2*) :

- une IgM membranaire complète (deux chaînes lourdes μ et deux chaînes légères), qui permettra la reconnaissance spécifique de l'antigène (*cf* paragraphe 1.2.2., *Figure 5*),
- un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b), phosphoprotéines transmembranaires à motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) dont les domaines cytoplasmiques initieront la transduction du signal *via* la phosphorylation de kinases de la famille Src (*LeBien & Tedder, 2008*) (*cf* paragraphe 1.2.2., *Figure 5*).

Chaque lymphocyte B exprime à sa surface environ 50 000 copies de BCR, toutes identiques (une spécificité antigénique unique), et tous les lymphocytes B de l'organisme se différencient les uns des autres par de petites variations dans la structure de l'Ig de leur BCR (*Feuillard & Raphael, 2000*).

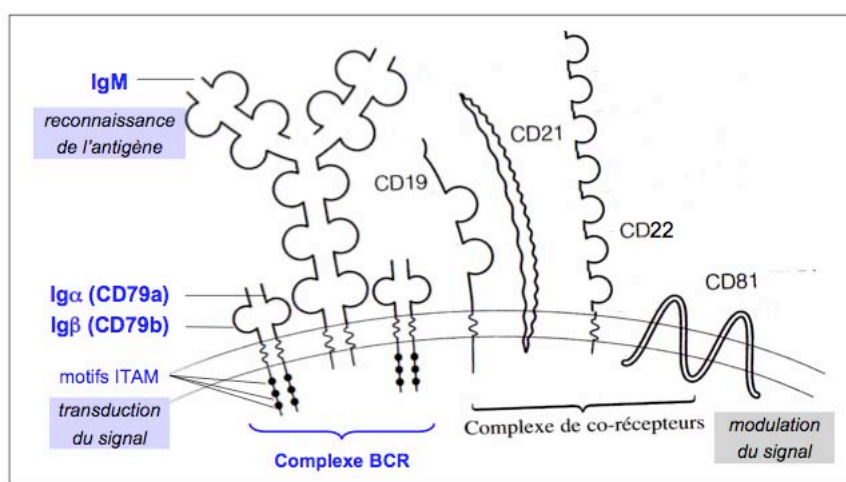


Figure 2 : Complexe moléculaire du **B cell receptor** (d'après *Lydyard et al, 2002*).

BCR, *B cell receptor* ; Ig, immunoglobuline ; ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*.

- Le stade de différenciation suivant est le **lymphocyte B mature naïf**, caractérisé par la co-expression membranaire des deux isotypes IgM et IgD. Ces cellules sont dites naïves car elles n'ont jamais rencontré d'antigène, à l'exception de ceux du « soi ». Les lymphocytes B « auto-réactifs », c'est-à-dire ceux qui possèdent une spécificité contre le « soi », sont éliminés par apoptose. C'est ce qui permet la tolérance immune (*Feuillard & Raphael, 2000*).

1.1.3. Évolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse

Outre le BCR, plusieurs molécules caractéristiques de la lignée lymphocytaire B vont apparaître à la surface des cellules B au fur et à mesure de leur différenciation (Tableau I). Ces molécules transmembranaires joueront pour la plupart un rôle important lors de l'étape de maturation fonctionnelle des cellules B, l'immunopoïèse (*cf* paragraphe 1.2.).

- L'antigène **CD19** est le premier marqueur B détectable (stade pro-B). Son expression persiste tout au long de la différenciation et de la maturation des cellules B. Au cours de la lymphopoïèse, il joue un rôle important dans la différenciation des cellules B. Au cours de l'immunopoïèse, il régule la transduction intra-cellulaire du signal du BCR en amplifiant l'activité des kinases de la famille Src (Figure 2 et paragraphe 1.2.2., Figure 5).

- L'antigène **CD20** est exprimé sur toutes les cellules B excepté les lymphocytes pro-B. Il s'agit d'une sous-unité de canal ionique.

- L'antigène **CD21** apparaît au stade des cellules B matures. C'est un récepteur du fragment du complément C3d et du virus Epstein-Barr. Il interagit avec CD19 pour générer et moduler les signaux transmembranaires au cours de l'immunopoïèse (Figure 2 et paragraphe 1.2.2., Figure 5).

- L'antigène **CD22** est exprimé dans le cytoplasme des cellules B dès les stades les plus précoces de différenciation (pro-B). Il apparaît à la surface cellulaire à la fin de la lymphopoïèse. Il intervient au cours de l'immunopoïèse dans la survie des cellules B et régule négativement le signal du BCR (Figure 2 et paragraphe 1.2.2., Figure 5).

- L'antigène **CD23** apparaît comme le CD21 au stade de cellule B mature. Il s'agit d'un récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII).

- L'antigène **CD40** est exprimé à la surface des cellules B dès le stade pré-B. Son ligand CD40L (CD154) est exprimé par les cellules T. Le couple CD40/CD154 joue un rôle essentiel à toutes les étapes de la différenciation lymphocytaire B secondaire (immunopoïèse).
- L'antigène **CD72** est un marqueur pan-B (exprimé sur toutes les cellules B). Il intervient comme régulateur négatif de la transduction du signal du BCR lors de l'immunopoïèse.
- L'antigène **CD81**, bien qu'il ne soit pas spécifique de la lignée B, est exprimé sur tous les lymphocytes B depuis un stade très précoce. Il est associé à la surface cellulaire avec CD19 et CD21 dans le complexe de signalisation des cellules B (Figure 2 et paragraphe 1.2.2., Figure 5).
- L'antigène **CD10** (CALLA) est exprimé par les précurseurs B et les centrocytes (cf paragraphe 1.2.3., Tableau II), mais pas par les cellules B matures circulantes. Il s'agit d'une endopeptidase neutre mise en jeu dans la régulation de la maturation des lymphocytes B.
- Les molécules du **HLA de classe II** (HLA, *human leukocyte antigen* ou CMH, complexe majeur d'histocompatibilité) sont exprimées de façon constitutive par toutes les cellules B. Elles interviennent dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T.

Tableau I : Evolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse (d'après Burmester & Pezzutto, 2005 ; Dignat-Georges et al, 2006 ; Feuillard & Raphael, 2000 ; LeBien, 2000 ; LeBien & Tedder, 2008).

En gris clair : expression cytoplasmique. En gris foncé : expression membranaire.

	lymphocyte pro-B	lymphocyte pré-B	lymphocyte B immature	lymphocyte B mature naïf
CD34	=====			
CD117	=====			
CD10	=====			
Igα/Igβ (CD79a/CD79b)		=====	=====	=====
Ig		μ-ψCL	sIgM	sIgM/sIgD
CD19	=====	=====	=====	=====
CD22	=====	=====	=====	=====
CD20		=====	=====	=====
CD21				=====
CD23				=====
CD40		=====	=====	=====
CD72	=====	=====	=====	=====
CD81	=====	=====	=====	=====
HLA-II	=====	=====	=====	=====

1.1.4. Cytokines, chemokines et contact avec le stroma

Les interactions avec les cellules stromales médullaires sont essentielles pour le développement des précurseurs B. Diverses cytokines seraient impliquées, mais elles sont encore peu caractérisées (LeBien & Tedder, 2008).

La chemokine SDF-1/CXCL12 (*stromal cell-derived factor-1*), produite par le stroma médullaire, joue un rôle majeur. Son récepteur CXCR4 est exprimé sur les CSH et sur les lymphocytes B, en particulier aux stades pro-B et pré-B (LeBien, 2000). SDF-1 est ainsi impliquée, entre autres, dans la localisation des précurseurs B dans le site le plus propice à leur prolifération et à leur survie, la moelle osseuse (*homing*) (LeBien, 2000).

1.2. ***L'immunopoïèse, vers le lymphocyte B mémoire et le plasmocyte***

Au stade de lymphocyte B mature naïf, un grand nombre de cellules exprimant des Ig membranaires de faible affinité a été généré. Cependant, la production d'anticorps neutralisants de forte affinité requiert une maturation de la réponse immunitaire, contrôlée par la présence de l'antigène, qui va prendre place dans les organes lymphoïdes périphériques.

1.2.1. Localisation

Les organes lymphoïdes périphériques ou secondaires sont le lieu où s'organise la réponse immune au niveau loco-régional (Feuillard & Raphael, 2000). Ils comprennent les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*) et le système lymphoïde cutané. En outre, des lymphocytes sont présents, de façon diffuse, dans presque tous les organes et tissus de l'organisme, à l'exception du système nerveux central.

Le ganglion est peuplé de tissu lymphoïde, composé de (Figure 3) :

- une **zone corticale** externe (cortex superficiel) ou zone marginale, siège des follicules lymphoïdes, dite « zone B » car elle contient avant tout des lymphocytes B
- une **zone paracorticale** (cortex profond) sous-jacente, où se trouvent des lymphocytes T et des cellules dendritiques, dite « zone T »
- une **zone médullaire** centrale, peu cellulaire.

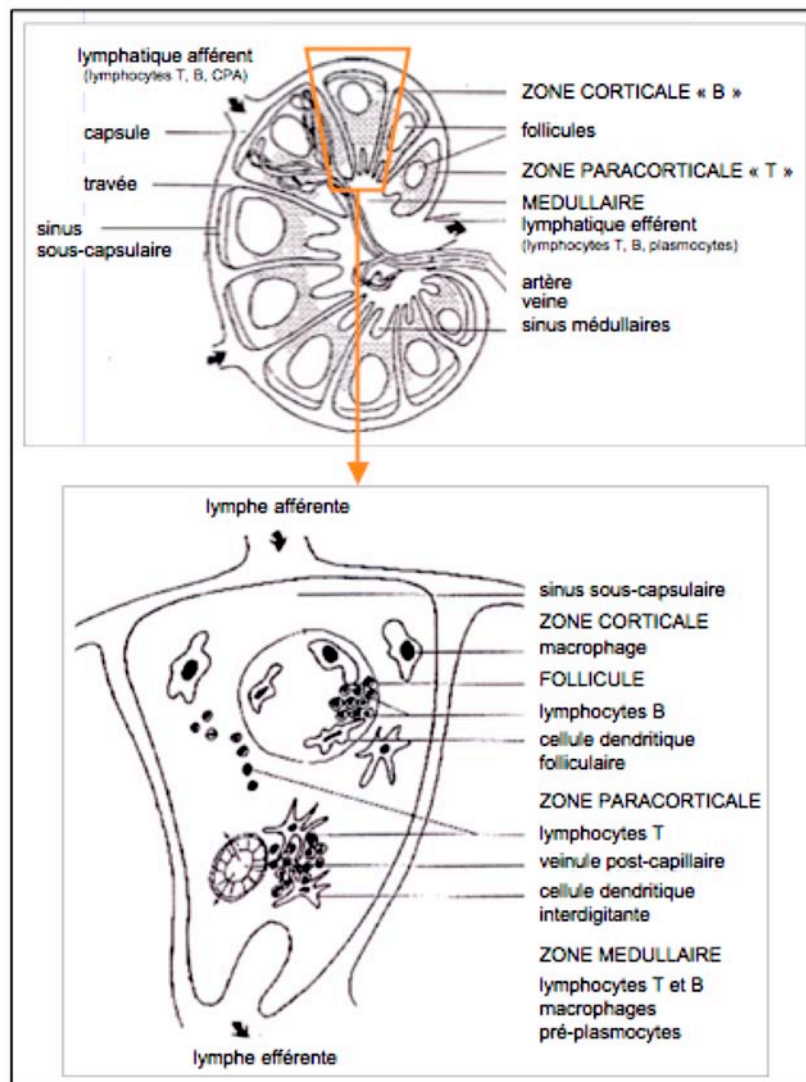


Figure 3 : Représentations schématiques d'un ganglion lymphatique.

CPA, cellule présentatrice d'antigène.

On distingue deux types de follicules au sein des organes lymphoïdes secondaires.

- Les **follicules primaires** sont constitués de petits lymphocytes B au repos et de cellules dendritiques folliculaires. Ces dernières ont des expansions cytoplasmiques qui forment un réseau au sein duquel se nichent les lymphocytes. Leur fonction est de capter les complexes immuns et de les exposer aux récepteurs de l'antigène des lymphocytes B (BCR) (*Feuillard & Raphael, 2000*).
- Les **follicules secondaires** (Figure 4), dérivés des follicules primaires suite à une stimulation antigénique, sont constitués par une zone périphérique, dite zone du manteau, et un centre germinatif. La zone du manteau est le vestige du follicule primaire. Le centre germinatif est un

carrefour décisionnel clé dans le devenir d'un lymphocyte B au cours de la réponse immune. C'est une structure polarisée formée d'une zone sombre faite de centroblastes (grandes cellules à noyaux non clivés), siège de la prolifération lymphoïde, des mutations somatiques et de la commutation isotypique, et d'une zone claire, faite de centrocytes (petites cellules à noyaux clivés) et de cellules dendritiques, siège de la sélection des lymphocytes B par l'antigène et de leur différenciation en cellules B mémoires ou en plasmocytes (*Feuillard & Raphael, 2000*).

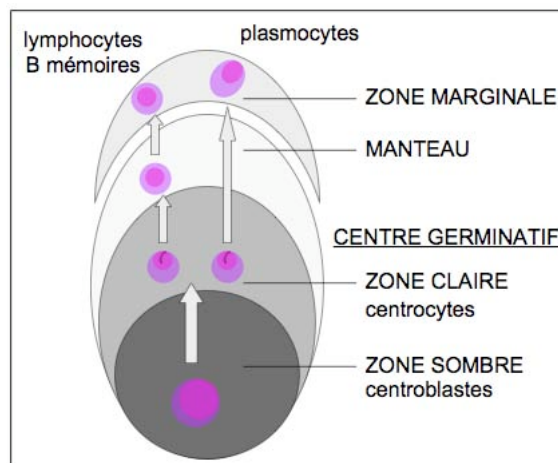


Figure 4 : Représentation schématique d'un follicule secondaire.

Une des caractéristiques des organes lymphoïdes secondaires est l'existence d'une compartimentation de la réponse immune B T-dépendante. On distingue une phase « pré-centre germinatif », une phase correspondant au passage dans le centre germinatif et une phase « post-centre germinatif ». Ces trois phases de la réponse immune B T-dépendante correspondent à des compartiments lymphocytaires B différents qui peuvent être caractérisés sur le plan immunophénotypique et moléculaire (*Feuillard & Raphael, 2000*) (Tableau II).

1.2.2. Phase pré-centre germinatif

Pour continuer sa différenciation, la cellule B doit rencontrer un antigène dont elle est spécifique et interagir avec un lymphocyte T spécifique de ce même antigène.

- **Rencontre avec l'antigène et activation du BCR** (Figure 5)

Les lymphocytes B naïfs produits au niveau médullaire circulent dans l'organisme *via* la circulation sanguine et lymphatique jusqu'à rencontrer l'antigène complémentaire de leur Ig de surface. Cette rencontre a lieu soit dans les tissus, et le lymphocyte B migre ensuite vers l'organe lymphoïde le plus proche, soit au niveau même d'un organe lymphoïde périphérique, l'antigène étant apporté par un macrophage (cellule présentatrice d'antigène, CPA).

L'agrégation des IgM de surface au contact d'un antigène multivalent provoque l'activation du BCR et déclenche une cascade de transduction complexe. Il en résulte une action positive sur la prolifération et la survie du lymphocyte B (prévention de l'apoptose).

L'activation du BCR est modulée par des co-récepteurs, formés de molécules exprimées dès les stades précoces de la différenciation lymphocytaire B (*cf* paragraphe 1.1.3.). Le signal délivré par le BCR peut ainsi être freiné *via* CD22 et CD72, ou bien activé par le complexe CD19/CD81/CD21 qui amplifie l'activité des kinases de la famille Src.

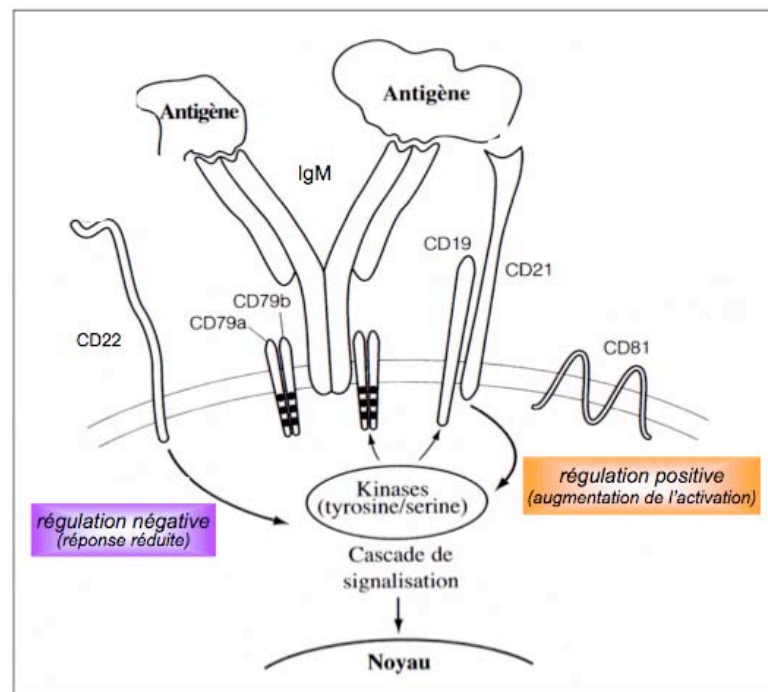


Figure 5 : Activation de la cellule B *via* le B cell receptor et le complexe de co-récepteurs
(d'après Lydyard et al, 2002).

Ig, immunoglobuline.

▪ **Rencontre avec le lymphocyte T CD4** (Figure 6)

L'activation du lymphocyte B n'est complète qu'après contact avec le lymphocyte T. En effet, bien que les cytokines et chemokines tiennent une place importante dans la maturation de la réponse anticorps, le développement d'une réponse immunitaire humorale efficace implique une coopération cellulaire entre le lymphocyte B pré-activé par l'antigène, un lymphocyte T CD4 spécifique du même antigène et les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène (*Feuillard & Raphael, 2000*). Cette étape a lieu dans la zone T inter-folliculaire.

L'activation du lymphocyte B par contact avec le lymphocyte T CD4 est médiée par plusieurs couples ligand/récepteur. Le premier à être mis en jeu (par ordre chronologique) est la reconnaissance de l'antigène présenté au TCR (*T cell receptor*) par les molécules HLA-II du lymphocyte B. Ensuite, la partie la plus importante du signal que délivre le lymphocyte T au lymphocyte B est apportée par des molécules de la famille du TNF (*tumor necrosis factor*), et en particulier par les interactions CD40/CD154. La liaison spécifique de CD40 (exprimé par les lymphocytes B) à CD154 (induit de façon rapide et transitoire à la surface des lymphocytes T CD4 activés par les CPA) fournit d'importants signaux de co-stimulation, nécessaires pour la différenciation terminale T-dépendante des lymphocytes B activés. Le signal qu'elle induit bloque l'apoptose des lymphocytes B activés et leur permet d'évoluer vers les stades ultérieurs de plasmocyte ou de lymphocyte B mémoire. Notons que d'autres molécules que nous avons évoquées précédemment interviennent également dans la régulation des interactions entre lymphocytes B et T, comme CD72, CD22 ou encore CD23.

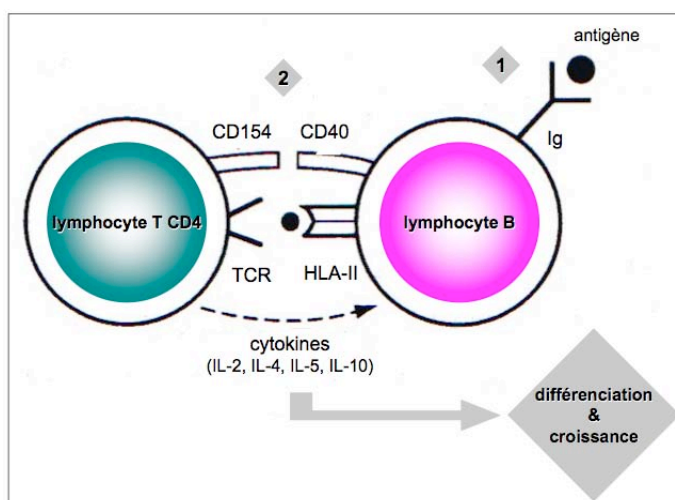


Figure 6 : Activation de la cellule B par la cellule T (d'après Lydyard et al, 2002).

1 : Rencontre de la cellule B avec l'antigène : « pré-activation » de la cellule B via le *B cell receptor*. **2 :** Rencontre de la cellule B avec le lymphocyte T CD4 : coopération cellulaire et activation T-dépendante de la cellule B.

HLA, *human leukocyte antigen* ; Ig, immunoglobuline ; IL, interleukine ; TCR, T cell receptor.

- **Réponse anticorps primaire**

Parmi les lymphocytes B ainsi activés, certains vont se différencier directement sur place en plasmocytes à courte durée de vie (environ quatorze jours) sécrétant une IgM caractéristique de la réponse anticorps primaire (*Feuillard & Raphael, 2000 ; Shapiro-Shelef & Calame, 2005*). Cette IgM est de faible affinité pour l'antigène car les gènes des Ig de ces plasmocytes n'ont pas subi de mutations somatiques, et elle ne contribue pas à la production d'anticorps à long terme. Cependant, le rôle de cette première vague d'anticorps est important car elle fournit une première barrière rapide contre l'infection et permet de générer des complexes immuns circulants qui pourront être captés au niveau des organes lymphoïdes secondaires par les cellules dendritiques folliculaires.

1.2.3. Réaction du centre germinatif

La réaction du centre germinatif correspond à un développement spécifique supplémentaire des cellules B dans les organes lymphoïdes périphériques, avec pour but la production d'anticorps de haute affinité pour l'antigène.

- **Stade centroblaste**

Les lymphocytes B activés de manière T-dépendante vont migrer dans la zone B des tissus lymphoïdes et initier la formation des centres germinatifs (transformation des follicules primaires en follicules secondaires) : c'est le stade de centroblastes, qui forment la zone sombre du centre germinatif (*Feuillard et al, 2000*). Le signal CD40/CD154 joue un rôle essentiel à cette étape, favorisant une prolifération intense des centroblastes ainsi que les mutations somatiques des gènes variables des Ig, qui vont modifier l'affinité de l'Ig pour l'antigène (*cf paragraphe 2.3.2.*). Ces mutations somatiques sont associées à un arrêt transitoire de la transcription des gènes des Ig. A ce stade, les cellules B n'expriment donc plus d'Ig de surface.

- **Stade centrocyte**

Les centroblastes migrent ensuite vers la zone claire du centre germinatif et se différencient en centrocytes exprimant à nouveau des Ig membranaires. L'antigène leur est présenté sous forme de complexes immuns à la surface des cellules dendritiques. La susceptibilité des centrocytes à l'apoptose joue ici un rôle essentiel pour la sélection d'un répertoire d'Ig de haute affinité pour l'antigène (*Feuillard et al, 2000 ; Jourdan et al, 2009*). Ainsi, seuls les centrocytes reconnaissant l'antigène

par une Ig de forte affinité poursuivent leur développement. Le signal CD40/CD154 bloque leur apoptose. En revanche, les centrocytes présentant une faible affinité pour l'antigène sont éliminés. Ils expriment CD95 (*fas*), dont la liaison au *fas*-ligand induit l'apoptose. Notons que seuls quelques clones (un à cinq) par antigène ne sont pas éliminés au cours de ce processus de sélection. En outre, le signal d'activation fourni par le lymphocyte T via le couple CD40/CD154 induit à cette étape la commutation isotypique (*switch*) des Ig qui aboutit à la production d'IgA, IgG et IgE (*cf* paragraphe 2.3.2). Diverses cytokines comme les interleukines (IL) IL-2, IL-4, IL-10 ou encore IL-13 participent également à la prolifération et à la survie des cellules B à ce stade et semblent jouer un rôle majeur dans la détermination de l'isotype de l'Ig (*Feuillard et al, 2000*).

1.2.4. Différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte

Après la sélection de clones de haute affinité pour l'antigène et la commutation de classe, les lymphocytes B des centres germinatifs peuvent se différencier soit en lymphocytes B mémoires, soit en plasmocytes, sous l'influence de divers signaux induits par les interactions entre lymphocytes B, T et cellules dendritiques ainsi que de cytokines comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 (*Feuillard et al, 2000*).

▪ **Lymphocyte B mémoire**

Les lymphocytes B mémoires expriment les marqueurs caractéristiques de la lignée B (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23) ainsi que des molécules de la famille du récepteur au TNF, CD40 et CD27 (*Tableau II*). Dans la lignée B, l'expression de CD27 est restreinte aux cellules centrogerminatives, cellules mémoires et plasmocytes (*Tableau II*). Son ligand CD70 est exprimé par les cellules B et T activées (*Bataille et al, 2006*).

Les lymphocytes B mémoires portent à leur surface un BCR de haute affinité, mais ne sécrètent pas d'anticorps, et peuvent persister indépendamment de toute stimulation antigénique (*Shapiro-Shelef & Calame, 2005*). Ils s'accumulent dans la zone marginale, quittent le centre germinatif pour la circulation sanguine et se dirigent vers les tissus périphériques et les zones d'inflammation. Avec l'aide des lymphocytes T mémoires, ils seront responsables, lors d'une stimulation antigénique ultérieure, d'une réponse immunitaire humorale plus rapide et plus efficace, se différenciant préférentiellement en plasmocytes synthétisant immédiatement des anticorps de haute affinité (*Shapiro-Shelef & Calame, 2005*).

▪ Vers le plasmocyte

Pour la différenciation B vers le plasmocyte, il a été proposé l'intervention séquentielle de trois couples de récepteurs de la famille des récepteurs au TNF, impliqués dans la différenciation terminale B T-dépendante : CD40/CD154, CD27/CD70 et CD134/CD252 (OX40/OX40L) (Feuillard *et al*, 2000). Différentes cytokines telles que l'IL-6 mais aussi l'IL-10, l'IL-2, ou l'IL-4 en association avec l'IL-5 interviennent également à cette étape (Jourdan *et al*, 2009 ; Shapiro-Shelef & Calame, 2005).

Les cellules plasmocytaires immatures produites dans les follicules secondaires prolifèrent intensément ; c'est le stade de plasmoblaste. La différenciation et la maturation plasmocytaires vont se poursuivre parallèlement à la migration de ces cellules, pour se terminer dans la moelle osseuse ou la *lamina propria* des muqueuses digestives (cf paragraphe 3.1.).

La différenciation B vers le plasmocyte s'accompagne de l'acquisition des deux marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire, le CD38 et le CD138 (Tableau II). Nous détaillerons ultérieurement ces antigènes, ainsi que les autres caractéristiques phénotypiques des cellules plasmocytaires (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 1.).

Tableau II : Evolution du phénotype B au cours de l'immunopoïèse (d'après Burmester & Pezzutto, 2005 ; Dignat-Georges *et al*, 2006 ; Feuillard *et al*, 2000 ; LeBien, 2000 ; LeBien & Tedder, 2008).

En gris clair : expression cytoplasmique. En gris foncé : expression membranaire.

	phase pré-centre germinatif zone T interfolliculaires	phase germinative centre germinatif		phase post-centre germinatif zone marginale	vers moelle osseuse
	cellules B naïves	centroblastes	centrocytes	lymphocytes B mémoires	plasmoblastes
IgM/IgD	██████████				
IgG/IgA/IgE		██████████	██████████	██████████	██████████
CD79a/b	██████████	██████████	██████████	██████████	
HLA-II	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD10		██████████	██████████		
CD19	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD20	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD21	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD22	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD23		██████████		██████████	
CD27				██████████	██████████
CD40	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD72	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD81	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD38		██████████	██████████		██████████
CD138					██████████

1.2.5. Adressage des cellules B au cours de l'immunopoïèse

L'activation du BCR va diminuer la réponse chimiotactique du lymphocyte B naïf à SDF-1/CXCL12, chemokine synthétisée par les cellules stromales de la moelle osseuse et qui maintient les précurseurs B (qui expriment le récepteur CXCR4) au niveau médullaire (cf paragraphe 1.1.4.). Le lymphocyte B naïf va être dirigé, à l'issue de la lymphopoïèse, vers les organes lymphoïdes périphériques. Il quitte la circulation sanguine en traversant l'endothélium spécialisé des veinules des ganglions, HEV (*high endothelial venules*), grâce à la mise en jeu de sélectines, chemokines et intégrines. Ensuite, dans les organes lymphoïdes périphériques, l'adressage des cellules B vers les follicules lymphoïdes va être renforcé par l'expression, par les cellules stromales et les cellules dendritiques de la zone T, de chemokines ligands de CCR7 et CXCR5, récepteurs exprimés par les cellules B.

Plus globalement, le contact entre les CPA et les très rares lymphocytes B et T qui en sont spécifiques est essentiel à l'établissement d'une réponse immune efficace. Favoriser la rencontre entre ces cellules est la principale fonction des organes lymphoïdes secondaires qui synthétisent de façon constitutive certaines chemokines et dirigent ainsi la migration des lymphocytes B au cours des étapes successives du développement de la réponse immune humorale.

En conclusion, la lymphopoïèse et l'immunopoïèse sont deux étapes successives et complémentaires qui aboutissent à la production des cellules très spécifiques de chacun des antigènes existants. Au cours de chacune de ces étapes, les cellules prolifèrent intensément et sont l'objet de multiples remaniements chromosomiques. Une anomalie génomique peut survenir. Elle sera habituellement suivie de la mort de la cellule correspondante (apoptose), mais parfois l'anomalie induit un avantage de prolifération et/ou de survie, base d'une pathologie maligne.

2. Les immunoglobulines

Les Ig sont exprimées à la surface des cellules B matures et sécrétées en grande quantité par les plasmocytes. Ce sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale.

2.1. Structures et caractéristiques

2.1.1. La superfamille des immunoglobulines

Les Ig sont des glycoprotéines possédant une activité anticorps. Elles font partie d'une superfamille de molécules caractérisées par des domaines globulaires de structure similaire à celle des Ig (avec plusieurs feuillets anti-parallèles et des ponts disulfures). De nombreuses molécules du système immunitaire font partie de cette famille : le TCR, les molécules HLA de classe I et II, CD117, CD79, certaines molécules impliquées dans les interactions cellulaires (CD4, CD8, CD19, CD22), des molécules d'adhésion telles que le CD56 ... (Figure 7)

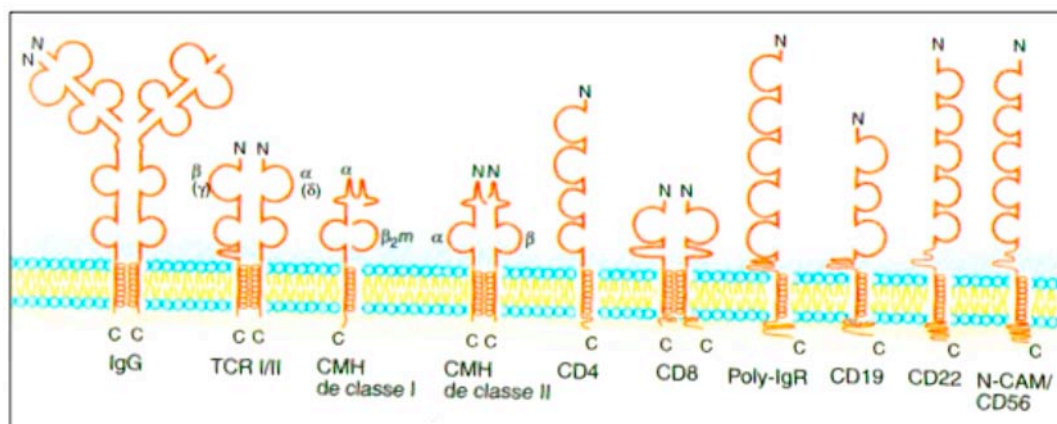


Figure 7 : Superfamille des immunoglobulines (d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; Ig, immunoglobuline ; N-CAM, *neural cell adhesion molecule* ; TCR, *T cell receptor*.

2.1.2. Caractéristiques structurales des immunoglobulines

Chaque Ig est formée de deux chaînes lourdes H (*heavy chain*) identiques, de poids moléculaire entre 50 et 70 kDa, et deux chaînes légères L (*light chain*) identiques, de poids moléculaire 25 kDa.

Les chaînes lourdes H sont composées d'un domaine N-terminal variable V_H et des domaines C-terminaux constants C_H , au nombre de trois ou quatre selon l'isotype. Les différents isotypes de chaînes H définissent cinq classes d'Ig : $H\gamma_1$ à $H\gamma_4$ pour les IgG, $H\alpha_1$ et $H\alpha_2$ pour les IgA, $H\mu$ pour les IgM, $H\delta$ pour les IgD, et $H\epsilon$ pour les IgE.

Les chaînes légères L possèdent deux formes différentes, κ ou λ . Chaque chaîne L comprend deux régions de taille similaire : une partie variable V_L et une partie constante C_L .

Les domaines variables V_H et V_L sont en fait une alternance de régions peu variables, dites de charpente ou *framework*, et de parties présentant une variabilité extrême de la séquence d'acides aminés, dites régions hypervariables, qui déterminent la spécificité de liaison de l'antigène (appelées régions déterminant la complémentarité ou CDR, *complementary determining region*). (Figure 8)

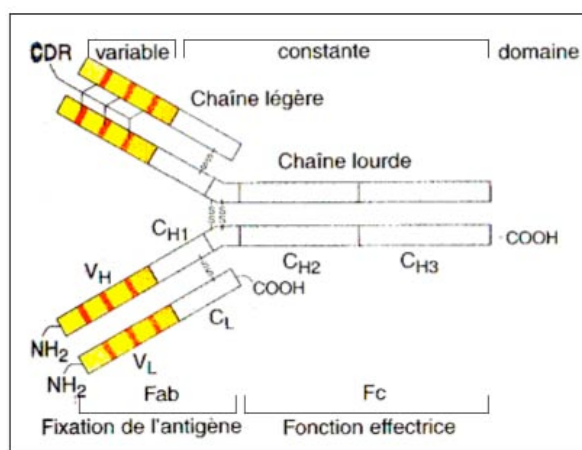


Figure 8 : Structure des immunoglobulines (d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

CDR, *complementary determining region* ou région déterminant la complémentarité ; Fab, fragment fixant l'antigène ; Fc, fragment cristallisable ; $V_{H/L}$, domaine variable de la chaîne lourde/légère ; $C_{H/L}$, domaine constant de la chaîne lourde/légère.

2.1.3. Relations structure-fonctions

Des résidus cystéine forment des ponts disulfures entre les chaînes d'une Ig. Le clivage d'une molécule d'Ig par l'enzyme papaïne produit deux fragments identiques $F(ab)'_2$ capables de fixer l'antigène (Fab, fragment fixant l'antigène) et un fragment Fc ne pouvant pas lier l'antigène (Fc,

fragment cristallisable) (Figure 8). $F(ab)'_2$ est le site anticorps, formé des régions V_H-C_{H1} et V_L-C_L . La région F_c , correspondant aux régions C_{H2} et C_{H3} (et éventuellement C_{H4}), déclenche les fonctions effectrices telles que la fixation du complément, la fixation aux monocytes-macrophages, aux polynucléaires et aux lymphocytes, *via* des récepteurs spécifiques (récepteurs F_c), ou le transfert placentaire.

2.1.4. Les différentes classes d'immunoglobulines

Comme dit précédemment (*cf* paragraphe 2.1.2.), sur la base des différents isotypes des chaînes H, on distingue cinq classes d'Ig : G, A, M, D et E.

- Les **IgG** fournissent la plupart des Ig du sérum. Il existe quatre sous-classes, IgG_1 à IgG_4 , qui se distinguent par leurs chaînes H_y distinctes. Elles ont un poids moléculaire d'environ 150 kDa et sont toujours monomériques. Sur le tracé électrophorétique des protéines sériques, les IgG migrent dans la fraction des γ -globulines (Figure 9). Elles fixent le complément (IgG_1 et IgG_2).
- Pour les **IgA** on distingue deux sous-classes, IgA_1 ($H\alpha_1$) et IgA_2 ($H\alpha_2$). Fortement glycosylées, ces Ig ne peuvent pas fixer le complément. Les IgA du sérum sont en général monomériques mais 15% d'entre elles se présentent sous forme de dimère. Il existe également une faible proportion sous forme de polymères. Les IgA dimères sont dites sécrétoires. On les trouve dans la salive, les sécrétions du système bronchique et des voies urinaires, dans les larmes, le colostrum et le lait maternel. Elles sont liées par une chaîne J de jonction, ou composante sécrétoire, qui correspond à une partie du récepteur membranaire qui fixe l'IgA à la face extra-luminale des cellules épithéliales.
- Les **IgM** sont exprimées à la surface des cellules B dès le stade de lymphocyte B immature, dans le complexe moléculaire du BCR. Elles possèdent quatre domaines constants C_H et sont assemblées en complexes pentamériques par l'intermédiaire de chaînes J. Leur poids moléculaire est d'environ 900 kDa. L'IgM fixe le complément avec une haute affinité.
- L'**IgD** est une autre Ig fréquemment trouvée à la surface des cellules B. Elle apparaît à la surface du lymphocyte B mature naïf. Sa fonction précise dans le sérum est inconnue.

Notons que les IgM et les IgD possèdent une plus faible mobilité électrophorétique que les IgG ; elles se trouvent dans la fraction des β - ou même des α_2 -globulines (Figure 9).

- La concentration d'IgE libre détectable dans le sérum est très faible. Les IgE se lient aux polynucléaires basophiles et aux mastocytes et peuvent, dans certaines conditions, être détectées sur les cellules épithéliales des muqueuses bronchique et gastro-intestinale. Elles sont importantes dans la défense contre les parasites et dans les réactions d'hypersensibilité immédiate.

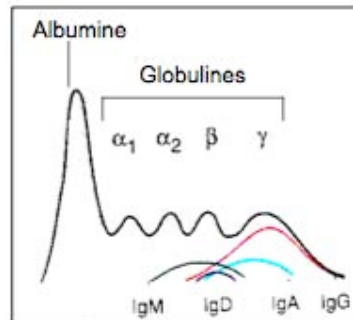


Figure 9 : Migration électrophorétique des différentes classes d'immunoglobulines

(d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

2.2. Biosynthèse

Les Ig sont exprimées à la surface des cellules B (IgM seules, puis IgM et IgD, puis IgM, IgG ou IgA), dans le complexe moléculaire du BCR (*cf* paragraphe 1.) : ce sont les récepteurs de l'antigène des cellules B. Elles sont aussi produites et sécrétées par les plasmocytes et se distribuent dans le plasma, les liquides extra-vasculaires et les sécrétions.

La synthèse d'Ig par les lymphocytes B ou les plasmocytes est très complexe. Elle est sous le contrôle des lymphocytes T, des CPA, de cytokines et d'éléments de l'environnement cellulaire (fibroblastes, cellules endothéliales). Les chaînes H et L sont synthétisées de manière séparée au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La chaîne protéique chemine dans le RER vers l'appareil de Golgi. Elle subit des N-glycosylations. Dans le cytoplasme, deux chaînes H vont s'apparier à deux chaînes L. Au niveau de l'appareil de Golgi, des vésicules se forment, dans lesquelles sont stockées les Ig. Ces vésicules de stockage vont fusionner avec la membrane et leur contenu va se déverser dans le milieu extérieur, la glycosylation facilitant l'excrétion hors de la cellule. Les chaînes H non assemblées aux chaînes L restent dans la cellule. Pour les IgM pentamères ou les IgA dimères, l'assemblage a lieu au moment de la sécrétion ou à l'extérieur de la cellule.

La masse totale d'Ig synthétisées est estimée à un peu plus de 2 grammes par jour chez un adulte.

2.3. Modifications au cours de la différenciation lymphocytaire B

Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente (cf paragraphes 1.1.2. et 1.2.3.), les gènes des Ig subissent trois types de modifications au cours de la lymphopoïèse B et de l'immunopoïèse.

2.3.1. Recombinaison génétique au cours de la lymphopoïèse

La recombinaison génétique est une étape indispensable à l'expression du caractère lymphoïde B. Elle consiste à transformer des gènes d'Ig très longs et non fonctionnels en gènes plus courts et fonctionnels, capables de synthétiser une chaîne H ou L.

▪ Organisation des gènes des chaînes d'immunoglobulines (Figure 10)

Les gènes d'Ig sont localisés sur le chromosome 14 (14q32) pour la chaîne H, et sur les chromosomes 2 et 22 pour les chaînes L κ et L λ respectivement. Dans les progéniteurs B indifférenciés, ces gènes non fonctionnels sont une longue succession de petits segments de gènes tous différents entre eux. Sur le chromosome 14 (chaîne H), les gènes sont organisés en quatre segments séparés : V_H (variable), D_H (diversité), J_H (jonction) et C_H (constant). Chaque gène V_H est précédé d'une séquence L_H (leader). Sur les chromosomes 2 et 22 (chaîne L), la succession est comparable sauf qu'il n'y a pas de gène D (segments V_L et J_L uniquement). En outre, sur le chromosome 22, en plus des gènes de la chaîne L λ se trouvent deux gènes (Vpré-B et λ 5) codant des protéines similaires aux chaînes L (chaînes légères de substitution ou pseudo chaînes légères, ψ CL).

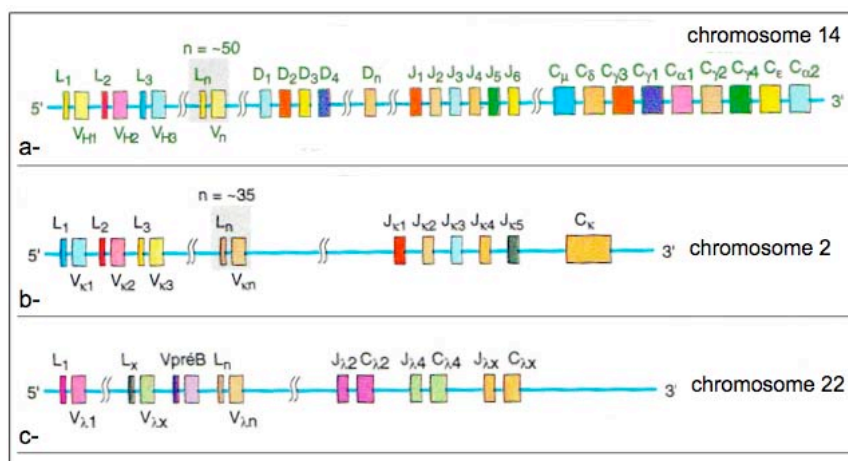


Figure 10 : Organisation des gènes des chaînes d'immunoglobulines

(d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

a- Gènes des chaînes lourdes. b- Gènes des chaînes légères κ . c- Gènes des chaînes légères λ .

- **Réarrangement des gènes des chaînes lourdes** (Figure 11)

Au cours de la lymphopoïèse B (stades pro-B et pré-B), des boucles se forment dans les gènes d'Ig, rapprochant au hasard des segments lointains. Chronologiquement, cette modification concerne en premier les gènes des chaînes H, puis dans un second temps ceux des chaînes L. En premier lieu, sur le chromosome 14, un gène D_H est joint à un segment J_H par délétion de l'ADN (acide désoxyribonucléique) intermédiaire (réarrangement D_H-J_H). La séquence D_HJ_H et le gène codant pour la partie constante de la chaîne H C_μ sont transcrits en ARN (acide ribonucléique) messenger, donnant lieu à une protéine $D_HJ_H-C_\mu$ transitoire. Ensuite, la séquence d'un gène V_H avec son segment L_H est jointe au segment D_HJ_H réarrangé, par une nouvelle délétion (réarrangement $V_H-D_H-J_H$). La transcription de ce gène réarrangé, en même temps que le gène codant C_μ , permet alors la synthèse d'une protéine $V_HD_HJ_H-C_\mu$. Après clivage de la séquence L_H , cette protéine correspond à la chaîne complète H_μ de l'Ig. La chaîne H_μ forme un complexe à la surface cellulaire avec la chaîne $V_{pré-B}/\lambda 5$. Les deux chaînes H_μ réarrangées associées aux deux pseudo chaînes légères ψCL forment le pré-BCR à la surface des lymphocytes pré-B (*cf* paragraphe 1.1.2.). C'est le signal pour le début du réarrangement de la chaîne L.

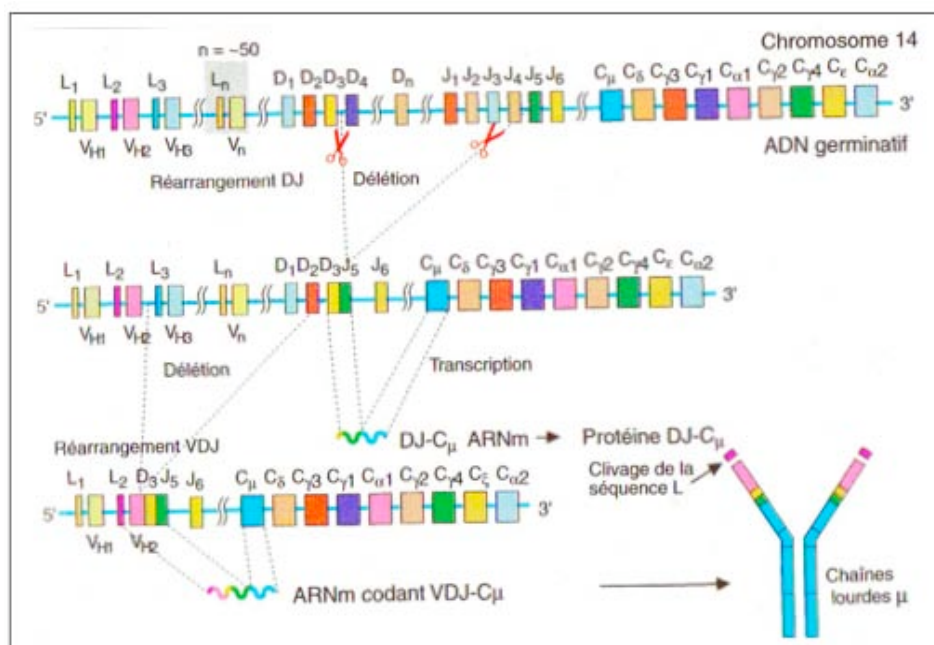


Figure 11 : Réarrangement des gènes d'immunoglobulines, cas de la chaîne lourde

(d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

▪ Réarrangement des gènes des chaînes légères

Le réarrangement de la chaîne L se déroule selon un mécanisme similaire, mais en une seule étape, puisqu'il n'y a pas de gène D (réarrangement V_L-J_L). Un gène V_L est joint à un segment J_L et la séquence ainsi générée est transcrite avec la partie constante C_k ou C_λ . La recombinaison génétique implique d'abord les gènes de la chaîne L_k (chromosome 2) et, en l'absence d'un réarrangement fonctionnel, la cellule procède au réarrangement des gènes de la chaîne L_λ (chromosome 22). Quand le réarrangement d'un gène κ ou λ est accompli et qu'une chaîne légère est synthétisée, des réarrangements supplémentaires ne peuvent avoir lieu. Ainsi, un réarrangement productif du locus κ empêche le réarrangement du locus λ . En revanche, un réarrangement avorté du locus κ permet le réarrangement du gène λ . La cellule B produit donc un seul type de chaîne légère (restriction des chaînes légères). Ce mécanisme explique que les Ig de l'organisme possèdent dans deux tiers des cas une chaîne L_k et dans un tiers des cas une chaîne L_λ .

▪ Exclusion allélique

Ces remaniements géniques sont associés au phénomène d'exclusion allélique qui interdit à la cellule d'exprimer une double spécificité antigénique (*Feuillard et al, 2000*). La recombinaison a d'abord lieu sur un allèle du gène μ en 14q32. Si elle est productive, la synthèse d'une chaîne H_μ est possible. Sinon, c'est l'autre allèle qui est sollicité. Si la recombinaison est productive, l'expression de la chaîne H_μ se réalise, sinon la cellule est éliminée par apoptose. De même pour la recombinaison des gènes des chaînes L : un mécanisme identique implique d'abord le premier puis le second des allèles des gènes κ . Si aucun gène κ n'est productif, ce sont les allèles des gènes λ qui sont successivement impliqués. Si eux même ne sont pas productifs, la cellule meurt par apoptose.

La fonction de ces remaniements géniques est de générer un répertoire aléatoire de spécificités antigéniques. En effet, les recombinaisons sont différentes d'une cellule à l'autre, donc les segments V(D)J obtenus sont structurellement différents d'une cellule à l'autre. Cela aboutit à la production de milliers de séquences primaires différentes de la partie variable des chaînes d'Ig. Ainsi, à l'issue de la lymphopoïèse B, les lymphocytes naïfs produits portent donc tous une IgM, κ ou λ , différente. Ce mécanisme s'est effectué sans l'intervention d'un quelconque antigène (recombinaison génétique au hasard).

2.3.2. Mutation somatique et *switch* isotypique

Lorsqu'un lymphocyte B naïf rencontre un antigène qui soit à peu près complémentaire de la région Fab de son IgM de surface, deux modifications des gènes d'Ig surviennent successivement : les mutations somatiques et le *switch* de classe d'Ig ou commutation isotypique. Ces étapes se déroulent dans le centre germinatif du follicule lymphoïde.

▪ **Mutations somatiques**

Des mutations ponctuelles aléatoires surviennent dans la partie du génome codant pour la partie variable des gènes d'Ig (segments VDJ et VJ), principalement sur les régions CDR1 et 2 (*Feuillard et al, 2000*). La modification de quelques codons entraîne la synthèse d'une Ig avec quelques acides aminés différents de la molécule initiale. Ces mutations ont pour finalité d'augmenter l'affinité de l'Ig pour l'antigène (*cf* paragraphe 1.2.3.).

▪ **Commutation isotypique**

La partie constante C de la chaîne H est codée par neuf gènes (μ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 , δ et ϵ). Au cours de la réponse immune, des Ig de différentes classes sont produites. Or, les cellules B en cours de maturation produisent d'abord des IgM : les séquences $V_H D_H J_H$ réarrangées sont jointes à un gène C_μ . Dans le centre germinatif, les séquences $V_H D_H J_H$ réarrangées vont être jointes à d'autres gènes que μ .

Plus précisément, chaque gène C est précédé par une séquence S (*switch*) qui contrôle leur réarrangement en formant des hybrides avec d'autres séquences S de forte homologie. Il se produit un réarrangement du double brin d'ADN entre la région de *switch* de l'IgM (S_μ) et une région S en aval sur le gène des Ig, suivi de l'excision de la séquence entre ces deux sites. Il en résulte, au minimum, la délétion du locus C_μ (*Feuillard et al, 2000*) (Figure 12). Ainsi, selon un mécanisme proche de celui de la recombinaison, une boucle va rapprocher le segment VDJ et un autre segment C que C_μ (C_γ , C_α , ou C_ϵ), induisant la synthèse d'une Ig ayant une partie variable proche de celle de l'IgM qui a fixé l'antigène et une partie constante d'isotype G, A ou E (*cf* paragraphe 1.2.3.). Ce mécanisme est sous contrôle des cytokines produites au cours de la réponse immune.

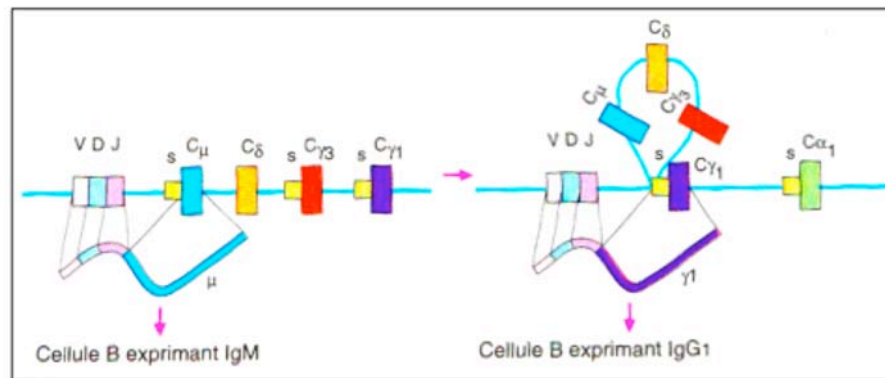


Figure 12 : Commutation isotypique des immunoglobulines (d'après Burmester & Pezzutto, 2005).

Ces modifications géniques aboutissent donc à la production d'IgG, IgA et IgE hyperaffines, effecteurs de la réponse immune B secondaire. Chaque lymphocyte B ou plasmocyte, capable de synthétiser une Ig, présente ainsi une combinaison génétique propre, fonction de l'isotype et de la spécificité de l'Ig produite.

3. Le plasmocyte normal

Alors que la biologie du lymphocyte B a été largement étudiée, la compréhension de la biologie du plasmocyte progresse, mais son exploration n'est pas aisée du fait de la rareté de ces cellules et de leur localisation dans des niches spécifiques, principalement dans la moelle osseuse.

3.1. La fin de la différenciation plasmocytaire

3.1.1. Migration

Les cellules plasmocytaires sont générées dans les tissus lymphoïdes périphériques. Leur localisation finale est principalement la moelle osseuse, qui devient le réservoir majeur de plasmocytes sécrétant des Ig pour la réponse immune humorale systémique, ou aussi la *lamina propria* des muqueuses du tube gastro-intestinal, pour la réponse humorale muqueuse. La migration des cellules plasmocytaires au niveau de ces niches, à partir des organes lymphoïdes secondaires, se fait *via* la circulation sanguine. Diverses chemokines et leurs récepteurs, des intégrines et des carbohydrates ligands de sélectines jouent un rôle majeur (Figure 13).

Nous avons déjà évoqué le rôle du couple chemokine/récepteur SDF-1/CXCR4 dans le maintien des cellules B au niveau médullaire au cours de la lymphopoïèse (*cf* paragraphe 1.1.4.). L'expression de CXCR4 est également essentielle pour la localisation médullaire des cellules plasmocytaires (Jourdan *et al*, 2009 ; Shapiro-Shelef & Calame, 2005). Ainsi, lorsque le lymphocyte B se transforme en plasmocyte dans le centre germinatif, il augmente sa sensibilité à SDF-1 en ré-exprimant CXCR4, tout en diminuant l'expression de CXCR5 et CCR7 (récepteurs de chemokines jouant un rôle dans l'adressage des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires au cours de l'immunopoïèse) (*cf* paragraphe 1.2.5.). Cela contribue à sa migration dans la moelle osseuse (Medina *et al*, 2002 ; Shapiro-Shelef & Calame, 2005). En outre, l'E-sélectine (*endothelial-cell selectin*) et VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule-1*), exprimées à la surface des cellules stromales médullaires, participent également au *homing* des plasmocytes dans la moelle osseuse, *via* leur association aux polysaccharides et intégrines exprimés à la surface des plasmocytes (Shapiro-Shelef & Calame, 2005).

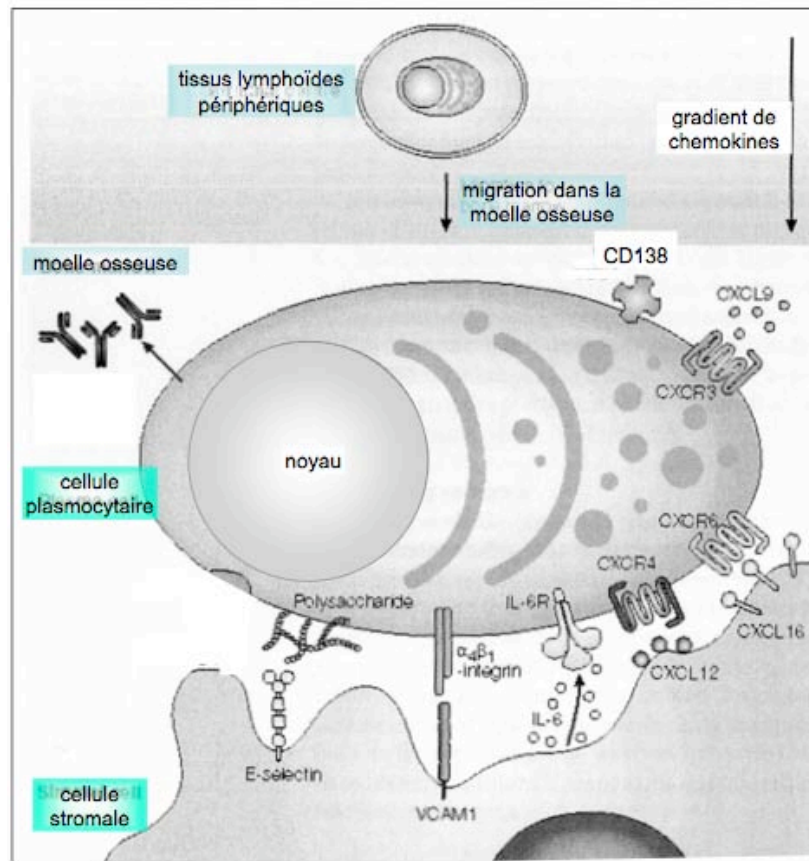


Figure 13 : Homing des cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse

(d'après Shapiro-Shelef & Calame, 2005).

E-selectin, *endothelial-cell selectin* ; IL, interleukine ; IL-6R, récepteur de l'IL-6 ; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*.

Finalement, le profil d'expression des molécules d'adhésion des cellules plasmocytaires définit leurs capacités de migration et de *homing* (Medina et al, 2002). (Figure 13)

- L'antigène **CD11a** est exprimé par les cellules plasmocytaires dans les organes lymphoïdes périphériques (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 1., Tableau V). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire constituant la chaîne α d'une intégrine. L'association CD11a/CD18 forme une $\alpha_1\beta_2$ -intégrine ou LFA-1 (*leukocyte function antigen-1*), capable de lier des ICAMs (*inter cellular adhesion molecule*). Cette molécule est mise en jeu dans les reconnaissances cellulaires hétérotypiques et intervient aussi dans la mobilité cellulaire par sa capacité à se lier à des protéines de la matrice extra-cellulaire, ou à des cellules endothéliales, et à mobiliser les protéines du cytosquelette.

▪ A l'inverse, dans la moelle osseuse, les plasmocytes ont perdu l'antigène CD11a. Ils expriment en revanche fortement les molécules CD31, CD49d, CD49e et CD138, qui ne sont que faiblement voire pas exprimées dans les organes lymphoïdes périphériques (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 1., Tableau V), ce qui suggère l'implication de ces quatre molécules dans l'attachement spécifique des plasmocytes au micro-environnement médullaire (Medina et al, 2002).

- **CD31** est une glycoprotéine de la superfamille des Ig, initialement identifiée comme un antigène plaquettaire, mais largement exprimée sur de nombreuses cellules, hématopoïétiques ou non. Elle possède d'importantes propriétés d'adhésion aux cellules endothéliales, par le biais d'interactions homotypiques, et est également un ligand de CD38.
- **CD49d et CD49e** (chaînes α d'intégrines) forment en association avec CD29 les $\alpha_4\beta_1$ -intégrine ou VLA-4 et $\alpha_5\beta_1$ -intégrine ou VLA-5 (VLA, *very late antigen*). Ces intégrines ont pour ligands la fibronectine, VCAM-1 et MadCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1*). Notons l'importance de CD49d dans la différenciation B terminale et aussi dans la sécrétion des Ig par les plasmocytes.
- **CD138** (*syndecan-1*) est un protéoglycane de la famille des héparanes sulfates jouant, entre autres, un rôle dans la mobilité cellulaire et le contrôle de la morphologie des cellules.

Notons aussi que l'interaction CD49d/MadCAM-1 est particulièrement importante dans le *homing* des plasmocytes dans les plaques de Peyer et participe, avec la chemokine CCL28 (MEC, *mucosa-associated epithelial chemokine*), au recrutement des plasmocytes IgA+ au niveau des muqueuses digestives (Jourdan et al, 2009 ; Shapiro-Shelef & Calame, 2005).

3.1.2. Maturation

Concomitamment à la migration depuis les organes lymphoïdes périphériques, les cellules plasmocytaires subissent une maturation (Medina et al, 2002). Cela explique qu'elles constituent un compartiment cellulaire complexe, au sein duquel on peut différencier plusieurs sous-groupes de cellules.

Il est important de souligner que les cellules plasmocytaires immatures produites dans les follicules secondaires, appelées plasmoblastes, prolifèrent intensément, et que leur maturation en plasmocytes s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire (Shapiro-Shelef & Calame, 2005). En outre, la maturation

plasmocytaire s'accompagne de l'acquisition d'un phénotype non-apoptotique, comme en témoignent les variations d'expression de molécules impliquées dans la régulation de la survie cellulaire (*Medina et al, 2002*). Ainsi, les cellules plasmocytaires des organes lymphoïdes périphériques expriment des molécules qui leur confèrent une propension à l'apoptose (CD95), alors que les plasmocytes médullaires présentent un phénotype non-apoptotique (absence de CD95 et augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-2) (*Medina et al, 2002*) (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 1., Tableau V).

Le micro-environnement médullaire, via des interactions étroites avec les cellules plasmocytaires, leur fournit des signaux de survie et de différenciation essentiels. Parmi les nombreuses molécules qui interviennent dans cette fonction, l'IL-6, dont la production par les cellules stromales est induite par les cellules plasmocytaires, tient un rôle majeur (*Jego et al, 1999*).

3.2. Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques des cellules plasmocytaires décrites ci-dessous se réfèrent à l'observation d'un frottis (sanguin ou médullaire) coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) (Figure 14).

En situation physiologique, les plasmocytes sont des cellules rares qui représentent moins de 0,5% des cellules médullaires.

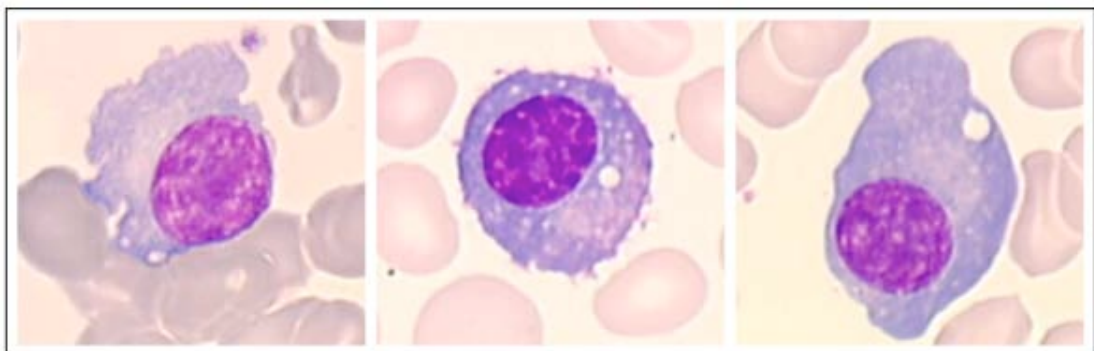


Figure 14 : Plasmocytes observés sur des frottis médullaires colorés au MGG.

Le plasmocyte est une cellule ovalaire de taille variable : 15 à 30 µm de grand axe et 10 à 15 µm de petit axe. Le noyau du plasmocyte est petit et le cytoplasme abondant. Le rapport nucléocytoplasmique (N/C) est d'environ 0,3.

Le noyau, de forme arrondie ou ovale, est excentré, déporté à un pôle. La chromatine est dense, mottée, non nucléolée. On parle d'aspect en rayon de roue ou en carapace de tortue.

Le cytoplasme est très basophile, signe de sa grande richesse en ARN, assez dense. On distingue une région claire juxta-nucléaire appelée archoplasme qui correspond à l'appareil de Golgi très développé et non coloré au MGG. Parfois, on peut observer une petite vacuole claire dans le cytoplasme. Il s'agit d'un lysosome riche en lipides, appelé corps de Gall.

3.3. *Caractéristiques phénotypiques*

L'engagement dans la différenciation plasmocytaire est associé à diverses modifications phénotypiques. Celles-ci sont détaillées dans le troisième volet de cette partie bibliographique (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 1.).

Le myélome multiple

1. Définition

Le myélome multiple (MM), également appelé maladie de Kahler, est une hémopathie maligne classée selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé ou WHO, *World Health Organization*) parmi les tumeurs à cellules B matures sous la rubrique « *plasma cell neoplasms* » (Swerdlow et al, 2008).

Le MM est caractérisé par la prolifération d'un clone unique de plasmocytes tumoraux envahissant la moelle osseuse hématopoïétique. Le clone plasmocytaire produit une protéine (Ig) monoclonale (même chaîne lourde, même chaîne légère), complète ou non, appelée paraprotéine ou aussi protéine M, que l'on peut mettre en évidence dans le sérum et/ou dans l'urine.

Le MM peut avoir des présentations cliniques diverses, d'une forme asymptomatique à des formes agressives avec l'expression de symptômes dus entre autres aux dépôts de chaînes d'Ig dans les tissus. Fréquemment, ce processus de prolifération plasmocytaire entraîne des destructions des structures squelettiques, avec des douleurs osseuses et des fractures. Occasionnellement, les plasmocytes peuvent aussi infiltrer d'autres organes. De plus, la protéine M produite par les plasmocytes malins peut être responsable d'une atteinte rénale.

Le diagnostic est basé sur l'association de caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques.

2. Épidémiologie

Le MM est une affection relativement rare, avec une incidence annuelle de 3 à 5 pour 100 000 habitants. Il représente 1% des cancers et 10 à 15% des hémopathies malignes (Kyle et al, 2003). C'est la seconde hémopathie maligne par ordre de fréquence après les lymphomes malins non hodgkiniens.

Cette pathologie touche l'adulte après 40 ans et l'incidence augmente rapidement avec l'âge. Ainsi 90% des cas surviennent après 50 ans. La médiane d'âge au diagnostic se situe autour de 65 ans (Greipp et al, 2005 ; Kyle et al, 2003 ; Lin et al, 2004). La survenue de cette hémopathie chez les adolescents et les jeunes adultes est exceptionnelle. L'incidence du MM est en augmentation et devrait encore augmenter au cours des prochaines décennies, en partie du fait du vieillissement de la population.

Le MM touche un peu plus fréquemment les hommes que les femmes (environ 1,4 hommes pour 1 femme) (Greipp et al, 2005 ; Kyle et al, 2003 ; Lin et al, 2004). Son incidence est double dans la race noire américaine par rapport aux caucasiens et elle est au contraire faible chez les asiatiques (Kyle et al, 2003), suggérant l'existence de facteurs génétiques. Des facteurs environnementaux ont également été incriminés.

Deux situations semblent associées à une incidence plus élevée de MM : une stimulation antigénique chronique, comme dans les cas d'infections chroniques, ainsi que l'exposition à des substances toxiques (pesticides, benzène, solvants organiques, dérivés du pétrole) ou des radiations ionisantes. Cependant, la plupart des patients atteints de MM ne présentent aucune de ces caractéristiques (Swerdlow et al, 2008) et leur place réelle dans l'oncogénèse reste difficile à évaluer avec précision.

Il existe chez une partie des patients (environ un tiers) une étape préalable de prolifération plasmocytaire, le plus souvent identifiée comme une gammapathie monoclonale de signification indéterminée (*monoclonal gammopathy of undetermined significance* ou MGUS) (Kyle et al, 2003). Il s'agit d'un état pré-tumoral stable, fréquent (entre 3 et 5% des plus de 50 ans), dont la durée est variable, et souvent non diagnostiqué car asymptomatique. Une partie de ces patients va développer une pathologie maligne, MM ou maladie de Waldenström, mais, en raison de leur âge avancé, un grand nombre d'entre eux peuvent décéder avant l'apparition clinique de la maladie. Ainsi, 0,5 à 3% des MGUS transforment en un MM chaque année (Barille-Nion et al, 2003). L'existence d'une MGUS constitue donc un facteur de risque de développer un MM.

3. Physiopathologie du myélome multiple

Le MM est caractérisé par l'émergence et l'accumulation dans la moelle osseuse d'un clone de plasmocytes malins. Des modèles de plasmocytomes murins ont permis de progresser dans la compréhension des processus d'oncogénèse du plasmocyte.

3.1. Origine du myélome

La nature exacte de la cellule à l'origine du MM reste mal connue. Elle est vraisemblablement, comme c'est le cas pour de nombreuses tumeurs B, centrogerminative ou post-centrogerminative, c'est-à-dire postérieure aux événements de mutations somatiques, de sélection et de commutation isotypique (*Barille-Nion et al, 2003*) (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 2.3.2.). En effet, la protéine monoclonale impliquée est en général une IgG (60% des cas) ou une IgA (20% des cas), seulement très rarement une IgD (1 à 2 % des cas) et exceptionnellement une IgM. L'expression d'une Ig commutée constitue un argument fort en faveur du caractère post-centrogerminatif de la cellule (*Feuillard & Raphael, 2000*).

La cellule à l'origine du MM présente une (ou plusieurs) anomalie(s) dans son génome, mais reste apte à migrer dans la moelle osseuse et à se différencier en plasmocyte sécrétant une Ig. Il existe, chez un même patient, des populations de cellules myélomateuses de différents degrés de maturité. Il est probable que la fraction plus immature de ces cellules, qui est la fraction proliférante, soit capable d'auto-renouvellement et soit ainsi responsable de l'expansion du clone malin. L'existence d'un stade plasmoblastes hautement proliférants au cours de la différenciation plasmocytaire physiologique (*Jego et al, 1999*) est en faveur de cette hypothèse. Ainsi, la majorité des cellules myélomateuses ne constituent pas un compartiment de cellules tumorales prolifératives mais un compartiment d'accumulation de cellules plasmocytaires matures, alimenté par un petit compartiment de cellules tumorales prolifératives immatures (plasmoblastes).

La cause de la prolifération plasmocytaire maligne n'est pas connue, mais une instabilité génétique est vraisemblablement impliquée, se manifestant par des erreurs au cours des modifications spécifiques de l'ADN des cellules B que sont la recombinaison VDJ, le *switch* de classe d'Ig, ou l'hypermutation somatique (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 2.3.). Ces erreurs peuvent conduire à des réarrangements chromosomiques dont la résultante est une activité cellulaire anormale traduisant la malignité.

Finalement, les étapes d'apparition du myélome pourraient être la stimulation antigénique, la sélection d'un clone anormal, l'expansion de ce clone et la progression vers la malignité à la suite d'événements génétiques comme l'activation d'oncogènes.

3.2. Cytogénétique et altérations moléculaires

L'étude cytogénétique du MM est difficile du fait de la faible prolifération des plasmocytes. Le prélèvement médullaire étudié est un mélange en proportions très variables de cellules plasmocytaires et d'éléments myéloïdes normaux beaucoup plus proliférants. Ces derniers produisent des mitoses normales qui peuvent submerger les quelques mitoses anormales des plasmocytes.

On sait aujourd'hui que dans le MM les anomalies chromosomiques sont quasi-universelles, observées chez près de 90% des patients (*Avet-Loiseau et al, 2007*). Ce sont des événements précoces qui participent au processus de pathogénèse.

Sur le plan des anomalies cytogénétiques, le MM se rapproche des tumeurs solides non hématopoïétiques. En effet, alors que l'étude des leucémies montre assez souvent une seule anomalie cytogénétique (un seul événement détectable), le MM est caractérisé par l'existence d'anomalies cytogénétiques nombreuses et complexes, numériques et/ou structurales. Le caryotype peut ainsi présenter jusqu'à quinze à vingt anomalies chromosomiques, différentes d'un patient à l'autre. Il est important de retenir que, jusqu'à présent, la biologie moléculaire n'a pas permis de mettre en évidence une anomalie récurrente, spécifique du MM. Notons également la progression de la fréquence des anomalies cytogénétiques en fonction du stade et de l'évolution de la pathologie. Cela peut être interprété comme le reflet de l'augmentation de la prolifération plasmocytaire au cours de la progression de la maladie, ou bien l'accumulation progressive d'anomalies du génome supplémentaires, témoignant d'une évolution clonale.

3.2.1. Anomalies de nombre

La ploïdie apparaît comme un paramètre important, à la fois dans la biologie et dans l'évolution clinique du MM (*Wuilleme et al, 2005*). D'ailleurs, le MM est caractérisé par la fréquence d'occurrence d'aneuploïdie. On trouve une hyperdiploïdie (47 à 60, voir 75 chromosomes) chez plus de la moitié des patients (*Wuilleme et al, 2005*) et une hypodiploïde dans environ 30 à 40% des cas (*Avet-Loiseau et al, 2007*).

Les anomalies de nombre peuvent occasionner la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, comme c'est le cas pour la délétion du chromosome 13. Cette anomalie est très fréquente dans le MM, comme dans les autres proliférations plasmocytaires malignes, et est trouvée chez à peu près la moitié des patients (*Avet-Loiseau et al, 2007 ; Facon et al, 2001 ; Wuillemé et al, 2005*). Il peut s'agir d'une délétion partielle (del13q-), mais dans la plupart des cas c'est une délétion totale du chromosome, ou monosomie 13 (**del13**). La délétion du chromosome 13 n'est pas simplement un marqueur de variant hypodiploïde du MM. Elle confère des caractéristiques biologiques particulières aux cellules, supportant leur expansion clonale (*Fonseca et al, 2004*).

3.2.2. Anomalies structurales

Dans la plupart des cas, une ou plusieurs anomalie(s) structurale(s) accompagne(nt) les anomalies de nombre. Ces altérations sont souvent complexes et multiples, sous forme de translocations. De nombreux chromosomes sont concernés, mais les anomalies structurales les plus remarquables font intervenir le chromosome 14, et plus particulièrement le locus 14q32 des chaînes lourdes des Ig (IgH). Des translocations impliquant ce locus sont détectables dans 55 à 70% des MM. D'autres translocations impliquent les loci des chaînes légères des Ig, IgLk (2p12) et IgLλ (22q11) ; elles sont moins fréquentes (*Fonseca et al, 2004*) et moins étudiées.

Ces translocations résultent d'erreurs au cours du *switch* isotypique, l'un des trois mécanismes de modification de l'ADN spécifiques des cellules B, qui a lieu durant le développement des cellules B dans les centres germinatifs (*Barille-Nion et al, 2003*) (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 2.3.2.). Les conséquences sont communes à toutes les pathologies lymphoïdes B et se traduisent par la surexpression du (des) gène(s) qui est (sont) venu(s) à proximité de l'un des *enhancers* du gène des IgH ou des IgL. En effet, les *enhancers* des Ig sont fortement activés dans les cellules B, et tout particulièrement dans les plasmocytes. Or, les partenaires impliqués dans ces translocations sont dans la plupart des cas des oncogènes, dont l'expression se trouve dérégulée.

Ainsi, parmi les loci partenaires les plus fréquemment impliqués dans les translocations IgH figure celui de la cycline D1 qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire : la translocation **t(11;14)(q13;q32)** est trouvée dans environ 20% des MM (*Avet-Loiseau et al, 2007 ; Wuillemé et al, 2005*). La translocation **t(4;14)(p16;q32)** est observée dans environ 15% des MM (*Avet-Loiseau et al, 2007 ; Wuillemé et al, 2005*). Elle entraîne la dérégulation de *FGFR-3* (*fibroblast growth factor receptor-3*, locus 4p16), récepteur transmembranaire pour les FGF (*fibroblast growth factor*) exprimés par les cellules

stromales, dont la forme activée est un oncogène. Dans 2 à 10% des cas c'est le locus 16q23 (*c-maf*) qui est impliqué (**t(14;16)(q32;q23)**) (*Avet-Loiseau et al, 2007*). D'autres loci sont trouvés de façon récurrente, bien que plus rare.

Comme dans d'autres tumeurs B, il est fort probable que les translocations IgH jouent un rôle dans la pathogénèse du MM. Plusieurs arguments sont en faveur (*Fonseca et al, 2004*). D'abord, ces translocations sont trouvées dans la plupart si ce n'est la totalité des cellules plasmocytaires, dans la majorité des MM. Elles sont récurrentes et ont été rapportées avec une prévalence similaire par plusieurs équipes. Elles résultent en la juxtaposition des *enhancers* des gènes d'Ig à côté d'oncogènes qui sont ainsi dérégulés. Enfin, elles sont apparemment très conservées au cours du processus d'évolution de la maladie.

Notons que lorsqu'elles ne prennent pas la forme de translocations, les anomalies structurales peuvent consister en des délétions partielles, touchant notamment les chromosomes 13 (*cf* paragraphe 3.2.1.) et 17 (*cf* paragraphe 3.2.3.).

3.2.3. Autres anomalies

Outre les translocations impliquant les gènes des Ig et les anomalies de nombres, d'autres altérations moléculaires ont été rapportées dans le MM, telles que des mutations ou des méthylations de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, ou encore la phosphorylation d'oncogènes.

p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les pathologies malignes humaines. Il est considéré comme le gardien du génome. Son inactivation, par délétion (del17p13) ou mutation, est observée dans certains cas de MM, plus particulièrement dans les stades avancés de la maladie. La délétion **del17p** est détectable chez environ 10% des patients (*Avet-Loiseau et al, 2007*). Les mutations de p53 sont observées avec une prévalence de 5% au diagnostic, et 20-40% des MM avancés (*Fonseca et al, 2004*).

3.2.4. Synthèse : pathogénèse moléculaire du myélome

Les deux grands types d'anomalies cytogénétiques observées dans le MM (numériques/structurales) divisent grossièrement les patients en deux groupes : l'un **hyperdiploïde** avec peu de modifications structurales (translocations IgH observées dans moins de 30% d'entre eux) et l'autre pouvant présenter des pertes de chromosomes, appelé groupe **non hyperdiploïde**, caractérisé par une très

forte prévalence de translocations IgH (supérieure à 85%) et à un moindre degré à une fréquence plus élevée de del13 (Fonseca et al, 2004 ; Wullemme et al, 2005). Ces deux groupes sont à peu près également distribués (Barille-Nion et al, 2003 ; Wullemme et al, 2005).

La mise en évidence, sur la base des anomalies cytogénétiques, de deux groupes de MM semble suggérer l'existence de deux voies de pathogénèse plus ou moins distinctes (Fonseca et al, 2004). L'une impliquerait une translocation IgH précoce comme premier événement responsable de l'immortalisation. Ce mécanisme est associé à un contenu chromosomique non hyperdiploïde. Au contraire, la seconde voie est associée à un contenu chromosomique hyperdiploïde qui pourrait refléter l'instabilité génétique intrinsèque. L'événement immortalisant impliqué dans cette voie reste à définir, mais pourrait être lié à l'acquisition de l'hyperdiploïdie (Fonseca et al, 2004).

3.3. Interactions avec le micro-environnement médullaire

La relation étroite entre le comportement biologique des cellules malignes et le micro-environnement local où elles résident est une caractéristique de nombreuses néoplasies. Le MM est considéré comme une pathologie modèle pour l'étude de telles interactions, de leur rôle dans la progression tumorale, les résistances aux traitements et les mécanismes qui conduisent aux complications osseuses.

Les cellules myélomateuses ont un tropisme important pour le compartiment médullaire : à partir des ganglions lymphatiques, elles migrent à travers l'endothélium dans le micro-environnement médullaire et vont se nicher au contact du stroma.

3.3.1. Molécules d'adhésion

L'adhésion au stroma médullaire et les interactions avec les cellules qui le composent sont cruciales pour le *homing*, la croissance et la survie des cellules myélomateuses. Cela leur confère un avantage prolifératif et anti-apoptotique considérable (Aggarwal et al, 2006 ; Harousseau et al, 2004 ; Pellat-Deceunynck et al, 1995).

Parmi les molécules d'adhésion exprimées à la surface des plasmocytes tumoraux, certaines sont également trouvées à la surface des plasmocytes normaux (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 3.1.1.), et d'autres non. Ces dernières constituent des marqueurs de malignité (cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 2.).

Ces molécules d'adhésions lient divers composés de la matrice extra-cellulaire (collagène, fibronectine, laminine...) et des molécules de la surface cellulaire comme VCAM-1. Elles appartiennent globalement à quatre familles (Harousseau et al, 2004 ; San Miguel et al, 2006) :

- des **β_1 intégrines**, dont CD49a/CD29 ou VLA-1 ($\alpha_1\beta_1$ -intégrine), CD49d/CD29 ou VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -intégrine) et CD49e/CD29 ou VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$ -intégrine),
- des **β_2 intégrines**, dont CD11a/CD18 ou LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$ -intégrine),
- des **protéoglycanes**, comme CD138 et CD44,
- des molécules de la **superfamille des Ig**, comme CD56 (NCAM, *neural cell adhesion molecule*) et des ICAMs.

3.3.2. Cytokines et chemokines

Les cytokines et chemokines impliquées dans la pathogénèse du MM sont similaires à celles intervenant dans la physiologie des cellules plasmocytaires normales.

Ainsi, les cellules myélomateuses expriment le récepteur CXCR4 de la chemokine SDF-1 et, de la même façon, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), produite par les cellules stromales médullaires, attire les cellules myélomateuses qui portent le récepteur CCR2 dans la moelle osseuse (Aggarwal et al, 2006).

Deux facteurs ont été identifiés comme ayant un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie : l'**IL-6** et l'**IGF-1** (*insulin growth factor-1*). L'IL-6 est un facteur de croissance et de survie essentiel des plasmocytes malins (Barille et al, 1999 ; Harousseau et al, 2004). Les cellules myélomateuses sont capables de produire cette cytokine de façon autocrine. Néanmoins, ce sont les cellules stromales médullaires, les ostéoblastes et les ostéoclastes qui constituent la principale source d'IL-6 dans le MM, sous la dépendance des interactions entre les plasmocytes et le micro-environnement médullaire (Jego et al, 1999). La synthèse d'IL-6 est notamment induite par l'IL-1 β et le TNF- α libérés par les cellules myélomateuses. La production d'IL-6 est augmentée de façon considérable chez les patients atteints de MM. Quant à l'IGF-1, il contribue à la prolifération des cellules myélomateuses grâce à ses propriétés anti-apoptotiques (Harousseau et al, 2004).

De nombreux autres couples récepteur/ligand (chemokine ou cytokine) sont impliqués dans les interactions entre les cellules myélomateuses et le stroma médullaire, participant non seulement au *homing* mais aussi à la prolifération du clone tumoral, ainsi qu'à la destruction osseuse (cf paragraphe 3.4.). Il serait prétentieux de vouloir citer de manière exhaustive toutes les molécules impliquées. Un

modèle faisant intervenir les plus importantes d'entre elles (IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*), IL-3) a été proposé par Aggarwal *et al* (Figure 15). Les stimulations réciproques qu'elles médient, entre les cellules stromales médullaires et les cellules myélomateuses qui sont venues se nicher à leur contact, résultent en une augmentation importante de la croissance et de la survie du clone tumoral (Aggarwal *et al*, 2006).

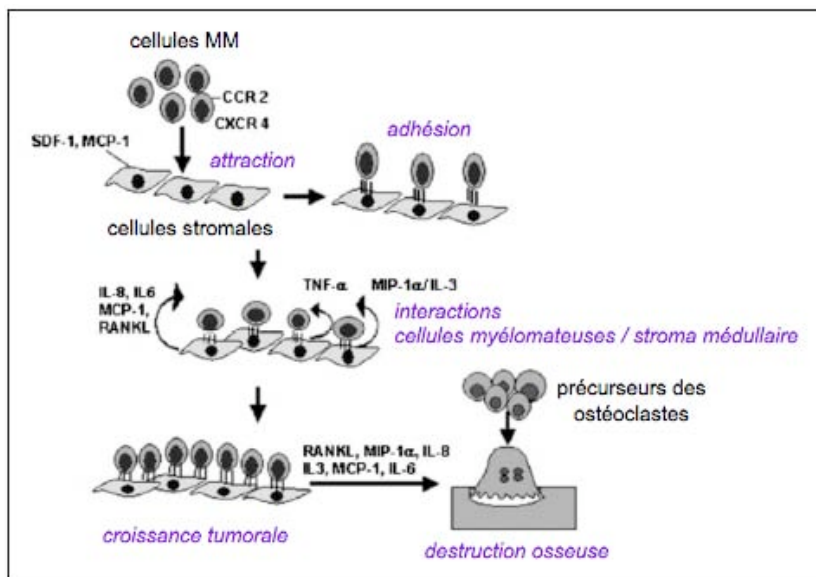


Figure 15 : Rôle des principales cytokines et chemokines dans la physiopathologie du myélome multiple (d'après Aggarwal *et al*, 2006).

MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1* ; MIP-1 α , *macrophage inflammatory protein-1 α* ; MM, myélome multiple ; RANKL, *receptor activator for nuclear factor kappa b ligand* ; SDF-1, *stromal cell-derived factor-1* ; TNF- α , *tumor necrosis factor- α* .

3.3.3. Angiogénèse

L'angiogénèse est une étape essentielle dans la progression tumorale. La survie et la prolifération des cellules malignes nécessitent en effet une vascularisation importante. Les cellules myélomateuses synthétisent du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), facteur de croissance qui stimule l'angiogénèse locale et dont les récepteurs sont exprimés par les cellules stromales médullaires et les cellules myéloïdes et monocytaires. Les cellules stromales répondent au VEGF par une forte augmentation de la synthèse d'IL-6, et en retour l'IL-6 induit une augmentation de la synthèse du VEGF par les cellules myélomateuses. Ces stimulations réciproques de la synthèse de VEGF et d'IL-6 sont responsables d'une angiogénèse accrue et d'une stimulation de la croissance tumorale (Harousseau *et al*, 2004).

Les interactions entre plasmocytes tumoraux et cellules stromales médullaires, médiées par des cytokines, chemokines et facteurs de croissance qui coopèrent de manière additive et/ou synergique, sont à la base des mécanismes grâce auxquels le clone tumoral prolifère localement, survit, résiste aux effets des traitements, recrute de nouveaux vaisseaux sanguins et perturbe le processus de remodelage osseux pour causer des lésions lytiques (Figure 15).

3.4. Mécanismes de l'ostéopathie associée au myélome

L'accumulation des cellules myélomateuses dans la moelle osseuse est associée à une augmentation du *turn over* osseux. Il en résulte un envahissement et une destruction de l'os, événements caractéristiques du MM.

L'ostéolyse associée au MM est la conséquence d'une augmentation de l'activité de résorption ostéoclastique dans la proximité des plasmocytes tumoraux (augmentation du recrutement et différenciation des ostéoclastes, augmentation de leur activité résorptive) associée à une inhibition de la formation osseuse.

3.4.1. Augmentation de la résorption osseuse

L'activité ostéoclastique est augmentée de façon marquée dans le MM, sous l'effet de diverses cytokines et chemokines produites par les cellules myélomateuses, ou par les cellules stromales stimulées par les cellules myélomateuses. Plusieurs molécules ont été identifiées, dont RANK ligand (RANKL, *receptor activator for nuclear factor kappa b ligand*), l'ostéoprotégérine, MIP-1 α , l'IL-6 et l'IL-3, ainsi que MCP-1, IL-8 et SDF-1 (Aggarwal et al, 2006 ; Barille-Nion et al, 2003 ; Roodman, 2009) (Figure 15).

En retour, certaines molécules produites directement ou indirectement par les ostéoclastes sont essentielles pour la croissance et la survie des cellules myélomateuses (IL-6 par exemple). Cela crée un « cercle vicieux » dans lequel le processus de résorption osseuse relargue des facteurs de croissance qui augmentent la masse tumorale qui, en retour, exacerbe le processus ostéolytique (Barille-Nion et al, 2003 ; Roodman, 2009).

3.4.2. Diminution de l'activité ostéoblastique

En plus de l'augmentation de l'activité ostéoclastique, l'activité ostéoblastique est fortement diminuée dans le MM, sous l'influence de divers inhibiteurs de la différenciation des ostéoblastes comme l'IL-3

et l'IL-7, ainsi que Dickkopf (DKK1), produit par les plasmocytes tumoraux, inhibiteur de la voie de signalisation Wnt qui joue un rôle important dans l'ostéogénèse (*Barille-Nion et al, 2003 ; Harousseau et al, 2004 ; Roodman, 2009*).

Outre les lésions osseuses lytiques, les principales conséquences de la prolifération plasmocytaire clonale du MM qui se manifestent sur le plan clinique et biologique sont la production de l'Ig monoclonale, l'insuffisance médullaire, l'atteinte rénale et l'hypercalcémie. Nous allons développer ces aspects dans les chapitres suivants.

4. Conséquences cliniques de l'expansion clonale myélomateuse

Les éléments cliniques qui caractérisent le MM peuvent être présents dès le diagnostic, ou apparaître au cours de l'évolution de la maladie.

Ils comprennent des symptômes généraux, non spécifiques mais habituels et précoces, tels qu'une altération de l'état général. L'asthénie constitue un symptôme majeur trouvé chez environ 30% des patients, souvent liée à un syndrome anémique. Une perte de poids modeste est observée chez environ un quart des patients (*Kyle et al, 2003*).

À côté de cela, le MM se manifeste par des symptômes plus spécifiques, notamment osseux et rénaux.

4.1. Atteinte osseuse

La symptomatologie du MM est dominée par les signes osseux. Les lésions ostéolytiques sont une cause majeure de morbidité chez les patients atteints de cette hémopathie.

Les mécanismes de l'ostéopathie associée au MM ont été détaillés précédemment (*cf* paragraphe 3.4.).

Les lésions d'ostéolyse forment des foyers à différents endroits, particulièrement aux sites de l'hématopoïèse. Elles constituent des zones de fragilité qui peuvent aboutir à des fractures et des tassements vertébraux, parfois compliqués de compression médullaire.

La radiologie standard est la technique de référence pour l'exploration de l'atteinte osseuse associée au MM (*Kyle & Rajkumar, 2009*). Le bilan radiologique comprend des clichés du crâne, du rachis complet, du bassin, du thorax et des grils costaux, sans oublier les os longs (humérus et fémurs). Il existe des lésions radiologiques dans près de 70% des cas au diagnostic, et 80% des cas dans les MM évolués (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*). L'aspect radiologique des lésions est généralement celui de lacunes bien circonscrites, sans condensation périphérique, dites « à l'emporte-pièce » (*Figure 16*). L'atteinte osseuse peut aussi se manifester sous forme de fractures, de tassements, de tuméfactions osseuses, ou encore d'une déminéralisation osseuse diffuse pouvant simuler une ostéoporose. Les aspects de condensation sont très rares.



Figure 16 : Radiographie du crâne (profil).

Multiples plages d'ostéolyse sous forme de lacunes « à l'emporte-pièce », caractéristiques du myélome multiple.

D'autres techniques d'imagerie se sont montrées plus ou moins adaptées pour évaluer l'ostéopathie dans un contexte de MM. La scintigraphie osseuse n'a aucun intérêt car les lésions associées au MM sont purement lytiques. Le TDM (tomodensitométrie) ou l'IRM (imagerie par résonance magnétique) peuvent être nécessaires pour définir des lésions osseuses en cas de douleurs sans signes radiologiques patents (Kyle & Rajkumar, 2009). Ces techniques sont plus sensibles que la radiographie pour détecter un envahissement osseux (Kyle & Rajkumar, 2009). L'IRM de diffusion corps entier avec injection de gadolinium permet de faire une cartographie des infiltrations myélomateuses et de mieux suivre l'action des nouvelles thérapies. L'IRM est aussi essentielle si l'on suspecte une compression médullaire.

4.2. Atteinte rénale

Comme l'ostéopathie, l'insuffisance rénale est une cause majeure de morbidité et également de mortalité chez les patients atteints de MM. Au diagnostic, plus de 50% des patients présentent une atteinte rénale ; 12 à 20% ont une insuffisance rénale aigüe et 10% d'entre eux deviennent dialyse-dépendants (Hutchison et al, 2007).

Pour permettre une conformation correcte de l'Ig, le plasmocyte produit un excès de chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes (Lopez et al, 2006). Des chaînes légères libres (CLL) sont donc produites en conditions physiologiques et sont rapidement épurées et métabolisées par le rein, filtrées au niveau glomérulaire, réabsorbées par le tubule proximal et finalement sécrétées par les muqueuses du tubule distal. Les plasmocytes tumoraux produisent une Ig monoclonale en grande

quantité. Elle est soit complète, soit formée seulement d'une chaîne légère. Dans les deux cas, la quantité de CLL est anormalement élevée chez les patients atteints de MM. Lorsque ces CLL en quantités excessives atteignent le rein et passent dans les glomérules, la capacité d'absorption des tubules proximaux est dépassée. Les CLL entrent alors dans les tubules distaux et précipitent sous forme de cylindres hyalins, conduisant à une obstruction tubulaire. Les CLL ont également une action tubulotoxique propre responsable d'une atrophie de l'épithélium.

L'atteinte rénale du MM est donc principalement liée à une néphropathie tubulo-interstitielle par précipitation intra-tubulaire de CLL (« rein myélomateux »). Cela explique qu'elle soit observée plus fréquemment dans les MM à chaînes légères. Cliniquement, la tubulopathie myélomateuse se présente comme une insuffisance rénale de constitution progressive, à diurèse conservée.

Elle est souvent aggravée par une déshydratation (fièvre, vomissements), une infection, des traitements médicamenteux (notamment l'administration intraveineuse de produits iodés), ou encore l'hypercalcémie, autant de facteurs qui favorisent la précipitation intratubulaire des chaînes légères d'Ig. Elle peut alors se présenter sous forme d'une insuffisance rénale oligo-anurique.

Enfin, d'autres facteurs sont susceptibles de concourir à l'atteinte rénale associée au MM, tels qu'une amylose (*cf* paragraphe 4.4.), des dépôts d'Ig monoclonale, la surcharge calcique, une cryoglobulinémie, ou encore l'hyperviscosité (*Kyle et al, 2003*).

4.3. *Manifestations neurologiques*

Il s'agit le plus souvent de compression médullaire, compression de la gaine nerveuse par la prolifération plasmocytaire, par contiguïté avec l'atteinte osseuse, par une vertèbre fracturée. La compression médullaire se traduit cliniquement par des signes radiculaires puis une paraplégie nécessitant, après IRM, un traitement chirurgical d'urgence.

On peut également observer des neuropathies sensitivo-motrices, rares, souvent associées à un plasmocytome localisé ostéocondensant ou à une amylose.

Enfin, d'autres symptômes neurologiques comme des troubles de la vision, des bourdonnements d'oreille ou une confusion peuvent accompagner le MM, en relation avec des désordres métaboliques généraux (hypercalcémie, hyperazotémie, hyperviscosité).

4.4. Amylose AL

Elle se rencontre dans 10% des cas (surtout les MM à IgD et à chaînes légères λ). La substance amyloïde est composée de chaînes légères d'Ig. Elle peut entraîner des lésions rénales isolées ou être diffuse, touchant la peau, le cœur, le tube digestif, la langue, les muscles, le système nerveux.

4.5. Complications infectieuses

La défense de l'organisme contre les infections est totalement conditionnée par la présence de la lignée plasmocytaire, et plus précisément par l'intégrité des plasmocytes, puisque ce sont eux qui assurent l'immunité humorale par la production d'anticorps.

Chaque pathogène présentant un mélange d'antigènes, la stimulation antigénique est toujours polyclonale. Chaque clone de plasmocytes produit des anticorps spécifiques d'un antigène et ces anticorps appartiennent à différentes classes d'Ig. Lorsqu'une cellule plasmocytaire est transformée, il peut en résulter une prolifération illimitée d'un seul clone. C'est ce qui se passe dans le MM. L'Ig produite est monoclonale, caractérisée par son homogénéité, à l'opposé de l'extrême hétérogénéité des Ig physiologiques. Elle est mono-spécifique (identité des régions variables des chaînes lourdes et légères) et ne contribue pas à la défense immunitaire.

En outre, la prolifération plasmocytaire maligne s'accompagne d'une inhibition de la lymphopoïèse B normale, d'où une dépression de la synthèse des Ig normales, à laquelle s'associent des anomalies de la réponse anticorps et des anomalies des cellules T (diminution des CD4, augmentation des CD8).

Le MM s'accompagne donc d'un déficit de l'immunité, responsable de l'apparition de complications infectieuses fréquentes et sévères, souvent causes de décès. Elles sont le plus souvent bactériennes, respiratoires (50% des cas ; *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*), rénales (30% des cas ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Klebsiella*) ou systémiques (8% des cas).

4.6. *Syndrome d'hyperviscosité*

Le syndrome d'hyperviscosité survient lorsque le taux de l'Ig dans le sang est très important. Ce syndrome peut donc être observé dans le MM, plus particulièrement dans les MM à IgA, puisque ces molécules ont tendance à polymériser, ou dans les rares MM à IgM (pentamériques). Cependant, il s'agit d'un événement très rare dans le MM. Il survient plus fréquemment dans la maladie de Waldenström, caractérisée par une très forte production d'IgM monoclonale.

Cliniquement, l'hyperviscosité se manifeste par une asthénie, des étourdissements, des symptômes neurologiques, des troubles de la vision, des bourdonnements d'oreilles et des saignements muqueux.

4.7. *Autres*

L'Ig myélomateuse peut être douée d'une activité anticorps, par exemple de type anti-coagulant circulant, anti-streptolysine O ou anti-lipoprotéine, qui va enrichir la symptomatologie. Elle peut aussi avoir une propriété de cryoglobuline et être responsable d'un acrosyndrome, d'un purpura vasculaire et de polyarthralgies.

Le clone plasmocytaire malin peut également atteindre des sites extra-osseux, avec notamment des localisations hépatiques, spléniques, ganglionnaires, digestives ou pleuro-pulmonaires.

5. Biologie du myélome

Outre un bilan radiologique, la prise en charge du MM comprend diverses analyses biologiques, indispensables au diagnostic, à l'évaluation du pronostic et à la décision thérapeutique (recherche des facteurs de gravité et de co-morbidités associées), et au suivi de la pathologie, notamment l'évaluation de la réponse au traitement.

5.1. Exploration de l'Ig monoclonale

Sauf s'il est non sécrétant (dans de très rares cas, aucune synthèse et/ou sécrétion d'Ig n'a lieu), le MM est caractérisé par la présence d'une Ig monoclonale dans le sérum et/ou les urines. La prolifération d'un seul clone plasmocytaire se traduit en effet par la synthèse en grande quantité d'Ig présentant une identité immunologique (*cf* paragraphe 4.5.), et également une identité de charge électrique et de structure, à la base de leur mise en évidence et de leur caractérisation.

Les Ig monoclonales sont recherchées dans le sérum et les urines, parfois aussi dans les liquides de ponction.

5.1.1. Analyse du sérum

L'étude des protéines sériques fournit des informations non seulement sur le composant monoclonal (M) mais aussi sur la production des Ig polyclonales physiologiques, fréquemment altérée dans le MM, ainsi que sur l'albuminémie, qui peut être diminuée (*San Miguel et al, 2006*).

▪ Dosage des protéines sériques totales

La protidémie est déterminée par la technique du Biuret. Cet examen de base, non spécifique, permet d'évoquer l'existence d'une gammapathie monoclonale en mettant en évidence une **hyperprotidémie** importante, souvent supérieure à 100 g/L, atteignant parfois 120 à 130 g/L. L'hyperprotidémie reflète l'augmentation de la masse protéique circulante dans le MM. Cependant, notons qu'une hypoprotidémie est souvent trouvée dans les MM à chaînes légères.

▪ Électrophorèse des protéines sériques

La recherche d'une Ig monoclonale nécessite une analyse des protéines sériques par électrophorèse (EPS, électrophorèse des protéines sériques). Les techniques utilisées en routine sont

l'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose ou en gel d'agarose, plus sensible (*San Miguel et al, 2006*). L'électrophorèse capillaire plus simple d'utilisation, plus rapide et moins coûteuse, est cependant moins sensible que les techniques classiques.

Différentes fractions protéiques sont identifiées selon leur vitesse de migration électrophorétique : albumine, puis α_1 -globulines, α_2 -globulines, β -globulines et enfin γ -globulines (Figure 17a). L'analyse est qualitative, par l'examen visuel des bandes, et quantitative, par intégration densitométrique. Ainsi, chaque fraction séparée est représentée par un pic dont la surface est proportionnelle à l'intensité de la « tache » observée. L'ensemble constitue le profil électrophorétique (Figure 17a). La concentration de chaque fraction protéique peut être extrapolée à partir de la protidémie.

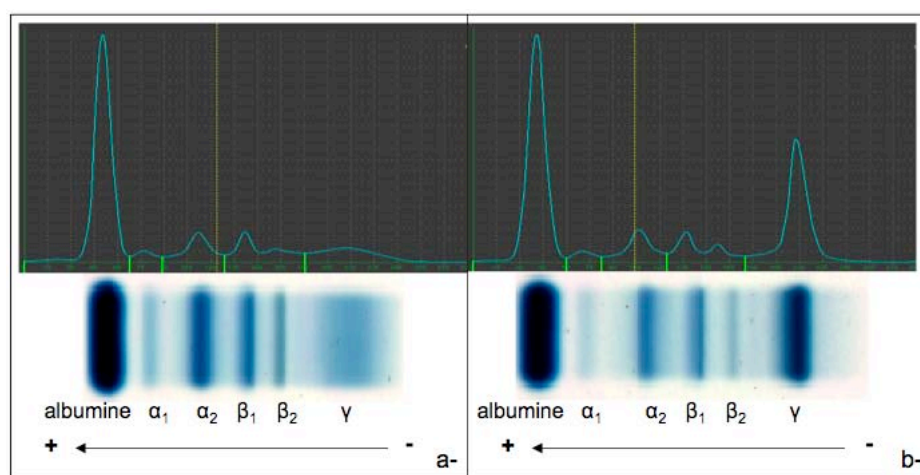


Figure 17 : Electrophorèses des protéines sériques
(gels de migration et profils obtenus par intégration densitométrique).

a- Profil normal. b- Profil de gammopathie monoclonale.

La présence d'une gammopathie monoclonale est caractérisée par la présence d'une bande étroite et dense (mobilité électrophorétique homogène du composant M, du fait de l'identité de charge électrique), soit un pic étroit sur le tracé électrophorétique, migrant le plus souvent dans la zone des γ -globulines (Figure 17b), mais aussi parfois des β - voire des α_2 -globulines. Cependant, le pic monoclonal est parfois absent ou discret lorsque le composant M a un poids moléculaire suffisamment faible pour franchir le filtre glomérulaire rénal. C'est le cas dans 15 à 20% des MM qui ne sécrètent que des CLL (myélomes à chaînes légères) (*Greipp et al, 2005 ; The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*).

Le tracé électrophorétique permet également de déterminer une éventuelle **hypoalbuminémie** associée (l'albuminémie est inférieure à 30 g/L dans 15 % des cas) (Kyle et al, 2003) ou encore la présence d'une **hypogammaglobulinémie**.

▪ **Immunofixation ou immunoélectrophorèse des protéines sériques**

Une immunoélectrophorèse (IEP) ou une immunofixation (IF) est réalisée devant toute anomalie de l'électrophorèse (pic monoclonal, hypogammaglobulinémie) ou devant la présence de symptômes cliniques évocateurs.

La population d'Ig monoclonale ne possède qu'un seul type de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère. Cette identité structurale est à la base du typage immunochimique par IEP ou IF. Ces deux techniques reposent sur le principe d'immunoprécipitation des chaînes d'Ig en présence de l'anti-sérum correspondant. En IEP, l'immunoprécipité apparaît sous forme d'arc ; en IF il est visualisé sous forme de bande homogène. L'interprétation est comparative par rapport à un sérum normal.

(Figure 18)

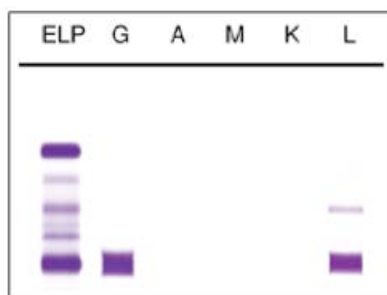


Figure 18 : Immunofixation des protéines sériques.

ELP, électrophorèse des protéines d'un sérum normal. A droite, profil correspondant à une gammapathie monoclonale $\gamma 2\lambda 2$, avec des chaînes λ libres.

En ce qui concerne les chaînes légères, elles sont de type κ dans environ deux tiers des cas et λ dans environ un tiers des cas. Quant aux chaînes lourdes, il s'agit le plus souvent de chaînes γ : les **MM à IgG** représentent un peu plus de 50% des cas. Dans environ 20% des cas c'est une chaîne lourde α (**MM à IgA**). Plus rarement, il s'agit d'une chaîne μ (**MM à IgM**), δ (**MM à IgD**, 1 à 2% des cas) ou exceptionnellement ϵ (**MM à IgE**). (Greipp et al, 2005 ; The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003)

▪ Dosage pondéral des Ig dans le sérum

Le dosage pondéral des Ig par néphélémétrie ou immunodiffusion radiale apprécie l'éventuelle baisse des autres classes d'Ig (observée dans 90% des cas) (Kyle *et al*, 2003). Le **taux d'Ig physiologiques** renseigne sur les risques infectieux encourus par le patient.

Si le dosage immunochimique des Ig polyclonales est utilisé en routine dans le MM, notons bien que le dosage de l'Ig monoclonale par ces techniques est entâché d'erreur, surtout si la gammopathie monoclonale est importante. Quand le composant M est bien individualisé, la quantification par électrophorèse est la seule méthode d'évaluation valable (San Miguel *et al*, 2006).

5.1.2. Analyse des urines

Un recueil des urines de 24 heures est nécessaire pour la détermination de la quantité totale de protéine excrétée par jour. Une protéinurie significative, souvent supérieure à 1 gramme par 24 heures, peut évoquer l'existence d'un passage de CLL monoclonales dans les urines que l'on nomme **protéinurie de Bence Jones (PBJ)**.

Cependant, la protéinurie seule n'a pas de signification. Elle doit être complétée par une analyse qualitative des protéines urinaires par électrophorèse (EPU, électrophorèse des protéines urinaires), après concentration d'un échantillon des urines de 24 heures. Dans le diagnostic de MM à chaînes légères, la recherche de PBJ par électrophorèse est capitale car, comme nous l'avons mentionné, le pic est souvent absent sur le tracé électrophorétique des protéines sériques.

L'IEP ou l'IF identifient la nature de la chaîne légère (κ dans environ deux tiers des cas, λ dans environ un tiers des cas) (Kyle *et al*, 2003), associée ou non à un passage de l'Ig entière, et permettent également de caractériser le type d'atteinte rénale.

Notons que la plupart des bandelettes urinaires utilisées pour la recherche de protéinurie ne mettent en évidence que de l'albumine et ne détectent pas les chaînes légères d'Ig.

5.1.3. Intérêt du dosage des chaînes légères libres sériques

Comme nous venons de le voir, le répertoire d'analyses pour identifier et quantifier les Ig monoclonales comprend, depuis les années 1990, les techniques d'électrophorèse et immunofixation des protéines sériques et urinaires ainsi que le dosage pondéral des chaînes lourdes d'Ig dans le sérum.

Depuis le début des années 2000, un dosage spécifique des CLL sériques en néphélométrie ou turbidimétrie est commercialement disponible. Ce test (Freelite[®], *The Binding Site*) est basé sur l'utilisation d'anticorps qui réagissent uniquement avec les épitopes masqués lorsque la chaîne légère est liée à la chaîne lourde, mais accessibles quand les chaînes légères sont libres (*Dispenzieri et al, 2009 ; Lopez et al, 2006*) (Figure 19). L'analyse consiste en deux mesures séparées : un dosage quantitatif des CLL κ et un dosage quantitatif des CLL λ . Elle se fait à partir du sérum car, du fait de l'importante capacité du rein à cataboliser ces protéines, la mesure des CLL sériques est plus sensible que celle des CLL urinaires (*San Miguel et al, 2006*).

La production anormale (monoclonale) de CLL dans le MM est détectée par les modifications du rapport CLL κ /CLL λ . Des concentrations élevées des deux types de CLL avec un rapport κ/λ normal peuvent être attribuées à une insuffisance rénale ou une surproduction de CLL polyclonales lors d'un état inflammatoire. Des concentrations élevées des deux types de CLL avec un rapport κ/λ anormal laissent supposer une gammapathie monoclonale, associée ou non à une insuffisance rénale.

La sensibilité du test est annoncée à 2 mg/L, ce qui le rend plus sensible que l'immunofixation (50 à 300 mg/L). Les recommandations internationales positionnent le dosage sérique des CLL comme une alternative à l'analyse de la PBJ lors du dépistage des gammapathies monoclonales (MM ou autres pathologies apparentées), de façon conjointe à l'EPS/IF (*Lopez et al, 2006*). Pour le suivi quantitatif des patients atteints de MM, il ne peut pas remplacer l'électrophorèse des protéines, sauf dans le cas des patients pauci ou oligo-sécrétants, ainsi que deux tiers des patients dits « non sécrétants », pour lesquels le dosage des CLL sériques s'avère un progrès remarquable.

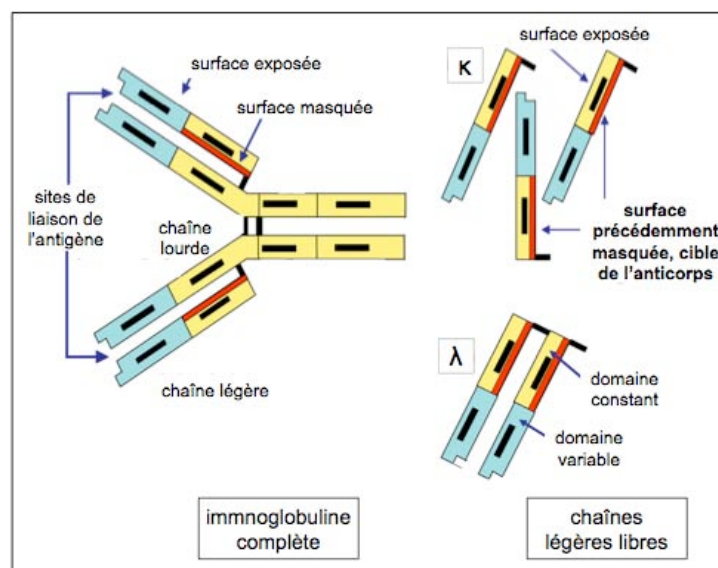


Figure 19 : Dosage des chaînes légères libres sériques : principe (d'après *Dispenzieri et al, 2009*).

5.2. Autres paramètres biochimiques

▪ Créatininémie

L'atteinte de la fonction rénale dans le MM est évaluée par l'augmentation créatininémie. Celle-ci est supérieure à 175 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) dans au moins 20% des cas au diagnostic, et deux fois plus fréquemment dans les formes évoluées de la maladie (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003 ; San Miguel et al, 2006*).

▪ Paramètres métaboliques

Des perturbations du métabolisme phosphocalcique reflètent l'ostéolyse induite par la tumeur myélomateuse. On peut ainsi observer une hypercalcémie (calcémie supérieure à 110 mg/L soit 2,75 mmol/L) dans 10% à 30% des cas (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003 ; San Miguel et al, 2006*). Moins fréquemment le MM peut s'accompagner d'une hyperuricémie.

▪ Vitesse de sédimentation globulaire

La vitesse de sédimentation (VS) est accélérée dans la majorité des cas de MM, supérieure à 20 mm à la première heure et souvent supérieure à 100 mm (*Kyle et al, 2003*). Notons que si ce paramètre est normal dans un contexte de MM (10% des cas), il faut penser à un MM à chaînes légères ou à un MM non sécrétant. En effet, l'accélération de la VS reflète un déséquilibre protidique (hyperprotidémie) (*San Miguel et al, 2006*).

Il s'agit d'un examen non spécifique, modifié en présence d'un syndrome inflammatoire ou d'une hypergammaglobulinémie polyclonale importante, et influencé par l'anémie.

▪ Protéine C réactive

La protéine C réactive (CRP, *C reactive protein*) est un marqueur de l'activité du MM. En effet, au cours de cette hémopathie, l'IL-6 est produite en grande quantité par le micro-environnement tumoral (cellules stromales) et par les plasmocytes eux-mêmes, constituant le facteur de croissance essentiel de la prolifération des cellules myélomateuses (*cf paragraphe 3.3.2.*). Or, l'IL-6 stimule également la synthèse hépatique de la CRP.

La CRP est ainsi fréquemment augmentée dans le MM (*San Miguel et al, 2006*). Cependant, ce n'est pas un marqueur spécifique de l'activité de la maladie myélomateuse, car cette protéine de la phase aiguë de l'inflammation peut être augmentée par de nombreux autres facteurs.

▪ **β_2 -microglobuline sérique et lactate deshydrogénases**

La β_2 -microglobuline (β_2m) sérique est, nous le verrons plus loin (cf paragraphe 7.1.), un paramètre biologique capital dans le MM. C'est un marqueur de la prolifération lymphoplasmocytaire. Il reflète l'importance de la masse tumorale. Néanmoins, son élévation doit toujours être interprétée en fonction de l'état de la fonction rénale.

L'augmentation du taux de LDH (lactate deshydrogénases) signe le caractère prolifératif de la pathologie tumorale. Les LDH sont augmentées chez 15% à 20% des patients atteints de MM (San Miguel et al, 2006).

5.3. Hémogramme

La prolifération plasmocytaire médullaire retentit sur l'hémogramme à travers divers paramètres.

Une **anémie** (hémoglobine inférieure à 12 g/dL) est présente dans près de 70% des cas au diagnostic (The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003), et chez quasiment tous les patients dans les formes évoluées. Elle est généralement modérée en intensité (autour de 10 g/dL) mais peut être importante (hémoglobine inférieure à 8 g/dL, dans plus ou moins 10% des cas selon les études) (Kyle et al, 2003 ; San Miguel et al, 2006). Elle est normochrome normocytaire, parfois macrocytaire, arégénérative.

La physiopathologie de l'anémie associe un syndrome inflammatoire, une inhibition de l'érythropoïèse (sous l'action du TNF et de l'IL-1), l'insuffisance rénale (déficit en érythropoïétine), et l'insuffisance de production de la lignée érythrocytaire, du fait de l'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux. Les anémies d'origine carencielle ou hémolytique sont rares au diagnostic. Notons aussi qu'une hémodilution, conséquence des fortes protidémies observées dans le MM, peut majorer l'anémie.

Plus rarement, l'altération de l'hématopoïèse due à l'envahissement médullaire est responsable d'autres cytopénies, voir d'une pancytopénie, surtout dans les MM en fin d'évolution. Une **thrombopénie** inférieure à 100 G/L est observée dans 5% des cas au diagnostic (Kyle et al, 2003), et plus fréquemment dans les formes évoluées de la maladie. L'apparition d'une thrombopénie reflète généralement un degré important d'infiltration médullaire. Une **neutropénie** est également possible, mais rare, dans les stades tardifs de la pathologie. Le nombre de lymphocytes est normal ou parfois diminué.

Le passage de cellules myélomateuses dans la circulation sanguine est rare. Quelques plasmocytes (1 à 3%) sont trouvés sur le frottis sanguin chez 15% des patients (*San Miguel et al, 2006*).

Néanmoins, dans 2% des MM au diagnostic, les plasmocytes représentent plus de 20% des cellules du sang circulant, ou plus de 2 G/L, définissant une **leucémie à plasmocytes** (PCL, *plasma cell leukemia*) **primitive**. Lorsque cette plasmocytose sanguine importante est observée au cours de l'évolution du MM (2% des cas de MM également), on parle de **PCL secondaire**.

Enfin, notons que l'observation du frottis sanguin montre une **rouleau-formation des hématies**, qui s'empilent comme des assiettes (*Figure 20*). Ce phénomène est dû à l'hypergammaglobulinémie et est lié à l'accélération de la VS. Il est observé chez plus de 60% des patients atteints de MM (*Kyle et al, 2003 ; San Miguel et al, 2006*).

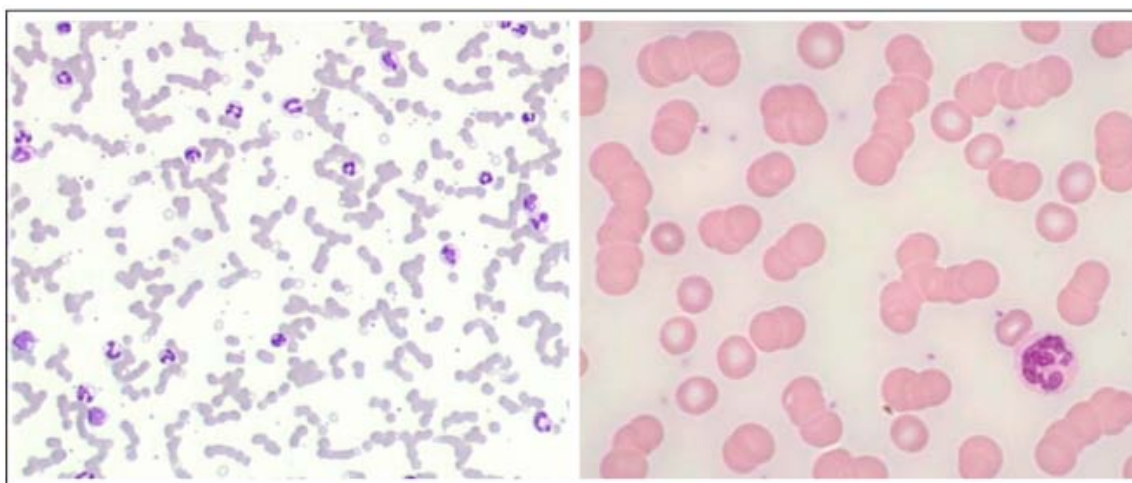


Figure 20 : Frottis sanguins colorés au MGG : rouleau-formation des hématies.

5.4. Myélogramme

Le MM est une pathologie avant tout médullaire. Le myélogramme tient donc logiquement une place prépondérante dans l'exploration biologique de cette hémopathie.

L'échantillon de moelle est prélevé par aspiration, généralement au niveau sternal ou iliaque, étalé sur lame, coloré au MGG et observé au microscope.

Dans le MM, la moelle est généralement de richesse normale, parfois augmentée si l'envahissement plasmocytaire est massif, et quelquefois un peu diminuée.

5.4.1. Plasmocytose médullaire

Dans la moelle osseuse normale, les plasmocytes représentent moins de 0,5% des éléments nucléés. Ce contingent est augmenté dans le MM, dans la plupart des cas **supérieur à 10%**, et pouvant atteindre 90% voir plus (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*). Notons que la plasmocytose médullaire peut également être augmentée dans d'autres situations, comme lors d'infections chroniques ou de maladies auto-immunes (*cf* paragraphe 6.2.).

L'infiltration plasmocytaire médullaire dans le MM n'est pas forcément homogène. Les plasmocytes tumoraux s'agrègent pour former des colonies (ou *clusters*). Le pourcentage de plasmocytes peut donc varier de façon significative selon le site d'aspiration, et parfois même la moelle paraît normale. Il peut alors être nécessaire de refaire la ponction de moelle dans un autre territoire, ou de réaliser une biopsie ostéo-médullaire (BOM). Malgré cela, le myélogramme reste la méthode de référence pour la quantification de l'infiltrat plasmocytaire médullaire (*San Miguel et al, 2006*).

5.4.2. Autres lignées cellulaires

Les autres lignées cellulaires peuvent être diminuées en fonction de l'importance de l'envahissement plasmocytaire.

De discrets signes de dysgranulopoïèse (quelques granulocytes hypogranuleux) sont possibles. Une dysérythropoïèse peut également être observée (cytoplasmes lacunaires, quelques mégakaryoblastes), d'étiologie mixte, inflammatoire et par carence en folates. Un syndrome myélodysplasique vrai peut être associé à un MM au diagnostic (1 à 2% des cas) ou en fin d'évolution de la pathologie.

5.4.3. Morphologie plasmocytaire

La morphologie des plasmocytes myélomateux est très variable. Elle peut être proche de la forme non tumorale ou, au contraire, s'en distinguer très nettement. De nombreuses anomalies peuvent être observées, mais elles ne sont pas indispensables au diagnostic.

▪ **Variations morphologiques selon le stade de maturation**

L'apparence des cellules plasmocytaires dans le MM varie fortement en fonction de leur stade de maturation ou de différenciation.

Morphologiquement, on peut distinguer parmi les cellules de la lignée plasmocytaire quatre stades (du plus mature au plus immature) (Figure 21) :

- le **plasmocyte mature**, caractérisé par un petit noyau excentré, une chromatine dense, mottée, et un cytoplasme bien développé, très basophile, avec un archoplasme bien visible (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 3.2.),
- une catégorie intermédiaire correspondant au **pré-plasmocyte**,
- le **plasmocyte immature**, avec un gros noyau excentré, une chromatine plus lâche et éventuellement un nucléole, un cytoplasme abondant et un archoplasme visible,
- le **plasmoblaste**, caractérisé par un rapport N/C élevé, un gros noyau central avec une chromatine fine, immature, un nucléole, et un cytoplasme réduit dans lequel on ne distingue pas d'archoplasme.

Afin d'objectiver l'observation du myélogramme dans le MM, Goasguen *et al* ont proposé un algorithme permettant d'identifier différents sous-types plasmocytaires sur la base de l'évaluation de trois critères morphologiques (Figure 22) :

- l'absence/présence de nucléole,
- l'aspect de la chromatine (mottée/intermédiaire/fine),
- le rapport N/C (inférieur ou supérieur à 0,6).

Le score obtenu permet de classer la cellule plasmocytaire observée selon son degré de maturité (Goasguen *et al*, 1999). Ce score contraignant est très peu appliqué en pratique quotidienne.

Selon la répartition des types cytologiques représentés sur le myélogramme, on identifie ainsi des formes plasmocytaires mûres et des formes immatures voire plasmoblastiques (Goasguen *et al*, 1999 ; Greipp *et al*, 1998).

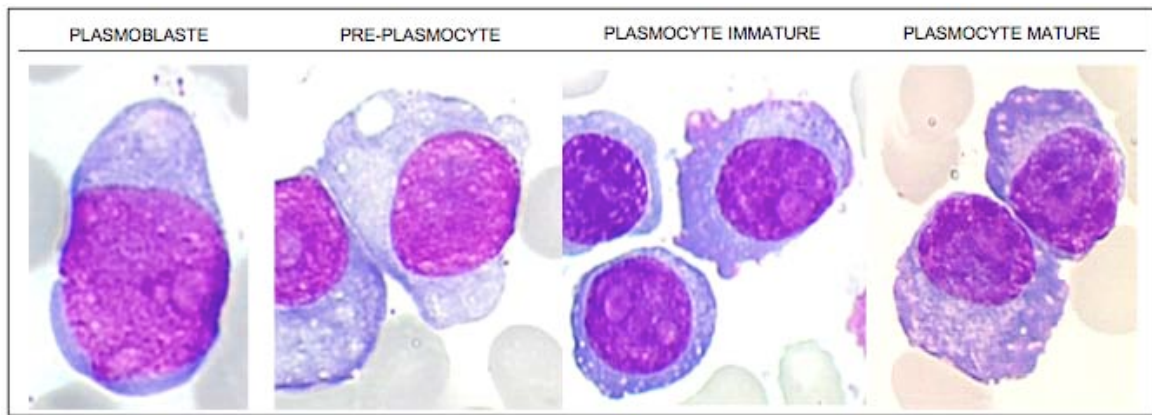


Figure 21 : Aspect morphologique des cellules plasmocytaires en fonction de leur stade de maturation (frottis médullaires colorés au MGG).

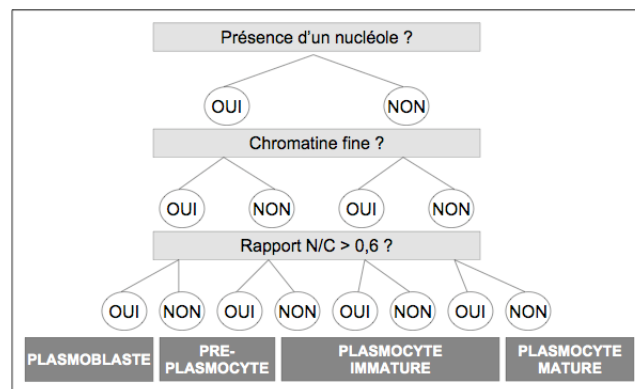


Figure 22 : Classification morphologique des cellules plasmocytaires selon leur degré de maturité (d'après Goasgen et al, 1999).

▪ Anisocytose

L'anisocytose (variabilité de taille) des plasmocytes au sein du prélèvement médullaire constitue un critère de malignité.

▪ Anomalies cytoplasmiques (Figure 23)

Le cytoplasme des plasmocytes est normalement abondant et très basophile, avec un archoplasme juxta-nucléaire. Diverses modifications sont possibles. On peut aussi bien les observer à l'état normal qu'en pathologie réactionnelle ou dans les gammopathies monoclonales idiopathiques et le MM. Notons bien qu'aucune anomalie cytoplasmique ne permet d'affirmer le caractère tumoral des plasmocytes.

Les particularités cytoplasmiques sont presque toujours liées à une anomalie de synthèse ou de sécrétion de l'Ig. Le contour cytoplasmique du plasmocyte est parfois déchiqueté, signe d'une activation membranaire et/ou d'une sécrétion accrue. Mais parmi les anomalies cytoplasmiques les plus remarquables, citons surtout la présence d'inclusions. Après coloration au MGG, ces inclusions peuvent prendre divers aspects : translucides ou de couleurs et de formes diverses, parfois en aiguilles ou en bâtonnets (*Gardais et al, 2001*). Les corps de Russell correspondent à des inclusions rondes grises, bleutées ou orangées, uniques ou multiples, réalisant parfois l'aspect de cellule en « grappe de raisin ». Ce sont des cristaux d'Ig. On peut également trouver dans le cytoplasme des plasmocytes des cristaux azurophiles en forme d'aiguilles, mimant des corps d'Auer, ou bien plutôt ovoïdes, parfois inclus dans une vacuole. La morphologie, la chimie, l'ultrastructure de ces structures cristallines ont fait l'objet d'études détaillées. Néanmoins, leur nature exacte et les mécanismes conduisant à leur apparition restent partiellement inexpliqués. Parfois, le cytoplasme apparaît totalement rosé ou rouge (azurophile). On parle alors de « plasmocyte flammé ». La présence de cellules de Mott, liée à une vacuolisation cytoplasmique, témoigne du stockage intracellulaire des Ig. On peut également observer d'autres types d'inclusions comme de l'hémossidérine, ou encore des plasmocytes contenant des érythrocytes (érythrophagocytose).

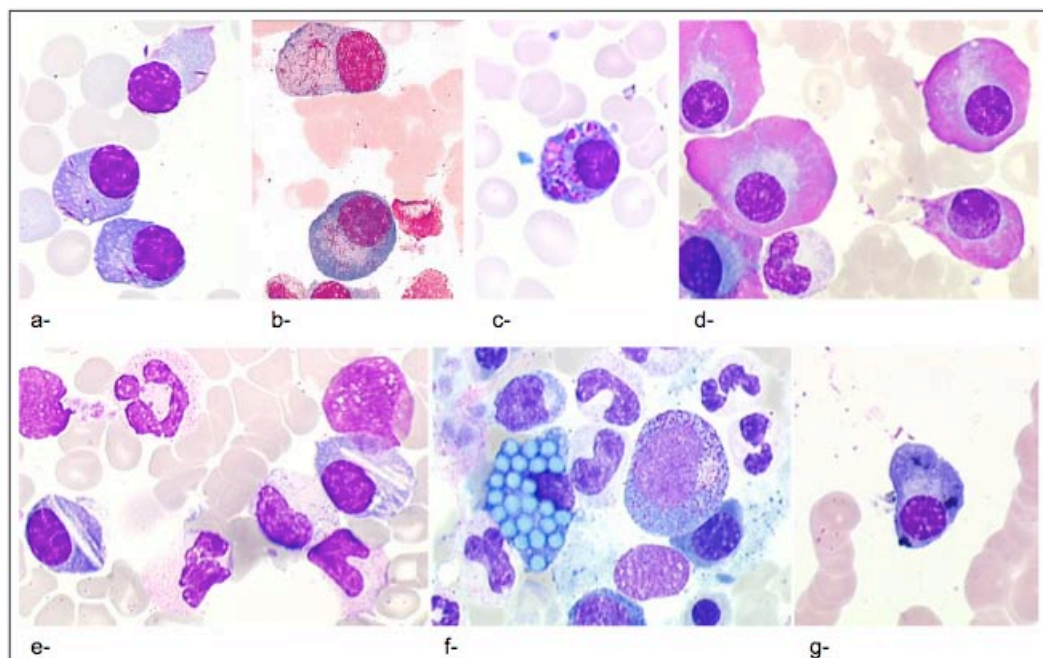


Figure 23 : Anomalies cytoplasmiques des plasmocytes (frottis médullaires colorés au MGG).

a- et b- Inclusions azurophiles en aiguilles évoquant des corps d'Auer. c- Volumineuses inclusions azurophiles intravacuolaires. d- Plasmocyte flammé. e- Volumineuses inclusions incolores. f- Cellule de Mott. g- Inclusions d'hémossidérine.

▪ **Anomalies nucléaires** (Figure 24)

Contrairement aux particularités cytoplasmiques que nous venons de citer, les anomalies du noyau ne s'observent, à de rares exceptions près, qu'en pathologie maligne. Le contour nucléaire du plasmocyte, normalement ovalaire ou rond, peut devenir irrégulier. Il peut s'agir d'un bourgeonnement, d'un étranglement (aspect en haltères) ou d'une plurilobulation (aspect en trèfle ou folié). Les noyaux peuvent aussi prendre un aspect monocytoïde (Leleu *et al*, 2005). Enfin, il est possible d'observer des pseudo-inclusions nucléaires (corps de Dutcher). L'existence de nombreuses mitoses est aussi un signe de malignité.

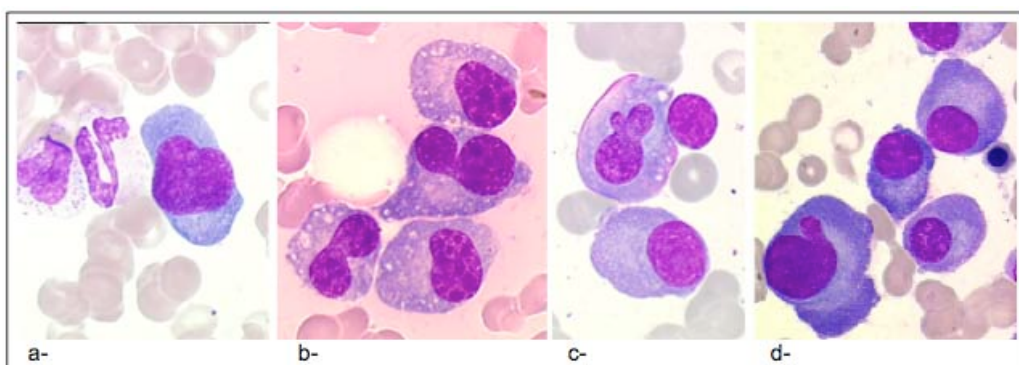


Figure 24 : Anomalies nucléaires des plasmocytes (frottis médullaires colorés au MGG).

a- Aspect monocytoïde. b- Aspect en haltères (étranglement). c- Plurilobulation. d- Bourgeonnement.

5.5. Cytogénétique

Comme nous l'avons dit précédemment (*cf* paragraphe 3.2.), l'étude cytogénétique du MM est difficile, notamment en raison du faible taux de prolifération des cellules myélomateuses et de l'infiltration tumorale parfois peu importante dans les échantillons médullaires. Ainsi, la cytogénétique conventionnelle (caryotype), qui n'analyse que des cellules en cours de division, a longtemps sous-estimé la fréquence des anomalies génétiques observables dans le MM. Le développement des techniques de FISH (*fluorescent in situ hybridization* ou hybridation *in situ* par fluorescence), qui s'appliquent aussi bien aux cellules en métaphase qu'en interphase, a montré que des anomalies génétiques sont trouvées chez une grande majorité des patients (plus de 90%), environ trois fois plus fréquemment qu'avec les techniques « conventionnelles » (Avet-Loiseau *et al*, 2007).

De plus, même parmi les patients présentant un caryotype anormal, certaines des aberrations parmi les plus importantes dans le MM peuvent être silencieuses au caryotype. Ainsi, les translocations IgH sont difficiles à voir sur un caryotype du fait de la localisation télomérique du locus 14q32, et de ce fait sont sous-estimées par cette technique. Outre la recherche de trisomies et monosomies, la FISH peut être appliquée à la recherche de ces translocations, grâce à l'utilisation de sondes qui localisent les régions constantes et variables IgH.

Finalement, la FISH est une technique sensible et spécifique qui permet l'identification des anomalies génétiques critiques du MM (*Fonseca et al, 2004*). La délétion du chromosome 13, et surtout t(4;14) et del17p sont ainsi recherchées par FISH au diagnostic chez les patients atteints de MM.

6. Diagnostic

Le MM peut être découvert dans un contexte hématologique (syndrome anémique), rhumatologique (signes osseux) ou néphrologique (découverte d'une insuffisance rénale), ce qui rend sa prise en charge multidisciplinaire. La découverte peut aussi être fortuite, devant la découverte systématique d'une VS très élevée ou d'un pic à l'EPS.

6.1. Critères diagnostiques

Le diagnostic du MM repose sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques. L'expression clinique est variable, allant de la forme indolente à la forme symptomatique agressive, ces formes se succédant souvent séquentiellement au cours de l'évolution. Les critères biologiques associent une augmentation de la plasmocytose médullaire et la présence d'une Ig monoclonale sérique et/ou urinaire.

Les critères diagnostiques internationaux consensuels du MM (WHO ; Swerdlow *et al*, 2008) dérivent en grande partie des travaux de l'*International Myeloma Working Group* (IMWG) (*The IMWG*, 2003 ; Kyle & Rajkumar, 2009). Ils sont détaillés ci-dessous et résumés en annexe de ce mémoire (Annexe1).

Le diagnostic du MM repose sur l'association de trois critères (deux critères biologiques et un critère clinique) :

- la mise en évidence, à l'examen du myélogramme, d'une **plasmocytose médullaire** excessive, supérieure à 10% des cellules nucléées de la moelle osseuse.
- la présence d'une **Ig monoclonale sérique et/ou urinaire (protéine M)** objectivée par l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines sériques et/ou urinaires.

Ce critère ne comprend pas de valeur seuil quantitative. Néanmoins, dans la plupart des cas, le taux de protéine M est supérieur à 30 g/L pour une IgG, 25 g/L pour une IgA, ou 1 g/24 heures pour les chaînes légères urinaires (PBJ).

- une (ou plusieurs) **atteinte(s) organique(s)** compatible(s) avec la présentation clinique d'un MM et ne pouvant pas être expliquée(s) autrement (ROTI, *Related Organ or Tissue Impairment*). Ces éléments sont couramment désignés sous l'acronyme « CRAB », à savoir :

- une hyperCalcémie, supérieure à 2,75 mmol/L (soit 110 mg/L) ou supérieure à 0,25 mmol/L au-dessus de la limite supérieure normale,
- une atteinte Rénale, avec une créatininémie supérieure à 175 µmol/L (soit 20 mg/L),
- une Anémie, avec un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL ou plus de 2 g/dL en-dessous de la limite inférieure normale,
- des lésions osseuses (Bone), lésions lytiques ou ostéopénie sévère ou fractures pathologiques.

Ces critères diagnostiques permettent de distinguer les formes de **MM symptomatiques** des **formes asymptomatiques** dites **indolentes (SMM, smoldering myeloma)**. Le MM indolent est ainsi défini par la présence de l'un ou des deux critères biologiques cités ci-dessus (plasmocytose médullaire supérieure à 10% et/ou protéine M supérieure à 30 g/L) et l'absence d'atteinte organique attribuable au processus de prolifération plasmocytaire (aucun des critères « CRAB »). Cet état peut rester stable pendant plusieurs années, mais l'évolution vers un MM symptomatique est inéluctable (taux de transformation d'environ 10% chaque année) et justifie une surveillance étroite.

Le diagnostic de MM peut aussi être affirmé dans certains cas particuliers ne répondant pas à tous les critères diagnostiques cités ci-dessus :

- avec une plasmocytose médullaire inférieure à 10%, s'il existe des lésions osseuses caractéristiques, *a fortiori* si leur biopsie montre un envahissement plasmocytaire, ou s'il existe une anémie inférieure à 10 g/dL ou une hypercalcémie sans autre étiologie,
- sans Ig monoclonale sérique ou urinaire, si la plasmocytose médullaire dépasse 20% ou si les lésions osseuses sont caractéristiques (rares MM non excréteurs ou non sécrétants).

6.2. Diagnostic différentiel

Quand le tableau clinico-biologique est complet, le diagnostic ne pose guère de problème majeur. La situation est plus difficile quand la triade (plasmocytose médullaire, protéine M et atteinte organique) n'est pas complète. Une plasmocytose excessive et/ou une gammapathie monoclonale peuvent se rencontrer également dans d'autres situations, et parfois le diagnostic de MM peut être difficile à établir avec certitude. En effet, si le MM est clairement défini comme une expansion monoclonale

maligne de plasmocytes médullaires (avec une atteinte organique), il existe plusieurs « formes frontières » de cette pathologie (Kyle & Rajkumar, 2009).

- **La plasmocytose réactionnelle (PR)** correspond à une expansion transitoire de plasmoblastes et de plasmocytes polyclonaux. Les plasmocytoses sanguines sont peu fréquentes. Elles accompagnent certains syndromes mononucléosiques et peuvent s'observer notamment dans des cas de rubéole ou d'hépatite virale. Les plasmocytoses médullaires sont plus importantes en pratique diagnostique. Elles peuvent être associées à des réactions allergiques, des viroses diverses, des maladies immunitaires (rhumatismes inflammatoires), des cirrhoses, aussi bien que des hémopathies malignes, comme certains lymphomes T avec activation B, ou d'autres cancers avec métastases ostéo-médullaires.

- **La MGUS** (*monoclonal gammopathy of unknown significance*) correspond à une expansion monoclonale stable asymptomatique de plasmocytes médullaires (inférieure à 10%). Cette gammopathie monoclonale constitue un état pré-tumoral stable de durée variable qui peut se transformer en hémopathie maligne (environ 1% par an évoluent en MM). Les critères diagnostiques de MGUS sont résumés en annexe (Annexe 1).

- **Le plasmocytome** correspond à une localisation isolée stable de plasmocytes monoclonaux anormaux. Cette tumeur plasmocytaire solide peut être osseuse, ganglionnaire ou viscérale. Son caractère excréteur n'est pas constant et contrairement au MM, le myélogramme ne met généralement pas en évidence d'infiltration médullaire par les plasmocytes tumoraux. Le diagnostic est histologique. Le risque d'évolution en MM est relativement important (15 à 55% selon les cas).

Les lésions osseuses du plasmocytome peuvent être associées de façon plus ou moins complète à une Polyneuropathie, une Organomégalie (foie, rate, ganglions), une Endocrinopathie, la présence d'une Ig Monoclonale et des modifications cutanées (Skin) formant un syndrome désigné par l'acronyme **POEMS**.

- **Autres** : La maladie de Waldenström (gammopathie monoclonale maligne à IgM, prolifération lymphoplasmocytaire) ainsi que l'amylose AL primaire et les maladies de dépôts des chaînes lourdes ou légères d'Ig peuvent également être considérées comme des pathologies « apparentées » au MM du point de vue diagnostique. Devant une atteinte osseuse, les diagnostics d'ostéoporose commune, de cancer secondaire des os ou de tumeur osseuse maligne ou bénigne peuvent être évoqués. Les anomalies protidiques et médullaires corrigent le diagnostic.

7. Critères pronostiques

La durée médiane de survie globale pour le MM est de 3 à 4 ans. Néanmoins, l'évolution de la maladie est très variable d'un patient à l'autre, avec une survie allant de moins de 6 mois à plus de 10 ans. Cette variabilité est due à l'hétérogénéité de la pathologie, de la biologie des cellules myélomateuses ainsi qu'aux multiples facteurs associés à l'hôte. La connaissance des facteurs pronostiques liés à la tumeur et au patient est indispensable pour prédire l'évolution de la maladie, identifier les patients à risque et optimiser la prise en charge.

7.1. Facteurs pronostiques individuels

Les facteurs affectant le pronostic du MM sont liés à l'hôte (un âge élevé et un indice de performance supérieur à 2 sont de mauvais pronostic) et à la maladie elle-même (masse tumorale, propriétés intrinsèques des cellules myélomateuses).

▪ Importance de la masse tumorale

Une calcémie élevée, des lésions osseuses lytiques étendues, une plasmocytose médullaire importante sont corrélés avec un mauvais pronostic.

La β_2m sérique, paramètre facilement disponible et reproductible, s'est révélée être, depuis son introduction il y a 25 ans, un important facteur pronostique au diagnostic de la maladie. La β_2m est exprimée à la surface des plasmocytes malins et est relarguée dans le sérum par clivage protéolytique. Ainsi, plus la masse tumorale augmente, plus le taux de β_2m sérique est élevé.

Enfin, beaucoup plus récemment, il a été montré que le dosage des CLL sériques avait une valeur pronostique majeure dans quasiment toutes les pathologies plasmocytaires, dont la MGUS, le SMM et le MM (Snozek et al, 2008).

En outre, la mise en évidence d'anomalies moléculaires comme les mutations de *ras* est associée à une forte masse tumorale et constitue un facteur pronostique péjoratif.

▪ Malignité intrinsèque

Une CRP élevée (reflet de l'IL-6 endogène), une albuminémie basse ou des LDH élevées sont associées à un mauvais pronostic dans le MM.

Le type d'Ig monoclonale a également un impact sur l'évolution de la maladie. Il semblerait que certains sous-types de MM soient de plus mauvais pronostic : MM à IgD, IgA ou à chaînes légères (λ plutôt que κ).

En ce qui concerne la morphologie des cellules myélomateuses, aucune valeur pronostique n'a pu être attribuée aux modifications cytoplasmiques (*Gardais et al, 2001*) (cf paragraphe 5.4.3.). En revanche, plusieurs études ont montré que les modifications nucléaires observées au myélogramme (anisocytose avec noyau de grande taille, présence de nucléole, chromatine immature) (cf paragraphe 5.4.3.) sont liées au pronostic de la maladie (*Goasgen et al, 1999 ; Greipp et al, 1998 ; Leleu et al, 2005*).

Sur le plan cytogénétique, la ploïdie a un impact significatif sur le pronostic : l'hyperdiploïdie est favorable et à l'inverse l'hypodiploïdie est un facteur défavorable (*Fonseca et al, 2004*). L'impact pronostique des translocations IgH (locus 14q32) sur la survie est discuté et hétérogène. Les translocations t(4;14) et t(14;16) sont associées avec un mauvais pronostic alors que t(11;14) serait corrélée à une meilleure survie (*Fonseca et al., 2004*). Les trois anomalies cytogénétiques couramment recherchées dans le MM, del13, t(4;14) et del17p, sont des éléments de mauvais pronostic (*Avet-Loiseau et al, 2007 ; Fonseca et al, 2004*).

La chimiosensibilité de la tumeur constitue également un indicateur pronostique.

Ainsi, depuis les années 1960, de nombreuses études ont identifié divers paramètres cliniques et biologiques qui prédisent de façon indépendante la durée de survie dans le MM. Le dosage de la β_2m sérique est sans doute l'un des paramètres pronostiques les plus importants dans le MM. Néanmoins, il ne reflète pas l'ensemble des caractéristiques de la maladie, mais essentiellement la masse tumorale et les répercussions rénales.

Des combinaisons des différents facteurs pronostiques ont été suggérées, afin d'établir des systèmes simples et reproductibles permettant de classer les patients atteints de MM en fonction de leur pronostic.

7.2. Classifications pronostiques

7.2.1. Classification de Durie et Salmon

La classification de Durie et Salmon a été développée il y a plus de 30 ans comme moyen fiable, simple et pratique d'apprécier la masse tumorale dans le MM (Durie & Salmon, 1975). Elle est basée sur des critères cliniques (évaluation radiologique des lésions osseuses) et des paramètres biologiques courants (taux sérique ou urinaire de la protéine M, valeurs de l'hémoglobine et de la calcémie, créatininémie). Les patients sont ainsi classés en trois catégories selon l'importance de la masse tumorale, et la fonction rénale définit des sous-groupes à faible ou haut risque (Tableau III).

Tableau III : Classification de Durie et Salmon (d'après Durie & Salmon, 1975).

Ig, immunoglobuline ; PBJ, protéinurie de Bence Jones.

	<u>Stade I</u>	<u>Stade II</u>	<u>Stade III</u>
Masse tumorale	faible	intermédiaire	forte
<i>Critères requis</i>	<i>tous</i>	<i>ni I ni III</i>	<i>au moins un</i>
<u>Protéine M</u>			
sérique	IgG < 50 g/L IgA < 30 g/L		IgG > 70 g/L IgA > 50 g/L
urinaire	PBJ < 4 g/24 h		PBJ > 12 g/24 h
<u>Hémoglobine</u>	> 10 g/dL		< 8,5 g/dL
<u>Calcémie</u>	< 3 mmol/L (120 mg/L)		> 3 mmol/L (120 mg/L)
<u>Lésions osseuses</u>	≤ 1		> 3
<u>Sous-classification</u>			
- A définit une fonction rénale préservée (créatininémie < 175 µmol/L soit 20 mg/L)			
- B définit une insuffisance rénale (créatininémie ≥ 175 µmol/L soit 20 mg/L)			

Cette classification a été largement adoptée comme système de classification standard du MM. Cependant, elle présente plusieurs points faibles. Elle pêche notamment par une détermination souvent imprécise et subjective des lésions osseuses. De plus, sa valeur pronostique est finalement inférieure à celle de la β_2m et des anomalies cytogénétiques. Elle n'est plus utilisée à ce jour que lorsque l'on se rapporte aux séries « historiques » publiées dans la littérature.

7.2.2. International Staging System

Récemment, un nouvel indice pronostique international a été établi. Il s'agit de l'ISS (*International Staging System*), basé sur la combinaison de deux paramètres biologiques prédictifs de la durée de survie, facilement disponibles et évaluables de façon simple et reproductible : la β_2 m sérique et l'albuminémie. Il en résulte une classification en trois stades (Greipp et al, 2005) (Tableau IV).

Tableau IV : International Staging System (ISS) (d'après Greipp et al, 2005).

β_2 m, β_2 -microglobuline.

<u>Stade</u>	I	II	III
<u>Critères</u>	β_2 m sérique < 3,5 mg/L et albuminémie > 35 g/L	ni I ni III	β_2 m sérique > 5,5 mg/L
<u>Durée de survie médiane</u>	62 mois	44 mois	29 mois

Cette nouvelle classification a été validée et son utilisation est aujourd'hui recommandée pour l'évaluation du pronostic dans le MM, selon les critères de consensus internationaux (Greipp et al, 2005 ; Kyle & Rajkumar, 2009).

Néanmoins, plusieurs inconvénients limitent son utilisation. En effet, l'ISS n'intègre pas la cytogénétique et n'a pas été validé dans le contexte des nouvelles thérapeutiques. Notons aussi que le stade ISS III est un groupe hétérogène de patients qui n'ont en commun que l'élévation de la β_2 m sérique, ce qui peut être lié une masse tumorale importante comme à une insuffisance rénale.

7.2.3. Classifications morphologiques

Plusieurs classifications basées sur les caractéristiques morphologiques ont été rapportées dans les années 1990 (Goasguen et al, 1999 ; Greipp et al, 1998). Elles identifient des sous-groupes de MM en fonction du degré de maturation des cellules plasmocytaires, comme nous l'avons expliqué précédemment (cf paragraphe 5.4.3.), et les relient à la durée de survie.

Le sous-groupe plasmoblastique (défini par la présence d'au moins 2% de plasmoblastes) est de plus mauvais pronostic, avec la survie la plus courte (*Goasguen et al, 1999 ; Greipp et al, 1998*). La morphologie plasmoblastique est en effet associée à une maladie plus avancée et plus agressive. En outre, les particularités morphologiques des cellules myélomateuses pourraient refléter la présence d'anomalies cytogénétiques critiques dans le MM, comme certaines faisant intervenir le locus IgH (*Garand et al, 2003*).

Cependant, malgré de nombreuses publications sur la valeur pronostique de la morphologie plasmoblastique, la définition de cette entité reste subjective, sa reproductibilité faible et sa signification assez mal établie. Les classifications morphologiques proposées ne permettent l'identification que d'une petite proportion de patients de mauvais pronostic. Leur mise en œuvre en pratique est restée très limitée, et aujourd'hui elles ne sont plus utilisées.

7.2.4. Classifications cytogénétiques et moléculaires

Bien que l'application pratique de la cytogénétique soit handicapée par un manque de standardisation des techniques, des coûts élevés et une disponibilité restreinte aux centres de référence dans le cadre de protocoles de recherche, de plus en plus de données sont disponibles dans ce domaine et ont été très étudiées au cours de ces dernières années. Elles ont permis de différencier plusieurs sous-groupes pronostiques de MM.

Une première classification génétique, basée sur la ploïdie, identifie grossièrement une catégorie de patients avec un pronostic favorable (hyperdiploïdes) et une catégorie de patients avec un pronostic défavorable (non hyperdiploïdes) (*Fonseca et al, 2004 ; Wuilleme et al, 2005*).

Barille-Nion et al ont proposé une classification moléculaire du MM, appelée « TC » car basée sur les Translocations IgH et l'expression de Cycline D (*Barille-Nion et al, 2003*). Cette classification identifie cinq groupes moléculaires de MM, avec des implications pronostiques et thérapeutiques importantes. Elle reste cependant à valider par d'autres études.

Sur la base de ces données, les groupes d'étude du MM comme l'IMWG cherchent à développer un système de classification plus raffiné que l'ISS pour identifier les patients à « haut risque » parmi ceux ayant un mauvais pronostic. En fait, l'introduction de la cytogénétique permettrait d'améliorer la prédiction de la survie dans chaque catégorie de l'ISS (*Avet-Loiseau et al, 2007*).

8. Prise en charge thérapeutique

Nous ne développerons pas ici les traitements des complications associées au MM (radiothérapie locale, traitement des complications osseuses, de l'hypercalcémie, de l'insuffisance rénale, des complications infectieuses, de l'anémie ou encore de la douleur...) pour nous intéresser uniquement au traitement anti-tumoral proprement dit, qui a considérablement évolué ces dernières années.

8.1. *Traitement anti-tumoral*

8.1.1. Indications

Il est admis qu'il n'y a pas d'indication à instituer une chimiothérapie anti-tumorale chez les patients asymptomatiques à faible masse tumorale : ce sont les MM indolents (stade I de la classification de Durie et Salmon), qui peuvent rester stables plusieurs années. En pratique donc, seuls les patients présentant un myélome évolutif (présence de lésions osseuses, insuffisance rénale, anémie, hypercalcémie...) bénéficient d'un traitement anti-tumoral.

Notons bien que le stade ISS ne change rien à la décision thérapeutique.

8.1.2. Thérapeutiques disponibles

▪ **Alkylant et corticoïdes**

Le traitement de référence du MM tout âge confondu est resté, pendant de nombreuses années, l'association d'un alkylant (melphalan, Alkeran® ou cyclophosphamide, Endoxan®) et de glucocorticoïdes (prednisone, dexaméthasone), dite « Alexanian ». Cette association permet d'espérer une survie médiane de l'ordre de 3 ans (*Kyle et al, 2003*).

▪ **Intensification-autogreffe**

Jusqu'à la fin des années 1990, il n'y a eu aucun progrès significatif dans le traitement du MM, avant l'avènement de l'intensification suivie de l'autogreffe de CSH (principe de l'intensité-dose) (*Harousseau et al, 2004*). Il s'agit d'une réduction de la masse tumorale par une chimiothérapie d'induction (« VAD », vincristine, adriamycine, dexaméthasone) puis une intensification thérapeutique (conditionnement myéloablatif) par de fortes doses de melphalan (200 mg/m² en intra-veineuse en une fois) suivie de la greffe de CSH autologues prélevées au préalable. Cette modalité thérapeutique a permis d'améliorer

significativement le taux de rémission complète et la médiane de survie (supérieure à 50 mois). Cependant, l'analyse des courbes de survie sans rechute montre qu'il n'apparaît pas de plateau pouvant suggérer la guérison d'une partie des patients.

▪ **Allogreffe**

L'allogreffe de CSH a été proposée comme traitement du MM. Cette approche est séduisante car il existerait un effet « greffon contre myélome ». Mais cette procédure nécessite l'obtention d'une rémission et est grevée d'une morbidité et d'une mortalité importante. La diminution de l'intensité du conditionnement par des « mini-allogreffes » pourrait diminuer la morbidité et participer à l'allongement de l'espérance de vie des patients (*Barille-Nion et al, 2003 ; Harousseau et al, 2004 ; Hulin, 2007*).

▪ **« Nouvelles » molécules**

Depuis une dizaine d'années, le paysage thérapeutique s'est enrichi de 3 nouveaux principes actifs, appartenant à deux nouvelles classes médicamenteuses avec de nouveaux mécanismes d'action, qui ont bouleversé la prise en charge thérapeutiques du MM (*Hulin, 2007*).

- La thalidomide fait partie de la classe des immunomodulateurs. C'est la mise en évidence d'une activité anti-angiogénique qui constitue le rationnel de son utilisation dans le traitement du MM, mais la thalidomide agit selon des mécanismes divers. Les effets toxiques principaux sont la neuropathie périphérique (toxicité cumulative) et les thromboses veineuses.

- Le lénalidomide (Revlimid®) est un analogue structural de la thalidomide avec un profil de toxicité différent : sa toxicité principale est hématologique et il n'est pas responsable d'effets secondaires neurologiques.

- Le bortézomib (Velcade®) est le premier inhibiteur du protéasome. Il réduit la prolifération ainsi que la survie des cellules malignes en bloquant leur progression dans le cycle cellulaire et en restaurant l'apoptose (Figure 25). L'activité « anti-myélome » est aussi médiée par l'inhibition de la production d'IL-6 par les cellules stromales médullaires (Figure 25). Les effets toxiques majeurs sont la fatigue et la neuropathie périphérique.

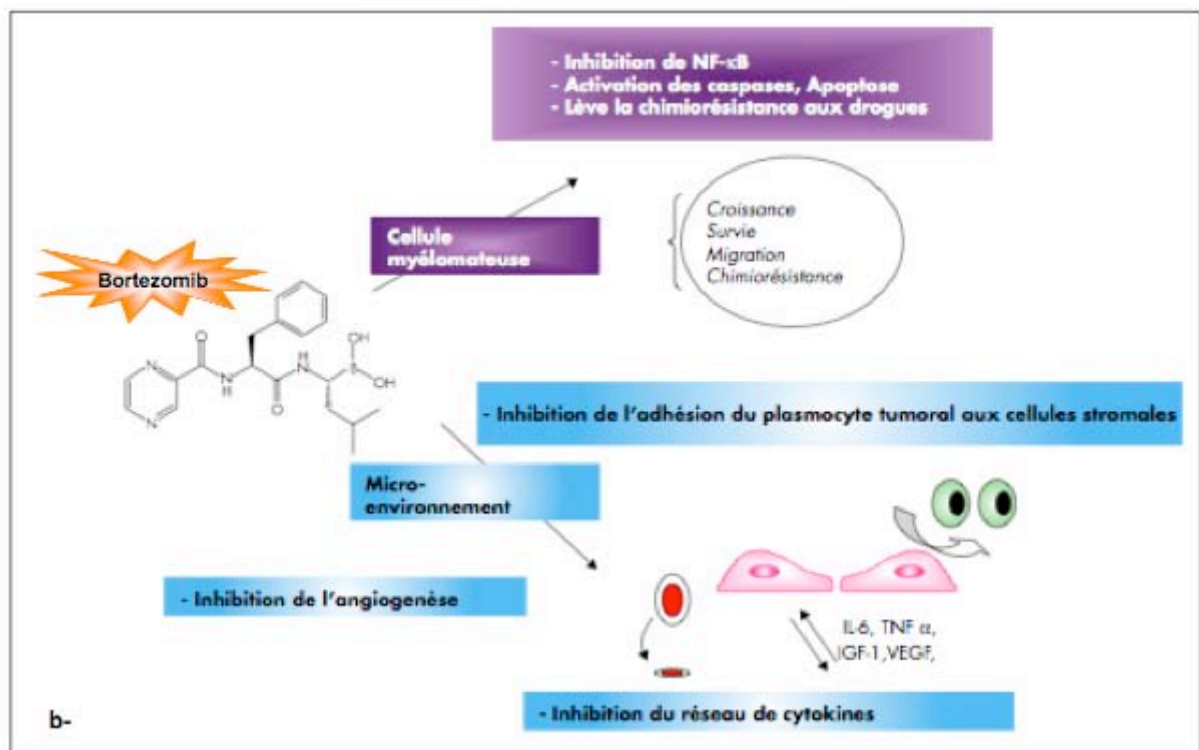
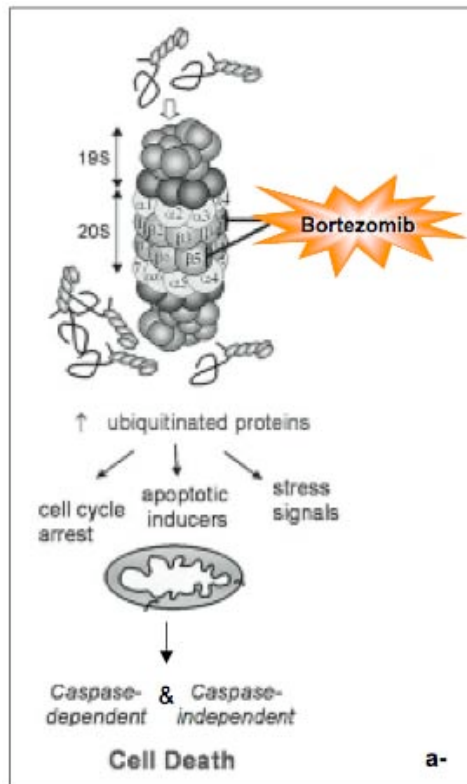


Figure 25 : Mécanismes d'action du bortézomib dans le myélome multiple.

a- Inhibition de la voie du protéasome par le bortézomib (d'après *Fernandez et al, 2006*). b- L'inhibition de la voie du protéasome par le bortézomib induit un effet à la fois sur la cellule tumorale et sur le micro-environnement (d'après *Pasquier et al, 2006*).

IGF-1, *insulin growth factor-1* ; IL, *interleukine* ; NF- κ B, *nuclear factor-kappa B* ; TNF, *tumor necrosis factor* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

Ces nouveaux médicaments ont des toxicités bien identifiées et une tolérance acceptable. Ils peuvent être utilisés successivement ou en association en vue d'une meilleure efficacité (synergie d'action notamment avec les agents alkylants et les glucocorticoïdes). Ils ont montré une grande efficacité dans le traitement du MM, d'abord en situation de rechute mais aussi en première ligne, avec un impact sur le devenir de la maladie elle-même (*Hulin, 2007*). Thalidomide, lenalidomide et bortézomib sont maintenant inclus dans les schémas thérapeutiques de référence.

8.1.3. Schémas thérapeutiques

▪ **Patients de moins de 65 ans : traitement intensif**

Chez les patients « jeunes » et sans co-morbidité(s) grave(s), le schéma thérapeutique de référence correspond à la séquence suivante :

- réduction de la masse tumorale par une chimiothérapie d'induction qui a bénéficié de l'introduction des nouvelles molécules thalidomide, bortézomib et lenalidomide,
- intensification (melphalan à forte dose éventuellement associé au bortézomib) et autogreffe de CSH,
- éventuellement consolidation/entretien (thalidomide ou lenalidomide à petites doses, en cours d'évaluation) (*Hulin, 2007*).

Ce schéma a permis d'allonger la survie médiane aux alentours de 7 à 8 ans, avec un taux de rémission complète entre 30 et 50% (*Davies et al, 2002*).

▪ **Patients de plus de 65 ans : traitement standard**

Chez les sujets « âgés », le traitement standard « MP » (melphalan et prednisone) permettait d'espérer une médiane de survie d'environ 30 mois (*Kyle et al, 2003*). Le pronostic de ces patients a été transformé par l'apparition des nouvelles molécules. En 2008, l'association de référence est melphalan, dexaméthasone et thalidomide.

Notons que la limite d'âge au-delà de laquelle les patients ne relèvent plus du traitement intensif mais du traitement standard varie selon les équipes. Elle est souvent fixée à 65 ans, mais certains estiment que l'autogreffe doit être discutée chez des patients jusqu'à 75 ans voire au-delà.

Il existe une très grande hétérogénéité inter-patient : certains survivent plus de 10 ans, mais à l'opposé il n'est pas rare de rencontrer des patients présentant une maladie réfractaire aux différentes thérapeutiques aujourd'hui disponibles.

8.1.4. Perspectives thérapeutiques

Malgré les progrès thérapeutiques de ces dernières années, le MM reste à ce jour une pathologie incurable, et l'échappement thérapeutique est inéluctable. Afin de surmonter la résistance aux thérapeutiques existantes et améliorer l'évolution des patients, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en développement. Ces nouvelles thérapies ciblent des voies moléculaires impliquées dans la régulation de la prolifération et la survie des cellules myélomateuses. Le rôle des chemokines dans les interactions entre cellules tumorales et micro-environnement médullaire en fait des cibles thérapeutiques de choix (Aggarwal et al, 2006). L'étude de la cytogénétique du MM, avec les profils d'expression génique (techniques des micropuces à ADN), permet d'envisager des thérapies ciblées et individuelles (Barille-Nion et al, 2003 ; Fonseca et al, 2004 ; Harousseau et al, 2004).

8.2. Critères de réponse

Le traitement optimal du MM est évolutif, en fonction d'essais thérapeutiques qui se succèdent actuellement rapidement. Pour pouvoir comparer l'efficacité des nouvelles stratégies thérapeutiques dans les essais cliniques, il est indispensable de disposer de critères de réponse validés et reproductibles. C'est aussi un besoin en clinique « de routine » pour évaluer la réponse au traitement directement au niveau individuel du patient. En outre, étant donné l'efficacité des nouveaux agents disponibles, il devient nécessaire d'évaluer la « magnitude » de la réponse obtenue. Enfin, il est important de pouvoir détecter la rechute le plus précocément possible.

Pour répondre à ces attentes, l'IMWG a récemment redéfini les critères d'évaluation de réponse (et de rechute) dans le MM (Durie et al, 2006 ; Kyle & Rajkumar, 2009). Cinq catégories de réponse et trois catégories de rechute sont proposées : réponse complète stricte RCs (*stringent complete response, sCR*), réponse complète RC (*complete response, CR*), très bonne réponse partielle TBRP (*very good partial response, VGPR*), réponse partielle RP (*partial response, PR*) et maladie stable MS (*stable disease, SD*), maladie progressive MP (*progressive disease, PD*), rechute clinique et rechute à partir d'une RC.

Les critères définissant les différentes catégories de réponse, progression et rechute de la maladie sont basés sur les paramètres biologiques classiquement utilisés dans le MM pour le diagnostic et le suivi de la maladie et sont détaillés en annexe (Annexe 2).

Le MM reste une maladie maligne incurable à ce jour, avec un échappement thérapeutique inéluctable et une évolution terminale par infections à répétition, insuffisance rénale, troubles neurologiques ou par insuffisance médullaire.

Néanmoins, l'efficacité des schémas thérapeutiques actuels incluant les nouveaux médicaments est définitivement démontrée et s'accompagne pour les patients non seulement d'un gain en survie sans progression de la maladie mais également d'une amélioration de la survie globale. En outre, l'amélioration de la connaissance de la biologie du MM laisse espérer l'apparition de nouvelles armes thérapeutiques. La définition d'une catégorie de réponse complète stricte et le début de l'évaluation de la maladie résiduelle témoignent de l'objectif de voir prochainement le MM se transformer en une maladie chronique, avant l'arrivée d'un nombre significatif de rémissions très prolongées.

L'immunophénotypage plasmocytaire

1. Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte normal

Les caractéristiques phénotypiques des cellules de la lignée plasmocytaire physiologique sont détaillées dans le tableau V. Il est important de souligner l'hétérogénéité du phénotype des plasmocytes d'un individu à l'autre et chez un même individu.

▪ Marqueurs B

La différenciation plasmocytaire s'accompagne de la diminution puis la perte d'expression de l'Ig à la surface de la membrane cellulaire (elle peut alors être détectée en intra-cytoplasmique), ainsi que la perte d'expression de la structure de transduction du signal du BCR, le complexe CD79a/b. En outre, au fur et à mesure de leur maturation, les cellules plasmocytaires perdent progressivement un certain nombre d'autres marqueurs caractéristiques de la lignée B, comme les CD20, CD21, CD22 et CD23, ainsi que le HLA de classe II (*Jourdan et al, 2009*) (cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 1.2.4., Tableau II).

En revanche, les cellules de la lignée plasmocytaire conservent globalement l'expression de l'antigène **CD19**, néanmoins plus faible que celle des cellules B (*Mateo et al, 2005 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994*). Notons aussi qu'une sous-population de cellules plasmocytaires peut ne pas exprimer ce marqueur (*Bataille et al, 2006*). *Jego et al* ont en effet caractérisé des cellules plasmocytaires très proliférantes (plasmoblastes), au phénotype immature CD19- (*Jego et al, 1999*). L'antigène **CD27**, marqueur des lymphocytes B mémoires, est exprimé par les cellules plasmocytaires, quel que soit leur stade de maturation. **CD81**, glycoprotéine transmembranaire intervenant dans la signalisation intracellulaire des cellules B, persiste également à la surface des plasmocytes (elle médie des interactions homotypiques entre cellules et limite la croissance cellulaire). Enfin, si les plasmoblastes sont **CD40+**, l'expression de cet antigène est perdue par les cellules plasmocytaires matures (*Jego et al, 1999 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994*).

▪ Marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire

Les deux marqueurs phénotypiques caractéristiques de la lignée plasmocytaire sont CD38 et CD138 (Feuillard & Raphael, 2000 ; Medina et al, 2002).

L'antigène **CD38** est une glycoprotéine transmembranaire présentant les fonctions pléiotropiques d'une ectoenzyme, avec comme substrat le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) ou l'ADP (adénosine diphosphate) ribose cyclique. Elle pourrait aussi fonctionner comme un récepteur (dont les ligands, outre CD31, ne sont encore pas bien connus), médier l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire (Rawstron et al, 1999) et intervenir dans les voies d'activation cellulaire. Notons que CD38 ne constitue pas un marqueur spécifique de la lignée plasmocytaire ; il est notamment exprimé de façon ponctuelle au cours de la différenciation B (lymphocytes pro-B et cellules centro-germinatives) (Tableau II).

L'antigène **CD138** (*syndecan-1*) est un protéoglycane de la famille des héparanes sulfates. Dans les cellules hématopoïétiques humaines, son expression est restreinte aux plasmocytes ; les cellules épithéliales, mésenchymateuses et carcinomateuses l'expriment également. Le *syndecan-1* possède un long domaine extra-cellulaire qui se lie à des molécules solubles (facteurs de croissance) et insolubles de la matrice extra-cellulaire ou du cytosquelette (collagène, fibronectine). Il intervient ainsi dans l'activité des facteurs de croissance, la mobilité cellulaire et le contrôle de la morphologie des cellules. Les études de la différenciation plasmocytaire montrent que CD138 peut aussi être considéré comme un antigène de différenciation. En effet, son expression apparaît après le stade de plasmoblaste : les plasmoblastes CD138⁻ se différencient en précurseurs plasmocytaires CD138⁺ gardant une certaine capacité de prolifération, avant la maturation finale en plasmocytes CD138⁺⁺⁺, qui ne se divisent plus (Jego et al, 1999 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994).

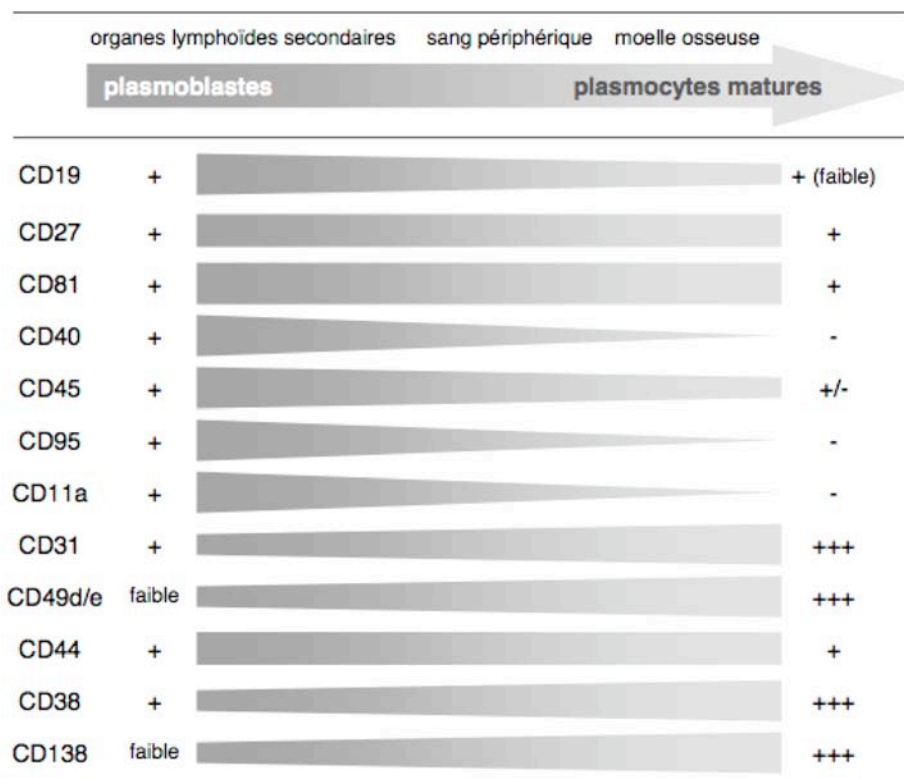
▪ Autres marqueurs phénotypiques

L'antigène **CD45** est une tyrosine phosphatase largement exprimée par les cellules hématopoïétiques. Les plasmocytes des ganglions et du sang périphérique, hautement proliférants, présentent un phénotype homogène CD45 fort (Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004 ; Robillard et al, 2005a). Au contraire, la population plasmocytaire médullaire est globalement CD45⁺ mais présente une relative hétérogénéité : si les plasmoblastes constituent une sous-population immature proliférante CD45 fort (Jego et al, 1999 ; Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004 ; Robillard et al, 2005a), il a été montré que l'expression de CD45 diminue au cours de la différenciation des cellules plasmocytaires, parallèlement à la maturation et à l'arrêt de la prolifération cellulaire (Bataille et al, 2006).

Le **CD221**, récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) est détecté (mais à faible niveau) dans un peu moins de la moitié des plasmocytes médullaires, mais pas dans ceux des ganglions (*Bataille et al, 2005*). Cette observation suggère que CD221 pourrait être spécifiquement surexprimé lors du *homing* des plasmocytes dans le micro-environnement médullaire.

Enfin, rappelons les évolutions phénotypiques de la différenciation plasmocytaire que nous avons évoquées précédemment (*cf -I- La lignée plasmocytaire physiologique, 3.1.*), à savoir l'acquisition d'un phénotype non apoptotique avec la perte de l'antigène **CD95** dans les cellules plasmocytaire matures, et la modification du profil d'expression des molécules d'adhésion avec la perte de **CD11a** et l'augmentation de l'expression de **CD31**, **CD49d** et **CD49e** (VLA-4 et VLA-5) au cours de la migration des organes lymphoïdes secondaires jusqu'à la moelle osseuse (*Medina et al, 2002 ; Pellat-Deceunynck et al, 1995*). Notons en revanche que la molécule d'adhésion **CD44**, liant des molécules de la matrice extra-cellulaire et du cytosquelette, présente un niveau d'expression constant sur les cellules plasmocytaires, quel que soit leur stade de maturation (*Pellat-Deceunynck et al, 1995*).

Tableau V : Evolution phénotypique au cours de la différenciation plasmocytaire (d'après *Bataille et al, 2006 ; Jego et al, 1999 ; Jourdan et al, 2009 ; Medina et al, 2002 ; Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004*).



2. Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte myélomateux

Le plasmocyte malin est une cellule complexe avec une diversité morphologique, cytogénétique, mais aussi phénotypique. Les caractéristiques phénotypiques des cellules myélomateuses sont décrites ci-dessous ; les principales d'entre elles sont illustrées dans le tableau VII à la fin de cette partie.

- Comme les plasmocytes normaux, les cellules myélomateuses sont positives pour les **marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire**, CD38 et CD138 (*Lin et al, 2004*).

Le protéoglycane **CD138** (*syndecan-1*), typiquement exprimé par les plasmocytes, est un marqueur spécifique de la lignée plasmocytaire physiologique (*cf paragraphe 1.*) et aussi myélomateuse (*Bataille et al, 2006*). Comme nous l'avons déjà évoqué, il tient un rôle comme molécule d'adhésion à la matrice extra-cellulaire et comme co-récepteur pour de nombreux facteurs de croissance des cellules myélomateuses (dont l'IL-6).

Une forte expression de l'antigène **CD38** a longtemps été considérée comme caractéristique des plasmocytes. Néanmoins, rappelons que cet antigène est également exprimé par certaines cellules B (*cf paragraphe 1.*) et T. En outre, les plasmocytes myélomateux affichent un niveau d'expression de CD38 plus faible que celui des plasmocytes normaux (*Almeida et al, 1999 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Rawston et al, 1999 ; San Miguel et al, 2006*).

- Nous avons vu précédemment que les cellules myélomateuses expriment à leur surface diverses **molécules d'adhésion** (*cf I- Le myélome multiple, 3.3.1.*).

La plupart d'entre elles sont également présentes sur les plasmocytes normaux, comme les intégrines **CD11a/CD18** (LFA-1), **CD49d/CD29** (VLA-4) et **CD49e/CD29** (VLA-5), ou les protéoglycanes **CD138** et **CD44** (*Pellat-Deceunynck et al, 1995*). L'expression de CD11a dans le MM serait corrélée avec la croissance tumorale. D'ailleurs, il semble que cette molécule soit impliquée dans des interactions entre les cellules myélomateuses et le micro-environnement médullaire, ses ligands (CD54, ICAM-1 ; CD102, ICAM-2 ; CD50, ICAM-3) étant exprimés par les cellules myélomateuses comme par les cellules stromales (*Perez-Andres et al, 2009*).

Cependant, les plasmocytes tumoraux expriment également certaines molécules d'adhésion que n'expriment pas (ou faiblement) les plasmocytes normaux. C'est le cas de deux molécules de la superfamille des Ig, **CD56** et **CD58** (LFA-3) (*Pellat-Deceunynck et al, 1995*). CD56 (NCAM) est une molécule d'adhésion exprimée typiquement par les cellules NK, et rapportée pour la première fois en 1990 par Van Camp *et al.* comme étant fréquemment trouvée sur les cellules myélomateuses (*Van*

Camp et al, 1990). Elle est en effet exprimée à la surface des plasmocytes dans 60 à 70% des cas de MM (*Almeida et al, 1999 ; Bataille et al, 2006 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Perez-Andres et al, 2005 ; Robillard et al, 1998 ; San Miguel et al, 2006*) et sa surexpression caractérise la malignité (*Pellat-Deceunynck et al, 1995*). CD56 est impliquée dans l'adhésion au micro-environnement médullaire et les contacts entre cellules myélomateuses et ostéoblastes (*Pellat-Deceunynck et al, 1995*).

- Au contraire des plasmocytes normaux, les cellules myélomateuses ont une expression du **marqueur pan-leucocytaire CD45** globalement très faible ou négative (*Lin et al, 2004 ; Robillard et al, 2005a*). Cependant, comme pour les cellules de la lignée plasmocytaire physiologique, l'expression de cet antigène est hétérogène (*Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004 ; Robillard et al, 2005a*) : les cellules myélomateuses sont un mélange d'un tout petit (environ 20%) compartiment CD45 fort et d'un compartiment beaucoup plus important (environ 80%) CD45 faible/négatif. Le compartiment mineur CD45 fort est le compartiment proliférant (*Bataille et al, 2006 ; Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004 ; Robillard et al, 2005a*). En effet, CD45 est une tyrosine phosphatase nécessaire pour l'activation et le développement lymphocytaire. Elle participe à la transduction du signal IL-6 via une activation indirecte des Src kinases (*Pellat-Deceunynck & Bataille, 2004*). D'ailleurs Robillard et al ont montré que l'IL-6 stimulait préférentiellement les cellules myélomateuses CD45 fort (*Robillard et al, 2005a*). Retenons que CD45 représente un régulateur essentiel de la croissance et de la survie des cellules myélomateuses.

- Une minorité de patients atteints de MM (moins de 15%) conservent l'expression de **marqueurs associés à la lignée B** comme CD19, CD20 ou CD22 (*Ocqueteau et al, 1998 ; San Miguel et al, 2006*). La perte de **CD19** est extrêmement fréquente, cet antigène étant exprimé dans moins de 5% des MM (*Bataille et al, 2006 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Robillard et al, 1998*). L'expression de **CD20** est plus courante que celle de CD19, dans environ 20% des cas (*Bataille et al, 2006 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Robillard et al, 2003*). Notons que les cellules myélomateuses CD20+ n'expriment ni le CD19, ni le CD22. En outre, la plupart des MM CD19+ ou CD20+ co-expriment le marqueur CD27 au diagnostic (*Bataille et al, 2006*).

CD27 est une molécule essentielle dans la différenciation plasmocytaire, exprimée par les plasmocytes normaux et réactionnels (*Moreau et al, 2005*). Dans le MM, la perte de cet antigène est

fréquente et les plasmocytes malins ne présentent un phénotype CD27+ que dans 50 à 60% des cas (Bataille et al, 2006 ; Moreau et al, 2005).

- Les cellules myélomateuses peuvent également exprimer certaines **molécules impliquées dans la co-stimulation des lymphocytes B et T** comme **CD40** (dans environ deux tiers des cas de MM) (Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; San Miguel et al, 2006). **CD28**, marqueur lymphocytaire T jouant un rôle essentiel dans les interactions B-T, est trouvé dans 15 à 45% des MM (Almeida et al, 1999 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Rawstron et al, 2008 ; Robillard et al, 1998 ; San Miguel et al, 2006). **CD80** et **CD86**, ligands de CD28, peuvent également être exprimés par les cellules myélomateuses (Ocqueteau et al, 1998 ; Perez-Andres et al, 2005 ; Robillard et al, 1998).
- Nous avons précédemment évoqué l'importance du rôle de l'IL-6 et de l'IGF-1 dans la pathogénèse du MM (cf -I- Le myélome multiple, 3.3.2.).

La glycoprotéine transmembranaire **CD126**, chaîne α du **récepteur à l'IL-6** (liant l'IL-6), est exprimée par les plasmocytes tumoraux quel que soit le stade de la maladie, alors qu'elle est indétectable sur les plasmocytes normaux (Barille et al, 1999 ; Perez-Andres et al, 2005). Quant à l'expression de **CD130**, chaîne β du récepteur (partie transduisant le signal), Perez-Andres et al n'ont pas mis en évidence de différence significative entre plasmocytes normaux et malins (Perez-Andres et al, 2005). Pourtant, dans un travail publié antérieurement, Barille et al avaient montré une surexpression de cet antigène liée à l'expansion tumorale (Barille et al, 1999).

CD221, récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) est trouvé sur les cellules myélomateuses dans environ trois quarts des cas de MM, alors qu'il n'est pas (ou faiblement) exprimé en situation physiologique ou réactionnelle (Bataille et al, 2005 ; Bataille et al, 2006).

- D'autres antigènes sont exprimés de façon aberrante par les cellules myélomateuses.

La molécule **CD33**, marqueur de la lignée **myélo-monocytaire**, est trouvée à la surface des plasmocytes malins dans environ 20% des cas de MM (Leleu, 2006 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Robillard et al, 2005b ; Sahara et al, 2006 ; San Miguel et al, 2006).

L'antigène **CD117** (*c-kit*), associé aux cellules souches (récepteur à activité tyrosine kinase pour des facteurs de croissance hématopoïétiques), est présent sur les cellules myélomateuses d'environ un tiers des patients (Almeida et al, 1999 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; San Miguel et al, 2006), alors qu'il n'est jamais exprimé par les plasmocytes normaux (Bataille et al, 2008).

CD52 (*campath-1*), physiologiquement fortement exprimé par les lymphocytes et les monocytes, est trouvé à la surface des plasmocytes dans une petite proportion (environ 14%) de cas de MM (*Lin et al, 2004*).

Cette revue de la littérature témoigne bien du fait que des immunophénotypes aberrants sont observés dans la grande majorité des MM. Cela inclut la perte et/ou la surexpression de certains marqueurs présents sur les plasmocytes normaux, ainsi que l'expression aberrante d'antigènes non spécifiques de lignée. Ces aberrations phénotypiques sont présentes sur les cellules myélomateuses dès le diagnostic, ou apparaissant avec l'évolution de la maladie.

3. Place de l'immunophénotypage plasmocytaire dans la prise en charge des pathologies du plasmocyte

Actuellement, l'immunophénotypage par CMF est d'un intérêt scientifiquement reconnu pour le diagnostic et le suivi de nombreuses hémopathies, notamment les leucémies aiguës et les syndromes lymphoprolifératifs. En revanche, pour le MM, l'utilisation de la CMF est beaucoup moins courante, encore principalement restreinte aux études de recherche clinique. Néanmoins, comme nous venons de le voir (*cf paragraphes 1. et 2.*), des travaux relativement récents ont montré d'une part la présence de marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire, permettant d'identifier ces cellules parmi les autres cellules hématopoïétiques analysées, et d'autre part l'expression de marqueurs « aberrants » (antigènes normalement non exprimés par cette lignée et antigènes exprimés par cette lignée mais avec un niveau d'expression différent), permettant de différencier phénotypiquement les cellules plasmocytaires malignes de celles physiologiques (*Tableau VII*). Il est ainsi possible d'identifier, caractériser et quantifier les cellules myélomateuses (*Bataille et al, 2006 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Perez-Andres et al, 2005 ; San Miguel et al, 2006*).

Dans un rapport publié assez récemment, l'EMN (*European Myeloma Network*) développe l'ensemble des indications validées à ce jour de l'immunophénotypage plasmocytaire, dans la pathologie du plasmocyte au sens large (*Rawstron et al, 2008*), et plus récemment encore, deux revues synthétisent l'état actuel des connaissances sur ce sujet (*Paiva et al, 2010 ; Raja et al, 2010*). C'est ce que nous allons développer dans les chapitres suivants.

3.1. Intérêt diagnostique

Si, dans la majorité des cas, le MM a une présentation cliniquement bruyante et biologiquement caractéristique, le caractère malin de la plasmocytose peut être difficile à établir du fait de l'existence de « formes frontières » (*cf -I- Le myélome multiple, 6.2.*). L'immunophénotypage plasmocytaire par CMF trouve tout son intérêt dans le diagnostic différentiel du MM (PR, MGUS...), sur la base des informations qu'il est capable de fournir, à savoir l'identification des cellules plasmocytaires, la discrimination entre plasmocytes malins et plasmocytes normaux, la quantification des cellules malignes et leur caractérisation phénotypique (*Rawstron et al, 2008*).

▪ Quantification de la plasmocytose médullaire

La quantification exacte des cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse fait partie intégrante des critères diagnostiques des pathologies de la lignée plasmocytaire (*cf -I- Le myélome multiple, 6.1. ; Annexe 1*). Pourtant, la variabilité de la répartition de l'infiltrat plasmocytaire et l'hétérogénéité de la qualité du prélèvement médullaire (hémodilution) affectent la précision de l'appréciation de la plasmocytose. Bien que la CMF fournisse globalement un résultat plus faible que l'évaluation morphologique (principalement du fait d'une hémodilution du prélèvement médullaire), elle représente un outil permettant de déterminer de façon précise et objective le pourcentage de plasmocytes par rapport aux leucocytes totaux présents dans l'échantillon (*Paiva et al, 2009 ; Rawstron et al, 2008*). D'ailleurs, la quantification des plasmocytes par CMF est tout à fait corrélée avec le degré d'infiltration médullaire (*Rawstron et al, 1999*).

▪ Mise en évidence d'une population phénotypiquement anormale, monoclonale et non réactionnelle

La coexistence d'un phénotype plasmocytaire aberrant qualitatif et quantitatif (par rapport aux caractéristiques phénotypiques du compartiment plasmocytaire physiologique, *cf paragraphe 1.*) et d'une Ig monoclonale permet de distinguer des situations réactionnelles et malignes (*Morice et al, 2007 ; Rawstron et al, 2008 ; San Miguel et al, 2002*) (Tableau VI).

Tableau VI : Caractéristiques (phénotype, clonalité et cinétique) des principales proliférations plasmocytaires.

Ig, immunoglobuline ; MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance* (gammopathie monoclonale de signification indéterminée) ; MM, myélome multiple, PR, plasmocytose réactionnelle ; SMM, *smoldering myeloma* (MM asymptomatique ou indolent).

	PR	MGUS	SMM	MM
<u>Phénotype plasmocytaire</u>	normal	anormal et normal	anormal et normal	anormal
<u>Clonalité Ig</u>	polyclonale	monoclonale et normale	monoclonale et normale	monoclonale
<u>Cinétique</u>	transitoire	permanent	permanent	permanent

▪ Diagnostic différentiel

Nous venons de voir que la CMF, sur la base de la détermination du phénotype des cellules plasmocytaires, permet de distinguer des situations réactionnelles et malignes (Tableau VI). Selon le contexte, le profil d'expression de certains marqueurs phénotypiques peut également orienter le diagnostic vers telle ou telle pathologie maligne. L'exemple le plus courant est celui du diagnostic différentiel entre MM et maladie de Waldenström ou, plus rarement, avec d'autres syndromes lymphoprolifératifs B chroniques (Feyler et al, 2008 ; Paiva et al, 2010).

Au contraire, aucune différence phénotypique patente n'a encore été rapportée entre les plasmocytes malins de MGUS, de SMM et ceux de MM. Pour autant, la CMF peut contribuer au diagnostic différentiel entre MGUS (et SMM) et MM par la détermination de la proportion de plasmocytes malins par rapport aux plasmocytes phénotypiquement « normaux » (sur la base de l'expression de CD19 et CD56) (Ocqueteau et al, 1998 ; Perez-Persona et al, 2007). En effet, ces entités sont caractérisées par la coexistence d'une population de plasmocytes malins et d'une population de plasmocytes normaux, ce qui n'est pas le cas du MM où la quasi-totalité des plasmocytes sont des cellules malignes (Tableau VI).

3.2. Intérêt pronostique

Avant de s'intéresser plus en détail à la valeur pronostique de l'expression ou de la perte d'expression de certains marqueurs phénotypiques, notons que d'autres paramètres fournis par l'analyse en CMF constituent également des éléments pronostiques dans la pathologie du plasmocyte.

Le ratio entre plasmocytes malins et plasmocytes phénotypiquement « normaux » permet, comme nous venons de le dire, de différencier MGUS (et SMM) du MM (cf paragraphe 3.1., Tableau VI). Sur le plan pronostique, il a été montré que ce paramètre est aussi prédictif du risque de transformation de ces entités asymptomatiques en MM symptomatique (Ocqueteau et al, 1998 ; Perez-Persona et al, 2007). Cette observation suggère que l'on pourrait se baser sur les données obtenues par CMF pour individualiser la stratégie de suivi des patients atteints de MGUS ou de SMM en fonction du risque individuel de progression.

D'autre part, dans le MM, la quantification de la plasmocytose médullaire par CMF (avec un protocole en CMF quatre couleurs, trois tubes : CD38/CD56/CD19/CD45, CD138/CD28/CD33/CD38 et CD20/CD117/CD138/CD38) (Paiva et al, 2009) ainsi que la détection de plasmocytes circulants par

CMF (basée sur le profil phénotypique CD38+/CD45-) (*Nowakowski et al, 2005*) sont rapportées comme des facteurs pronostiques dans le MM.

La présence ou l'absence de certains antigènes ont été indentifiées comme des éléments pronostiques dans le MM (*Rawstron et al, 2008*). Les données de la littérature publiées sur ce thème sont relativement hétérogènes, et parfois contradictoires. Dans les paragraphes qui suivent, nous allons tenter d'en donner une vue aussi complète et synthétique que possible ; les principales informations sont reprises dans le tableau récapitulatif en fin de partie (Tableau VII).

- La perte d'expression de la tyrosine phosphatase **CD45** et la surexpression de **CD221**, IGF-1R, dans le MM sont associées à la sévérité de la maladie. L'équipe de Bataille *et al* a mis en évidence une survie plus courte des patients présentant ces caractéristiques phénotypiques (*Bataille et al, 2005 ; Bataille et al, 2006 ; Moreau et al, 2004*). Ces deux situations favorisent en effet le signal IGF-1 (CD45 est un régulateur négatif de ce signal) qui participe à la croissance des cellules myélomateuses. Les auteurs et d'autres équipes ont également montré l'existence d'une association entre la perte d'expression de CD45, la surexpression de CD221 et la présence d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic dans le MM, notamment t(4;14) (*Bataille et al, 2006 ; Fonseca et al, 2004 ; Moreau et al, 2004*).

Néanmoins, dans une large série publiée récemment, Mateo *et al* n'ont mis en évidence aucune influence pronostique de l'expression de CD45 (*Mateo et al, 2008*).

- De la même façon, la perte de l'antigène **CD27** est corrélée à l'expression de CD221 et t(4;14), et constitue une caractéristique des MM agressifs, donc un marqueur de mauvais pronostic (*Bataille et al, 2006 ; Moreau et al, 2005*). L'équipe de Bataille *et al* suggère que l'expression de CD27 est perdue au cours de l'évolution du MM, les clones de cellules myélomateuses CD27- étant progressivement sélectionnés grâce à leur capacité à échapper à l'apoptose induite par les interactions CD27/CD70 (*Bataille et al, 2006*).

- L'expression de **CD28** est associée à une expansion tumorale (*Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Rawstron et al, 2008 ; Robillard et al, 1998*), vraisemblablement via l'induction de la sécrétion de chemokines (*Bataille et al, 2006*). L'étude de Mateo *et al* montre d'ailleurs, dans le groupe de patients CD28+, une fréquence plus élevée de stades ISS avancés et une survie plus courte, ainsi que la

présence d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (t(4;14) et del17p), par rapport aux patients de phénotype CD28- (*Mateo et al, 2008*).

Comme pour CD28, l'expression des molécules impliquées dans la costimulation des lymphocytes B et T comme **CD40**, ainsi que celle de **CD95** et des chaînes du récepteur à l'IL-6 (**CD126** et **CD130**), a été associée avec l'activité tumorale et/ou un déficit de la réponse immunitaire dans le MM (*Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Perez-Andres et al, 2009 ; Robillard et al, 1998*).

- L'expression des marqueurs B **CD19** et **CD20** par les plasmocytes malins a été identifiée comme élément de bon pronostic dans le MM. L'expression de l'un ou l'autre de ces antigènes serait associée à des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques favorables du point de vue du pronostic (morphologie de petits plasmocytes matures, hyperdiploïdie et t(11;14)) (*Bataille et al, 2006 ; Goasgen et al, 1999 ; Robillard et al, 2003*).

Néanmoins, des travaux plus récents viennent remettre en question la valeur pronostique de l'expression de CD19. En effet, *Perez-Andres et al* n'ont trouvé aucune association entre l'expression de CD19 et l'évolution des patients (*Perez-Andres et al, 2009*) et *Mateo et al* ont identifié CD19 comme un marqueur de mauvais pronostic (*Mateo et al, 2008*).

- Alors que l'expression de **CD56** différencie les plasmocytes malins (généralement CD56+) des plasmocytes bénins (CD56-), la perte d'expression de cet antigène dans le MM est, selon plusieurs équipes, associée à une dissémination extra-médullaire des cellules tumorales (*Pellat-Deceunynck et al, 1995 ; Pellat-Deceunynck et al, 1998 ; Rawstron et al, 1999*). *Rawstron et al.* ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de CD56 et le degré d'infiltration médullaire, ainsi que le nombre de plasmocytes circulants (phase leucémique) (*Rawstron et al, 1999*) comme l'avaient déjà montré *Pellat-Deceunynck et al.* (*Pellat-Deceunynck et al, 1998*). D'ailleurs, CD56 est moins fréquemment exprimé dans les PCL par rapport aux MM (*Colovic et al, 2008 ; Costello et al, 2001 ; Garcia-Sanz et al, 1999 ; Johson et al, 2006*).

Remarquons que, si *Sahara et al.* ont montré que les MM CD56- présentent plus fréquemment une morphologie plasmocytaire immature (plasmoblastique) et ont surtout une survie plus courte (*Sahara et al, 2002*), d'autres travaux affirment que ce phénotype n'est pas corrélé avec la progression de la maladie et n'influence pas la survie (*Mateo et al, 2008 ; Robillard et al, 1998*) ; il permettrait juste d'identifier un sous-groupe particulier de patients au diagnostic de la maladie.

Nous avons expliqué précédemment que les interactions entre les cellules myélomateuses et le micro-environnement favorisent non seulement la localisation de la tumeur au niveau médullaire, mais

ont aussi d'importantes conséquences fonctionnelles et cliniques. CD56 est une molécule d'adhésion qui participe au *homing* des cellules myélomateuses dans la moelle osseuse. La perte de son expression à la surface des plasmocytes malins les rend donc plus aptes à la dissémination sanguine, aboutissant à une maladie plus agressive et à une dissémination extra-médullaire (*Pellat-Deceunynck et al, 1998*) ; cela est plus habituellement observé dans les phases avancées de la maladie (*San Miguel et al, 2006*). D'autre part, il semble que l'expression de CD56 soit associée à des formes de MM particulièrement ostéolytiques (*Ely & Knowles, 2002 ; Lin et al, 2004*). En effet, cette molécule d'adhésion médie également des interactions entre les plasmocytes malins et les ostéoblastes (qui expriment fortement CD56) (*Ely & Knowles, 2002*). L'expression de CD56 par les cellules myélomateuses entraînerait une diminution de la production ostéoïde *in vivo* (*Ely & Knowles, 2002*), alors que les cellules CD56- seraient moins toxiques pour les ostéoblastes (*Bataille et al, 2006*).

- Une étude japonaise a mis en évidence l'intérêt pronostique du marqueur myélo-monocytaire **CD33** dans le MM (*Sahara et al, 2006*). Selon cette étude, l'expression de CD33 par les cellules myélomateuse serait associée à un mauvais pronostic et une résistance aux chimiothérapie conventionnelles (association melphalan-prednisone notamment) (*Leleu, 2006 ; Sahara et al, 2006*). En outre, il a aussi été suggéré une corrélation entre l'expression de CD33 et la présence de l'anomalie cytogénétique t(4;14), qui est un élément de mauvais pronostic (*Robillard et al, 2005b*).

- Enfin, l'expression de **CD117** par les cellules myélomateuses est associée avec une présentation clinique plus indolente et une évolution plus favorable de la pathologie (*Bataille et al, 2006 ; Mateo et al, 2008 ; San Miguel et al, 2006*).

Ainsi, l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF pourrait permettre d'évaluer les risques de transformation (notamment de MGUS ou SMM en MM) ou de rechute (plasmocytome, MM) et d'orienter la prise en charge de la pathologie, par exemple vers une surveillance clinique plus attentive dans les MGUS ou SMM à fort risque de progression, ou pour le choix thérapeutique selon que le MM exprime des caractéristiques phénotypiques favorables ou péjoratives (*Rawstron et al, 2008*).

3.3. Intérêt thérapeutique

3.3.1. Identification de cibles thérapeutiques potentielles

Comme dans la plupart des autres hémopathies malignes, de nombreux travaux de recherche visent à améliorer l'arsenal thérapeutique « anti-MM ». L'immunophénotypage des cellules myélomateuses, par la mise en évidence d'antigènes de surface plus ou moins spécifiquement exprimés par les cellules malignes, est susceptible de permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour un traitement spécifique du MM (*Rawstron et al, 2008*).

On peut distinguer d'une part des thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules exprimées de façon quasi constante par les cellules myélomateuses, comme CD38 et CD138. CD38 est exprimé par la quasi-totalité des cellules myélomateuses. Néanmoins, cet antigène ne constitue pas une cible thérapeutique de choix dans le MM, puisque son niveau d'expression par les plasmocytes tumoraux est plus faible que celui des plasmocytes physiologiques et que ce n'est pas un marqueur complètement spécifique de la lignée plasmocytaire. CD138, plus que CD38, paraît être une cible attrayante. En effet, toutes les cellules myélomateuses de tous les patients expriment le *syndecan-1*, et le niveau de son expression par les cellules plasmocytaires malignes est plus élevé que celui des plasmocytes normaux (*Bataille et al, 2006*). Une autre option thérapeutique pourrait être de cibler CD11a/CD45, puisque la co-expression de ces deux antigènes est restreinte au compartiment le plus proliférant des cellules myélomateuses (*Bataille et al, 2006*).

D'autre part, l'hétérogénéité des phénotypes plasmocytaires dans le MM incite à développer des thérapeutiques plus ciblées pour des entités phénotypiques bien définies. Plusieurs molécules constituent ainsi potentiellement des cibles de choix comme CD19, CD20, CD27, CD33, CD52, CD117, ou encore la tyrosine-kinase CD221 (*Bataille et al, 2006 ; Descamps et al, 2009 ; Rawstron et al, 2006 ; Robillard et al, 2005b ; Sahara et al, 2006*). Certains anticorps monoclonaux dirigés contre ces antigènes ont ainsi fait l'objet d'essais thérapeutiques dans le MM, comme l'alemtuzumab (anti-CD52) (*Rawstron et al, 2006*), le rituximab (anti-CD20) (*Moreau et al, 2007*), le gemtuzumab (anti-CD33) (*Robillard et al, 2005b*), mais aucun d'entre eux n'a encore montré une réelle efficacité « anti-MM ».

3.3.2. Évaluation de la réponse au traitement et de la maladie résiduelle

L'évolution récente des traitements du MM (*cf -I- Le myélome multiple, 8.1.*) a permis une nette amélioration de l'efficacité thérapeutique, associée à la fois avec une augmentation du taux de rémission et une diminution progressive du nombre de cellules malignes résiduelles. En parallèle, il est devenu indispensable de disposer de critères de plus en plus stricts et de techniques plus sensibles et spécifiques pour évaluer la réponse au traitement et la maladie résiduelle, afin d'affiner la surveillance des patients, d'améliorer l'adaptation thérapeutique et de détecter au plus tôt la rechute, ainsi que pour évaluer l'efficacité des nouvelles stratégies thérapeutiques (*Davies et al, 2002*).

Ainsi, récemment, deux nouveaux critères ont été proposés afin de définir une catégorie de réponse supplémentaire, de définition plus stricte que la RC (réponse complète stricte, RCs ou stringent complete response, sCR) (*Durie et al, 2006 ; Kyle & Rajkumar, 2009*) (*Annexe 2*). L'un de ces critères consiste en l'absence de plasmocytes clonaux médullaires détectés par immunofluorescence. Effectivement, parmi les différentes techniques susceptibles d'être utilisées pour améliorer le suivi de la maladie (morphologie, électrophorèse des protéines, immunofixation, CMF, PCR *polymerase chain reaction*), la CMF semble avoir toute sa place puisqu'elle permet de quantifier les cellules malignes résiduelles avec une sensibilité et une spécificité tout à fait adaptées à la pratique clinique, de quantifier ainsi la masse tumorale médullaire et également la population plasmocytaire physiologique (reflet de la reconstitution de l'immunité humorale), qui sont des éléments prédictifs de l'évolution de la maladie et de la survie des patients (*De Tute et al, 2007 ; Morice et al, 2007 ; Owen & Rawstron, 2005 ; Paiva et al, 2008 ; Rawstron et al, 2008 ; San Miguel et al, 2002 ; San Miguel et al, 2006*).

Ainsi, plusieurs études et revues publiées ces dernières années dans la littérature s'accordent sur l'utilité d'une quantification plus sensible de la réponse au traitement et d'une évaluation de la maladie résiduelle dans le MM (ce qui était encore inconcevable il y a quelques années), ainsi que sur l'intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF dans cette indication. Néanmoins, d'autres investigations sont encore nécessaires pour mettre au point un panel de marqueurs phénotypiques consensuel, optimiser les techniques et standardiser les pratiques avant une éventuelle application en routine.

3.4. *En pratique*

L'immunophénotypage plasmocytaire par CMF présente donc des intérêts majeurs et multiples dans la prise en charge du MM et des pathologies plasmocytaires au sens large. Néanmoins, son utilisation en routine est encore assez peu répandue et la standardisation des méthodes et des protocoles reste à établir. Récemment, l'EMN a publié un consensus quant aux marqueurs phénotypiques à utiliser pour l'étude du MM par CMF (*Rawstron et al, 2008*).

3.4.1. Marqueurs de repérage

L'identification précise des cellules myélomateuses par CMF est cruciale pour la détermination des caractéristiques phénotypiques particulières du MM.

La double expression du CD38 et du CD138 permet d'affirmer la nature plasmocytaire d'une cellule médullaire, sans préjuger du caractère malin. Les plasmocytes tumoraux sont traditionnellement identifiés par le profil CD38+++ / CD45 faible, ce qui ne permet pas d'identifier les MM composés pour tout ou partie de plasmocytes CD45+. Finalement, c'est la combinaison des trois marqueurs **CD38/CD138/CD45** qui est reconnue comme étant la plus efficace pour l'identification des cellules plasmocytaires malignes (*Davies et al, 2002 ; Lin et al, 2004 ; Rawstron et al, 2008*) (Tableau VII). En effet, cette « triple identification » permet :

- d'éviter la contamination par des éléments CD38+ non plasmocytaires (ils seront CD138-) (*Lin et al, 2004*),
- de détecter les éléments CD38- ou faible (de rares cas de négativité du CD38 ont été rapportés dans le MM) (*Bataille et al, 2006*),
- de prendre en compte les éléments dont la densité antigénique de CD138 est faible, à savoir les cellules plasmocytaires apoptotiques (*Bataille et al, 2006*) ou très immatures,
- de discriminer les plasmocytes malins des plasmocytes physiologiques par l'expression de CD45.

3.4.2. Marqueurs de malignité

Une fois les cellules plasmocytaires identifiées, il convient de déterminer leur profil phénotypique afin de mettre en évidence leur caractère malin, d'identifier des caractéristiques phénotypiques particulières (à la base de l'utilisation de l'immunophénotypage dans le suivi de la maladie) et d'obtenir des éléments pronostiques. Comme nous avons pu le constater, de nombreux marqueurs sont rapportés dans la littérature (*cf* paragraphe 2.). Aucun marqueur n'a été identifié comme seul capable de discriminer systématiquement les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux. Il s'agit donc d'utiliser des combinaisons pertinentes des différents marqueurs phénotypiques d'intérêt (panels). En utilisant cette stratégie, même dans les cas où certains des antigènes sont « normalement » exprimés (profil d'expression d'un plasmocyte normal), l'évaluation de l'expression des autres antigènes du panel est susceptible de mettre en évidence au moins une aberration phénotypique, afin d'identifier les cellules comme myélomateuses par rapport aux plasmocytes normaux, dans la quasi-totalité des cas de MM.

L'EMN a publié un consensus quant aux marqueurs phénotypiques à tester dans le MM. Il propose, outre les antigènes « d'identification » CD38/CD138/CD45 (*Rawstron et al, 2008*) (Tableau VII) :

- un panel minimum comprenant les marqueurs de malignité **CD19** et **CD56** ; cette combinaison serait capable de mettre en évidence la malignité des plasmocytes dans plus de 90% des cas (*Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998*),
- un panel de base correspondant au panel minimum auquel il convient d'ajouter **CD20**, **CD27**, **CD28** et **CD117**, afin d'obtenir une combinaison optimale permettant d'identifier et de caractériser les plasmocytes malins.

Tableau VII : Immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiple : marqueurs d'intérêt, profils d'expression et valeur pronostique. Synthèse des données de la littérature (d'après Rawstron *et al*, 2008).

En orange : profil d'expression aberrant par rapport à celui d'un plasmocyte normal.

-, non exprimé ; +, exprimé ; +++, fortement exprimé ; ?, absence de données.

MM, myélome multiple.

	Profils d'expression		Cas de MM	Valeur pronostique	Utilisation	
	normal (physiologique/ réactionnel)	aberrant (tumoral)	présentant un profil aberrant		pour l'immunophénotypage dans le MM	
CD38	+++	++			indispensable	REPERAGE
CD138	+++	+++			indispensable	
CD45	+	-	> 90%	défavorable	indispensable	
CD19	+	-	> 95%	CD19+ favorable	essentielle	MALIGNITE
CD56	-	+	60-70%	CD56- défavorable	essentielle	
CD20	-	+	~ 20%	favorable	recommandée	
CD27	+	-	40-50%	défavorable	recommandée	MALIGNITE
CD28	-	+	15-45%	défavorable	recommandée	
CD33	-	+	~ 20%	défavorable	?	
CD117	-	+	~ 30%	favorable	recommandée	
CD221	faible	+	~ 75%	défavorable	?	

- II -

PATIENTS & METHODES

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les données publiées ces dernières années témoignent d'un intérêt croissant pour l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF, avec un bénéfice clinique potentiel pour les patients chez qui le diagnostic de MM est suspecté ou établi.

L'étude mise en place depuis 2007 dans le service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy, en collaboration avec le service clinique d'Hématologie Adulte, a pour objectif principal de caractériser le clone myélomateux pour une population de patients atteints de MM, au diagnostic de la maladie, à l'aide d'un protocole d'immunophénotypage en CMF quatre couleurs.

1. Patients et prélèvements

1.1. Patients

Cinquante patients ont été inclus dans l'étude, sur une période de 31 mois, entre août 2007 et mars 2010.

Tous répondent aux critères diagnostiques internationaux consensuels du MM (*The IMWG, 2003 ; Kyle & Rajkumar, 2009*), à savoir l'existence d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10% et la présence d'un composant monoclonal sérique et/ou urinaire. La plupart des cas sont des **MM symptomatiques**, avec au moins l'un des critères « CRAB » (hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésions osseuses). Des MM asymptomatiques ou indolents, **SMM**, répondant aux deux critères biologiques cités ci-dessus mais ne présentant aucun des critères « CRAB », ont également été inclus. En revanche, les MGUS ont été exclues. Les critères diagnostiques internationaux consensuels de ces trois entités sont résumés en annexe (*Annexe 1*).

Les cinquante patients sont pris en charge dans le service d'Hématologie Adulte du CHU de Nancy (clinicien référent Docteur C. Hulin).

1.2. Prélèvements pour l'immunophénotypage plasmocytaire

1.2.1. Types de prélèvements

Les prélèvements sont réalisés pour chaque patient **au diagnostic**.

L'immunophénotypage par CMF peut être réalisé à partir d'échantillons de moelle osseuse, de sang périphérique ou d'autres liquides biologiques.

- **Moelle osseuse**

La moelle osseuse est prélevée stérilement par aspiration à l'aide d'un trocart, dans la crête iliaque ou le sternum, après désinfection soigneuse du site de prélèvement et éventuellement anesthésie locale. Après avoir préparé immédiatement des lames pour la cytologie, et éventuellement mis de côté la quantité d'échantillon nécessaire aux études de cytogénétique, le reste du prélèvement de moelle liquide est placé dans un tube contenant l'anticoagulant EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) destiné à l'immunophénotypage plasmocytaire en CMF. 1 à 2 mL sont suffisants pour cette analyse. Le tube doit être homogénéisé immédiatement par une série de retournements lents, pour incorporer l'anticoagulant à la moelle qui a tendance à coaguler facilement.

- **Sang périphérique**

Le sang périphérique destiné à l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF est prélevé au pli du coude ou dans un cathéter et placé dans un tube contenant de l'EDTA (homogénéisé immédiatement par retournements lents). 5 à 10 mL sont suffisants, selon la richesse de l'envahissement périphérique (ce volume doit être augmenté en cas de leucopénie connue ou d'un faible pourcentage de cellules à typer).

- **Autres liquides biologiques**

L'immunophénotypage peut être effectué à partir d'autres liquides envahis comme un liquide d'ascite. Dans ce cas le prélèvement est recueilli dans un flacon stérile.

1.2.2. Transport, stockage et contrôle des échantillons

Les prélèvements destinés à l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF sont adressés au service d'Hématologie Biologique du CHUN, selon un cheminement habituel et dans les meilleurs délais, et maintenus à température ambiante (environ 20°C).

Lorsqu'un prélèvement parvient au laboratoire, il faut avant tout vérifier son aspect, notamment s'assurer de l'absence de caillot ou d'hémolyse. Puis le volume est mesuré et un frottis sur lame de verre est préparé, coloré au MGG et observé en microscopie optique afin d'apprécier les caractéristiques cytologiques de l'échantillon.

La limite de réalisation de l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF pour cette étude est fixée à 3% de plasmocytes dans l'échantillon.

2. Matériel

2.1. Appareils

- Centrifugeuse GR412, *Jouan*
- Appareil d'hématimétrie Advia 2120[®], *Siemens*
- Cytomètre en flux quatre couleurs FACSCalibur[®], *Becton Dickinson*, utilisé avec le logiciel CellQUEST[®], *Becton Dickinson* et les tubes pour cytomètre en flux Sarstedt[®] (référence 55.1579.002)

2.2. Réactifs

- Milieu de séparation des cellules mononucléées :
Lymphoprep[®], référence CMSMSL01-OU, *Eurobio*
- Tampon phosphate buffer saline (PBS) :
Cell Wash[®], référence 349524, *Becton Dickinson Biosciences*
- Anticorps monoclonaux :
Les anticorps monoclonaux utilisés dans notre protocole sont détaillés dans le tableau ci-après (Tableau VIII).
- Solution de lyse (obtenue par dilution au dixième en eau distillée) :
BD FACS Lysing Solution[®], référence 3492 02, *Becton Dickinson Biosciences*

Tableau VIII : Caractéristiques des anticorps monoclonaux utilisés.

Anticorps et fluorochrome	Clone	Référence	Fournisseur (société)
anticorps anti-CD38 couplé à l'allophycocyanine anti-CD38 APC	HB7	345807	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
anticorps anti-CD138 couplé à la peridin chlorophyll-cyanine5.5 anti-CD138 PerCP-Cy5.5	MI15	341107	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
anticorps anti-CD45 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine anti-CD45 FITC	J.33	A07782	<i>Immunotech, Beckman Coulter</i>
anticorps anti-CD19 couplé à la phycoérythrine anti-CD19 PE	J3-119	A07769	<i>Immunotech, Beckman Coulter</i>
anticorps anti-CD56 couplé à la phycoérythrine anti-CD56 PE	MY31	345810	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
anticorps anti-CD28 couplé à la phycoérythrine anti-CD28 PE	L2-93	348047	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
anticorps anti-CD27 couplé à la phycoérythrine anti-CD27 PE	1A4-CD27	A54823	<i>Immunotech, Beckman Coulter</i>
anticorps anti-CD20 couplé à la phycoérythrine anti-CD20 PE	L27	345793	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
anticorps anti-CD33 couplé à la phycoérythrine anti-CD33 PE	P67.6	345799	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
contrôle isotypique IgG1 marqué à la phycoérythrine <i>Mouse γ1 PE, IgG1 PE</i>	X40	345816	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
contrôle négatif <i>Rabbit immunoglobulin fraction</i>		X0903	<i>DakoCytomation</i>

3. Méthodes : immunophénotypage plasmocytaire

3.1. Préparation des cellules

La séparation des cellules sur gradient de densité a pour buts d'éliminer les hématies présentes dans le prélèvement et d'enrichir l'échantillon en cellules anormales à typer.

Le principe repose sur la séparation des cellules de l'échantillon par centrifugation sur un milieu Ficoll-Diatrizoate de haute densité (densité $1,077 \pm 0,01$), en deux fractions : d'une part les globules rouges et les granuleux polylobés de densité plus grande qui sédimentent au fond du tube, et d'autre part les cellules mononucléées (lymphocytes, monocytes, plasmocytes...) qui restent à l'interface échantillon/milieu de séparation.

Le prélèvement est tout d'abord dilué avec du PBS (sang : dilution au demi ; moelle osseuse : dilution au tiers). Dans un tube conique de 15 mL sont déposés séquentiellement environ un tiers de Lymphoprep® puis environ deux tiers d'échantillon dilué. Après centrifugation 30 minutes à 400 g (1500 tours par minute), l'anneau opalescent situé au-dessus du culot érythrocytaire et contenant les cellules mononucléées est recueilli. Les cellules mononucléées sont ensuite lavées avec 5 mL de PBS, puis, après centrifugation 5 minutes à 300 g (1200 tours par minute), le surnageant est éliminé par retournement. Le culot est repris dans 500 µL de PBS.

Le nombre de cellules mononucléées contenues dans cette suspension cellulaire est énuméré à l'aide de l'hématimètre et la concentration est ajustée à 5×10^5 cellules par tube, dans le PBS. La qualité (composition et richesse en cellules à typer) de la suspension cellulaire ainsi obtenue est vérifiée par cytocentrifugation colorée au MGG.

Notons que la pratique a montré que cette étape n'était pas absolument nécessaire et que l'analyse pouvait être réalisée à partir de moelle osseuse totale.

3.2. Immunomarquages

Les réactifs utilisés pour les immunomarquages sont des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de différenciation humains (« anti-CD ») et couplés à des fluorochromes (technique directe). Pour la réalisation de marquages multiples, on applique dans le même tube des anticorps monoclonaux couplés chacun à un fluorochrome différent. Le choix des anticorps conjugués utilisés

simultanément est réalisé de telle sorte pour éviter l'encombrement stérique à la surface de la cellule, éviter le *quenching* (excitation de fluorescence) et obtenir des signaux optimaux, notamment en choisissant des fluorochromes à forte fluorescence pour les antigènes d'expression faible et *vice versa*. Les anticorps utilisés dans notre protocole ont été décrits précédemment (*cf* paragraphe 2.2., Tableau VIII).

Le protocole d'immunomarquages utilisé est détaillé dans le cadre ci-dessous et dans le tableau ci-après (Tableau IX). Le choix des marqueurs phénotypiques analysés repose sur les données de la littérature disponibles au moment de la mise en place du protocole ; leurs caractéristiques sont récapitulées en annexe de ce mémoire (Annexe 4).

Chaque tube contient les anticorps d'identification plasmocytaire CD38/CD138/CD45, dits marqueurs de repérage. Puis, comme le laboratoire dispose d'un appareil de CMF quatre couleurs, il ne reste la possibilité que d'ajouter un seul marqueur de caractérisation plasmocytaire, ou marqueur de malignité, dans chaque tube. Le panel étudiant l'expression de CD19, CD56, CD28, CD27, CD20 et CD33 nécessite donc six tubes, plus un septième pour le contrôle isotypique (anticorps monoclonal de même isotype que les « anti-CD », avec une concentration identique et couplé au même conjugué fluorescent, mais sans spécificité pour les cellules humaines, permettant de vérifier l'absence de marquage non spécifique sur la population de cellules à typer).

(i) Un mélange des trois marqueurs de repérage est préparé comme suit :

anti-CD38 APC [10 µL] + anti-CD45 FITC [25 µL] + anti-CD138 PerCP-Cy5.5 [50 µL]

(ii) A la suspension cellulaire ajustée à 5×10^5 cellules par tube sont ajoutés 8,5 µL de ce mélange anti-CD38 APC/anti-CD138 PerCP-Cy5.5/anti-CD45 FITC.

(iii) Un quatrième anticorps monoclonal (IgG1 PE ou anti-CD19 PE ou anti-CD56 PE ou anti-CD28 PE ou anti-CD27 PE ou anti-CD20 PE ou anti-CD33 PE) est ajouté dans chaque tube, selon le schéma décrit dans le tableau ci-après (Tableau IX).

Tableau IX : Protocole d'immunomarquages.

APC, allophycocyanine ; FITC, isothiocyanate de fluorescéine ; PE, phycoérythrine ; PerCP-Cy5.5, peridin chlorophyll-cyanine5.5.

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7
suspension cellulaire [5×10^5 cellules]						
mélange anti-CD38 APC/anti-CD138 PerCP-Cy5.5/anti-CD45 FITC [8,5 μ L]						
IgG1 PE [3,5 μ L]	anti-CD19 PE [5 μ L]	anti-CD56 PE [5 μ L]	anti-CD28 PE [10 μ L]	anti-CD27 PE [10 μ L]	anti-CD20 PE [10 μ L]	anti-CD33 PE [10 μ L]

Les tubes contenant la solution cellulaire et les anticorps monoclonaux sont mélangés par agitation rotative puis incubés 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

3.3. Lyse érythrocytaire

Cette étape doit s'effectuer après l'incubation des cellules avec les réactifs d'immunophénotypage, car il s'agit de marquages membranaires et les réactifs utilisés pour la lyse peuvent être perméabilisants.

On procède à la lyse érythrocytaire du contenu des sept tubes en ajoutant, dans chacun des tubes, 2 mL de solution de lyse. Après avoir mélangé par agitation rotative, on laisse incuber 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante, puis on centrifuge 5 minutes à 400 g (1200 tours par minute), et on élimine le surnageant. Le culot est resuspendu dans 2 mL de PBS, et on procède à nouveau à une agitation rotative, une centrifugation 5 minutes à 400 g (1200 tours par minute), et l'élimination du surnageant. Enfin on resuspend dans 500 μ L de PBS et on mélange par agitation rotative.

3.4. Analyse cytométrique

L'analyse cytométrique des cellules marquées est effectuée à l'aide du cytomètre FACSCalibur® équipé du logiciel CellQUEST® (cf paragraphe 2.1.).

L'analyse cytométrique est décrite dans le cadre ci-dessous et montrée sur la figure ci-après (Figure 26). Les plasmocytes malins sont reconnus par leur co-expression CD38/CD138 et leur absence d'expression de CD45.

- (i) Sur la représentation biparamétrique structure SSC/FL4 APC, on réalise la fenêtre R1 ciblant les éléments CD38+.
- (ii) Sur la représentation biparamétrique FL3 PerCP-Cy5.5/FL4 APC conditionnée sur R1, on réalise une fenêtre R2 ciblant les éléments CD38+/CD138+.
- (iii) Sur la représentation biparamétrique taille FSC/FL1 FITC conditionnée sur R1*R2, on réalise une fenêtre R3 ciblant les éléments CD45+ ou CD45-.
- (iv) Sur la représentation biparamétrique FL2 PE/ FL4 APC conditionnée sur R1*R2*R3, on réalise un quadrant statistique pour analyser les marqueurs spécifiques étudiés pour chaque tube.

Le nombre d'événements collectés est fixé à 2 000 (nombre d'événements dans la fenêtre R2).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant le marqueur étudié dans la population des cellules plasmocytaires, avec un seuil de positivité fixé à 20%.

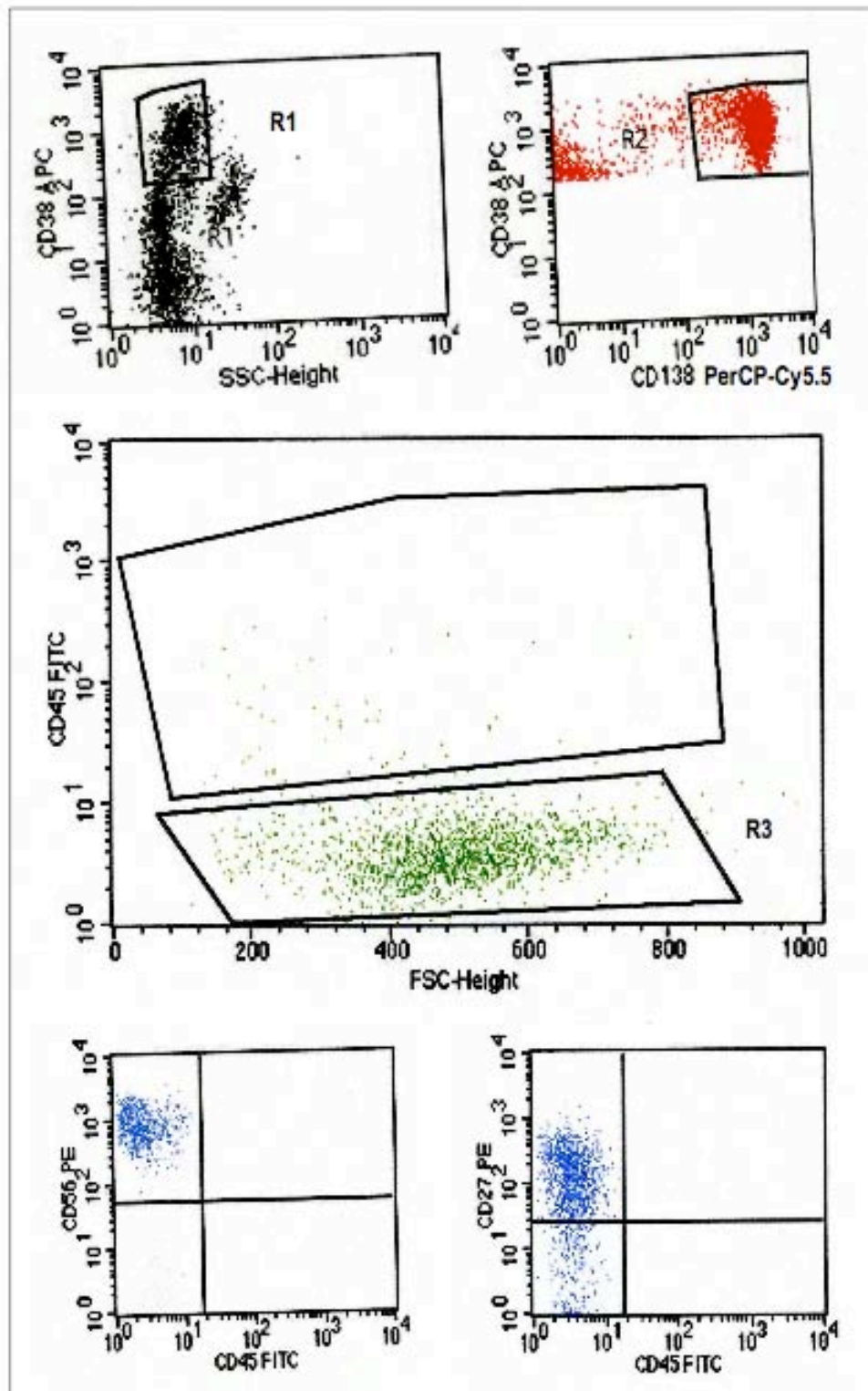


Figure 26 : Analyse cytométrique des cellules plasmocytaires.

Les plasmocytes sont reconnus par leur co-expression CD38/CD138 (région rouge R2) et leur expression faible de CD45 (région verte R3). Dans cet exemple, les plasmocytes expriment le CD56 et le CD27 (régions bleues).

4. Autres paramètres et données clinico-biologiques analysés

Pour chaque cas, diverses données clinico-biologiques pertinentes (*cf -I- Le myélome multiple*) ont été collectées, à savoir :

- le sexe et l'âge du patient,
- le stade de la maladie selon les classifications de Durie et Salmon et l'ISS,
- la présence de lésions osseuse (radiographies),
- les paramètres biochimiques usuels dans la prise en charge du MM : protidémie, type et concentration du composant monoclonal dans le sérum et/ou les urines, albuminémie, taux d'Ig physiologiques, dosage des CLL sériques et ratio CLL κ /CLL λ , créatininémie, calcémie, β_2 m sérique, LDH et CRP,
- le pourcentage de plasmocytes dans la moelle osseuse (évalué par observation en microscopie optique de frottis d'aspiration médullaire colorés au MGG),
- les paramètres de l'hémogramme,
- la recherche des anomalies cytogénétiques del13, del17p et t(4;14) (par FISH),
- le type de traitement mis en place, le nombre de ligne(s) de traitement et la réponse maximale au traitement, évaluée selon les critères de l'IMWG et exprimée selon les catégories définies par l'IMWG (réponse complète ou RC, très bonne réponse complète ou TBRP, réponse partielle RP, maladie stable MS et maladie en progression, MP) (*Annexe 2*),
- l'évolution de la maladie, évaluée par la survie sans progression ou PFS (*progression free survival*) et la survie globale ou OS (*overall survival*) (*Annexe 3*), comme recommandé dans la littérature (*Anderson et al, 2008*).

Les analyses biologiques ont été principalement effectuées par les laboratoires de Biochimie et d'Hématologie du CHU de Nancy, sauf pour les analyses de cytogénétique, envoyées au laboratoire référent à Nantes (laboratoire d'Hématologie, CHU de Nantes).

Les renseignements cliniques ont été obtenus par recherche dans les dossiers médicaux des patients, dans le service d'Hématologie Adulte du CHU de Nancy.

- III -

RESULTATS & DISCUSSION

Nous avons réalisé au service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy les immunophénotypages plasmocytaires chez cinquante patients atteints de MM au diagnostic, dans le but d'étudier l'intérêt de l'analyse phénotypique des plasmocytes par CMF chez des patients atteints de MM.

Plus précisément ce travail a pour objectifs :

- de valider le protocole d'immunomarquages et la technique de réalisation de l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF,
- de comparer les données de l'immunophénotypage plasmocytaire par rapport aux autres critères biologiques usuels pour le diagnostic de MM,
- d'interpréter les phénotypes plasmocytaires obtenus :
 - o d'une part pour chaque marqueur, en comparaison aux données publiées dans la littérature,
 - o d'autre part avec une approche originale par profil phénotypique, en prenant en compte le phénotype plasmocytaire dans sa globalité (combinaison des 6 marqueurs de malignité étudiés).

En premier lieu, nous allons donc présenter les caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée (paramètres utilisés en routine dans la prise en charge des patients atteints de MM), afin de comparer notre population de patients par rapport aux séries publiées dans la littérature. Puis nous détaillerons les résultats des analyses phénotypiques et les commenterons, en nous intéressant d'abord à la population de cinquante patients dans sa globalité, et en analysant ensuite quelques cas particuliers.

1. Caractéristiques clinico-biologiques de la population

1.1. *Diagnostics, classifications et histoire de la maladie*

1.1.1. Diagnostics

Les cinquante patients inclus dans l'étude entre août 2007 et mars 2010 répondent tous aux critères diagnostiques internationaux consensuels de MM symptomatique ou indolent (SMM) (*The IMWG, 2003 ; Kyle & Rajkumar, 2009*), comme décrit dans la partie précédente (*cf -III- 1.1.*) et résumé en annexe (Annexe 1). Plus précisément, la grande majorité des patients inclus (quarante-sept parmi cinquante) sont atteints de MM symptomatique ; seuls trois d'entre eux présentent un SMM. Notons que la proportion de SMM dans notre étude est donc de 6%, alors la prévalence estimée des SMM se situerait entre 15 et 44% des MM nouvellement diagnostiqués (*Perez-Persona et al, 2007*). Cette discordance peut simplement s'expliquer par un biais de recrutement, puisque seule une minorité de patients atteints de SMM ont bénéficié d'un immunophénotypage plasmocytaire au diagnostic.

1.1.2. Classifications

La répartition des patients selon la classification de Durie et Salmon et selon l'ISS (*cf -I- Le myélome multiple, 7.2.*) est détaillée dans le tableau ci-après (Tableau X). Les pourcentages obtenus sont difficilement comparables avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature, qui sont d'ailleurs assez hétérogènes. En effet, la répartition des patients selon les critères de la classification de Durie et Salmon ou de l'ISS dépend du stade de la maladie lors du recrutement, ce qui varie selon les études, notamment en fonction des critères d'inclusion et des objectifs de l'étude (*Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2008 ; Paiva et al, 2008*).

Rappelons que les SMM correspondent au stade I de la classification de Durie et Salmon. En revanche, l'ISS ne s'applique pas aux SMM.

Tableau X : Répartition des patients selon la classification de Durie et Salmon et selon l'ISS.

N=50 pour la classification de Durie et Salmon. N=47 pour l'ISS (SMM exclus).

ISS, *International Staging System*.

Classification / stade	Nombre de patients	Pourcentage de patients
<u>Classification de Durie et Salmon</u>		
I	6	12%
II	22	44%
III	22	44%
A	41	82%
B	9	18%
<u>ISS</u>		
I	12	26%
II	17	36%
III	18	38%

1.1.3. Histoire de la maladie

Parmi les quarante-sept patients atteints de MM symptomatique, certains présentaient auparavant (avant que le diagnostic de MM symptomatique ne soit posé, c'est-à-dire avant leur inclusion dans l'étude) une autre pathologie de la lignée plasmocytaire (*cf -I- Le myélome multiple, 6.2.*) : quatre d'entre eux avaient un SMM, un avait une MGUS, un patient présentait un plasmocytome et un autre une amylose AL. Au total, sept des quarante-sept patients atteints de MM symptomatique au moment de l'inclusion, soit 15%, présentaient une pathologie plasmocytaire connue avant le diagnostic de MM. Dans la large série de patients publiée par Kyle *et al*, cette proportion s'élève à un peu plus d'un tiers de l'effectif (Kyle *et al*, 2003).

1.2. **Caractéristiques démographiques**

Les données concernant la répartition des cinquante patients selon les critères de sexe et d'âge au diagnostic sont détaillées dans le tableau ci-après (Tableau XI).

Tableau XI : Données démographiques de la population étudiée. (N=50)

		Nombre de patients	Pourcentage de patients
<u>Sexe</u>			
sex ratio H/F	0,8		
masculin		22	44%
féminin		28	56%
<u>Age</u>			
médiane (min.-max.)	64,5 ans (43-86)		
< 50 ans		4	8%
≥ 70 ans		19	38%

Parmi les patients inclus dans l'étude, on trouve un peu plus de femmes que d'hommes. La **répartition homme/femme** est donc inversée par rapport aux données de la littérature, puisqu'à notre connaissance toutes les séries de patients atteints de MM publiées ces dix dernières années rapportent un sex ratio H/F supérieur à 1, en général proche de 1,5, avec une proportion d'hommes comprise entre 50 et 66% (*Almeida et al, 1999 ; Greipp et al, 2005 ; Kyle et al, 2003 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Nowakowski et al, 2005 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009 ; Perez-Andres et al, 2009 ; Rawstron et al, 1999 ; Rawstron et al, 2002 ; De Tute et al, 2007*). Cette divergence peut simplement s'expliquer par le petit effectif de notre étude. Il est fort probable que sur une population de patients plus conséquente, nous retrouvions une répartition homme/femme proche de celle des autres séries.

En ce qui concerne l'**âge** des patients au diagnostic, les données obtenues pour notre population de cinquante patients (Tableau XI) sont tout à fait concordantes avec celles de la littérature. En effet, la médiane d'âge au diagnostic se situe aux alentours de 60-65 ans dans la majorité des études publiées, avec un âge minimum entre 20 et 42 ans et un âge maximum entre 70 et 94 ans selon les séries (*Greipp et al, 2005 ; Kyle et al, 2003 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Nowakowski et al, 2005 ; Paiva et al, 2009 ; Rawstron et al, 1999*). Ces chiffres prouvent bien que le MM est une pathologie du sujet âgé. D'ailleurs, si moins de 10% des patients de notre étude sont âgés de moins de 50 ans, ils sont presque 40% à atteindre 70 ans ou plus lors du diagnostic, pourcentage identique à celui de la série de Kyle et al (*Kyle et al, 2003*).

Notons tout de même que certains travaux rapportent une médiane d'âge moins élevée (55-60 ans) (Paiva et al, 2008 ; Rawstron et al, 2002 ; Sarasquete et al, 2005). Cela est sûrement lié aux critères d'inclusion, puisqu'il ne s'agit pas d'études portant sur des patients atteints de MM au diagnostic « tout-venant », mais de patients traités de façon intensive (intensification suivi d'une autogreffe de CSH), stratégie thérapeutique appliquée aux patients « jeunes », c'est-à-dire généralement de moins de 65 ans.

1.3. Clinique

Parmi les critères cliniques à évaluer au diagnostic de MM, l'atteinte osseuse et l'atteinte rénale sont d'importance majeure (cf -I- Le myélome multiple, 4.).

Nous ne détaillerons pas ici les données relatives à l'atteinte rénale ; elles seront mentionnées dans le paragraphe suivant, du point de vue biologique (valeurs de la créatininémie) (cf paragraphe 1.4.2.).

Les **lésions osseuses** sont présentes au diagnostic chez trente-trois des cinquante patients, soit environ deux tiers de la population. Ce chiffre est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature : entre 67 et 80% des patients, selon les études, présentent des lésions osseuses lors du diagnostic de MM (Kyle et al, 2003 ; Sarasquete et al, 2005).

Un **syndrome d'hyperviscosité** est observé chez l'un des patients de notre étude, en lien avec une protéine monoclonale de nature IgM.

Les autres manifestations cliniques (infectieuses, neurologiques) sont plutôt des complications qui apparaissent au cours de l'évolution de la maladie et ne sont donc pas détaillées ici.

1.4. Paramètres biologiques recommandés pour le diagnostic de myélome

1.4.1. Composant monoclonal sérique et urinaire

Les données concernant la mise en évidence, la nature et la quantification de la protéine M dans le sérum et/ou les urines pour l'ensemble des patients de l'étude sont reportées dans le tableau ci-après (Tableau XII).

Tableau XII : Données concernant le composant monoclonal sérique et/ou urinaire dans la population étudiée.

EPS, électrophorèse des protéines sériques ; EPU, électrophorèse des protéines urinaires ; IF, immunofixation ; Ig, immunoglobuline ; PBJ, protéinurie de Bence Jones.

	Médiane (min.-max.)	Nombre de patients	Pourcentage de patients
<u>Sérum</u>			
Présence d'un pic à l'EPS		35	70%
IF positive		50	100%
Type de protéine M			
IgG		25	50%
IgA		11	22%
IgM		1	2%
chaînes légères		13	26%
Type de chaîne légère			
κ		31	62%
λ		19	38%
Concentration de la protéine M	32 g/L (6-77)		
< 10 g/L		1	3%
< 30 g/L		16	46%
≥ 50 g/L		8	23%
<u>Urines</u>			
Réalisation d'une EPU		41	82%
Présence de PBJ		40	98%
Type de chaîne légère			
κ		26	65%
λ		14	35%

▪ **Mise en évidence de l'Ig monoclonale dans le sérum et/ou les urines**

L'EPS met en évidence sur le tracé densitométrique un pic témoignant de l'existence d'une gammopathie monoclonale dans 70% des cas. Cette proportion est comparable, quoiqu'un peu plus faible, à celles publiées dans la littérature (environ 80% des cas de MM ont une EPS « positive ») (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*).

Une IF des protéines sériques a été réalisée chez la totalité des cinquante patients de l'étude. Elle est « positive », c'est-à-dire qu'elle met en évidence une protéine monoclonale, dans tous les cas. Ce

résultat est en accord avec la littérature (plus de 90% des cas de MM ont une IF « positive ») (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*) et nous permet de remarquer que notre étude ne comporte aucun cas de MM non sécrétant ou non excréant (lorsqu'aucune synthèse et/ou sécrétion d'Ig n'a lieu), ce qui n'est pas étonnant puisque ces entités sont extrêmement rares.

Une EPU a été réalisée pour quarante et un des cinquante patients de la population, à la recherche d'une PBJ. Les raisons de non réalisation de cette analyse sont le plus souvent une quantité de prélèvement insuffisante ou la présence d'une hématurie macroscopique. L'EPU s'est révélée « positive », signant un passage dans les urines de CLL monoclonales, dans tous les cas sauf un (cas d'un SMM avec EPS et IF « positives » dans le sérum).

▪ **Nature de l'Ig monoclonale**

Le composant monoclonal est dans la moitié des cas une IgG, et une IgA dans 22% des cas. Un cas est un MM à IgM, entité très rare trouvée chez une très faible proportion de patients (moins de 0,5% des MM) (*Feyler et al, 2008 ; Kyle et al, 2003 ; Paiva et al, 2008*). Aucun cas de MM à IgD ou IgE n'a été recensé parmi les patients recrutés. Enfin, pour 26% des cas, une absence de pic à l'EPS et la présence d'une PBJ dans les urines caractérisent un MM à chaînes légères. Cette distribution de la population étudiée en fonction de la nature de l'Ig monoclonale correspond à celle des nombreuses séries publiées dans la littérature (*Greipp et al, 2005 ; The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009 ; Pellat-Deceunynck et al, 1995*).

La répartition des chaînes légères κ et λ impliquées dans la protéine monoclonale est comparable à celle trouvée dans la littérature (*Kyle et al, 2003*), soit environ deux tiers des cas avec des chaînes légères κ et un tiers avec des chaînes de type λ , que ce soit dans le sang ou dans les urines.

▪ **Quantification de l'Ig monoclonale**

Les données concernant la quantification de l'Ig monoclonale ne concernent que trente-cinq patients parmi les cinquante de l'effectif total, puisque cette quantification se fait grâce au tracé densitométrique de l'EPS. La valeur médiane du pic à l'EPS, lorsqu'il est présent, est comparable à celle trouvée dans la série de *Greipp et al*, soit un peu moins de 40 g/L (*Greipp et al, 2005*).

▪ Dosage des chaînes légères libre sériques

Le dosage des CLL sériques a été réalisé chez vingt-deux patients. Le rapport $CLL\kappa/CLL\lambda$ est anormal (inférieur à 0,26 ou supérieur à 1,65) dans tous les cas (95% des cas selon la littérature) (*Dispenzieri et al, 2009 ; Snozek et al, 2008*), signant la monoclonalité.

1.4.2. Autres paramètres biochimiques

Les résultats des autres analyses biochimiques sont détaillés dans le tableau ci-après (Tableau XIII).

Comme attendu dans une population de patients atteints de MM, la **protidémie** est globalement élevée, avec une valeur médiane supérieure à la valeur normale supérieure (supérieure à 80 g/L). Elle est même supérieure à 100 g/L chez près d'un tiers des patients.

L'**albuminémie** est basse dans la majorité des cas, avec une valeur médiane proche de celle trouvée dans les séries publiées dans la littérature (autour de 36 g/L) (*Greipp et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Nowakowski et al, 2005 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009*). Elle est même inférieure à 35 g/L dans un tiers des cas (proportion sous-estimée en comparaison à certaines études où presque la moitié des patients a une albuminémie inférieure à cette valeur) (*Mateo et al, 2005 ; Sarasquete et al, 2005*).

Les **taux d'Ig physiologiques** sont diminués dans la grande majorité (90%) des cas, comme dans la série de Kyle *et al* (*Kyle et al, 2003*), témoignant du déficit de l'immunité humorale qui accompagne le MM.

18% de l'effectif est concerné par une atteinte de la fonction rénale, objectivée par une **créatininémie** supérieure à 175 mmol/L (20 mg/L), valeur seuil fixée par Durie et Salmon (*Durie & Salmon, 1975*). Ce chiffre est en accord avec ceux rapportés dans la littérature (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2005 ; San Miguel et al, 2006 ; Sarasquete et al, 2005*).

La **calcémie** est également un paramètre biologique majeur dans la prise en charge du MM, puisque l'ostéolyse induite par la tumeur myélomateuse peut être responsable d'une hypercalcémie. Dans notre population de cinquante patients, aucun cas d'hypercalcémie (calcémie supérieure à 110 mg/L soit 2,75 mmol/L) n'a été relevé au diagnostic. Cela va à l'encontre de plusieurs données publiées sur de larges séries, selon lesquelles plus de 13% des patients présentent au diagnostic de MM une hypercalcémie (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2005 ; San Miguel et al, 2006 ; Sarasquete et al, 2005*). La variabilité du stade de la maladie à l'inclusion des patients selon les études peut être une explication à cette discordance (plus d'hypercalcémies dans les stades avancés de MM). En outre,

force est de constater que les hypercalcémies s'observent de moins en moins fréquemment au diagnostic de MM, car celui-ci a lieu plus précocément dans l'histoire de la maladie. Notons également que la valeur médiane de la calcémie dans notre étude est tout à fait concordante avec celles trouvées dans la littérature (*Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009*).

Tableau XIII : Récapitulatif des paramètres biochimiques dans la population étudiée.

β_2m , β_2 -microglobuline ; CRP, *C reactive protein* (protéine C réactive) ; Ig, immunoglobulines ; LDH, lactate deshydrogénases.

		Médiane (min.-max.)	Nombre de patients	Pourcentage de patients
Protidémie	N=50	86 g/L (53-132)		
	> 80 g/L		28	56%
	> 100 g/L		14	28%
Albuminémie	N=50	38 g/L (16-52)		
	< 35 g/L		17	34%
	< 30 g/L		7	14%
Ig physiologiques	N=50			
	effondrées		37	74%
	atténuées		8	16%
	conservées		5	10%
Créatininémie	N=50	10,5 mg/L (6,5-112,7) soit 93 μ mol/L (57-996)		
	> 20,0 mg/L soit > 175 μ mol/L		9	18%
Calcémie	N=50	96 mg/L (78-109) soit 2,40 mmol/L (1,95-2,73)		
	> 110 mg/L soit > 2,75 mmol/L		0	0%
β_2m sérique	N=50	3,70 mg/L (1,23-135,00)		
	> 3,50 mg/L		26	52%
LDH	N=41	164 UI/L (91-563)		
	> 248 UI/L		9	22%
CRP	N=39	5,3 mg/L (0,2-164,4)		
	> 5,0 mg/L		20	51%
	> 50,0 mg/L		5	13%

La **β_2 m sérique**, paramètre biologique de grande valeur pronostique dans le MM, est supérieure à 3,50 mg/L (valeur seuil de l'ISS) (Greipp et al, 2005) dans plus de la moitié des cas, en accord avec les données de la littérature (Greipp et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Nowakowski et al, 2005). De même, les résultats obtenus pour les **LDH**, reflet de la prolifération tumorale, et la **CRP**, marqueur de l'activité du MM, correspondent à ce qui est rapporté dans la littérature (Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Nowakowski et al, 2005 ; San Miguel et al, 2006). Notons que ces deux paramètres n'ont pas été mesurés chez la totalité des cinquante patients de l'étude. En effet, ils ne sont plus guère utilisés en pratique clinique, du fait de leur manque de spécificité et de leur intérêt pronostique nettement moindre par rapport à celui de la β_2 m sérique.

1.4.3. Paramètres hématologiques

Les résultats des paramètres hématologiques (hémogramme et myélogramme) sont détaillés dans le tableau ci-après (Tableau XIV).

▪ **Hémogramme**

Plus de la moitié des patients de notre étude, comme dans d'autres séries plus importantes rapportées dans la littérature (Greipp et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2004 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009 ; Sarasquete et al, 2005), ont au diagnostic une valeur d'hémoglobine inférieure à 10,5 g/dL. L'anémie est plutôt modérée en intensité, puisque l'hémoglobine est inférieure à 12 g/dL dans plus de deux tiers des cas (The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003) mais inférieure à 8 g/dL dans seulement 12% des cas. Elle est normochrome normocytaire dans la grande majorité des cas, en rapport avec les principales étiologies de l'anémie associée au MM (inhibition de l'érythropoïèse, insuffisance de production du fait de l'envahissement médullaire, déficit en érythropoïétine du fait de l'atteinte rénale).

Au diagnostic, la fréquence de la thrombopénie est faible et en accord avec les données de la littérature (Kyle et al, 2003 ; Mateo et al, 2005). Il en est de même pour la leucopénie et la neutropénie (Kyle et al, 2003). Cela témoigne bien du fait que ces cytopénies apparaissent plutôt dans les stades tardifs et évolués de la maladie.

Le passage de cellules myélomateuses dans la circulation sanguine est un événement rare. Néanmoins, des plasmocytes sont présents dans le sang périphérique (observation du frottis sanguin coloré au MGG en microscopie optique) chez 20% des patients au diagnostic (15% selon San Miguel et

al, 2006). Notons que chez trois de ces patients, soit 6% de la population totale, les plasmocytes circulant représentent plus de 20% des leucocytes totaux ou plus de 2 G/L en valeur absolue, définissant des cas de leucémie à plasmocyte.

Tableau XIV : Récapitulatif des paramètres de l'hémogramme et du myélogramme dans la population étudiée.

		Médiane (min.-max.)	Nombre de patients	Pourcentage de patients
<u>Hémogramme</u>				
Hémoglobine	N=50	10,5 g/dL (5,3-15,8)		
		< 12 g/dL	35	70%
		< 8 g/dL	6	12%
		<i>normochromie</i>	50	100%
		<i>normocytose</i>	42	84%
		<i>macrocytose</i>	8	16%
Plaquettes	N=50	275 G/L (33-549)		
		< 150 G/L	5	10%
		< 100 G/L	2	4%
Leucocytes	N=50	6,57 G/L (1,45-23,90)		
		< 4,00 G/L	3	6%
		< 2,00 G/L	1	2%
Polynucléaires neutrophiles	N=50	4,03 G/L (0,44-19,60)		
		< 1,50 G/L	2	4%
Plasmocytes circulants	N=50			
		<i>présence</i>	10	20%
		> 20% et/ou > 2,00 G/L	3	6%
<u>Myélogramme</u>				
Plasmocytose	N=50	33% (6-94)		
		≥ 10%	42	84%

▪ Myélogramme

Globalement, la plasmocytose médullaire (évaluée morphologiquement par observation de frottis de moelle osseuse colorés au MGG en microscopie optique) est un peu plus faible dans notre étude par rapport à celles des séries de la littérature (valeur médiane entre 40 et 50%) (*Greipp et al, 2005 ; Kyle et al, 2003 ; Nowakowski et al, 2005*). La moelle osseuse contient 10% ou plus de plasmocytes dans 84% des cas, contre 95% dans la littérature (*The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2003*). Cela peut bien sûr s'expliquer par le petit effectif de notre étude comparé à celui des travaux cités précédemment, ainsi que par l'hétérogénéité de l'infiltrat plasmocytaire médullaire.

Notons bien que pour les huit patients ne répondant pas au critère de plasmocytose médullaire supérieure ou égale à 10%, le diagnostic de MM ne présente pas d'ambiguïté puisqu'il existe dans tous ces cas des lésions osseuses lytiques caractéristiques et/ou un composant monoclonal sérique supérieur à 30 g/L et/ou un composant monoclonal urinaire supérieur à 1 g/24h.

1.4.4. Cytogénétique

Les anomalies cytogénétiques sont recherchées par FISH, selon les recommandations de la littérature. Compte tenu du développement récent des connaissances de la cytogénétique du MM et de leur application en pratique clinique encore plus récente, tous les patients de l'étude n'ont pas bénéficié de la recherche de ces anomalies. La délétion du chromosome 13 a été recherchée chez seulement un tiers des patients, la délétion du chromosome 17 et la translocation (4;14) dans un peu plus de la moitié des cas (Tableau XV).

Tableau XV : Récapitulatif des résultats de cytogénétique (recherche d'anomalies par FISH) dans la population étudiée.

		<u>Présence de l'anomalie</u>	
		Nombre de patients	Pourcentage de patients
del13	N=15	7	47%
del17p	N=28	3	11%
t(4;14)	N=28	4	14%

On note que la recherche de del13 concerne une proportion plus faible de patients. En effet, cette anomalie s'est finalement révélée être d'un intérêt pronostique moindre par rapport à del17p et t(4;14), puisque les patients avec une del13 présentent généralement de façon associée une del17p ou une t(4;14) qui ont une valeur pronostique plus importante et qu'il est donc plus intéressant de rechercher. Malgré les petits effectifs de notre étude, la fréquence des anomalies cytogénétiques recherchées (Tableau XV) est tout à fait en accord avec les données publiées dans la littérature (Avet-Loiseau et al, 2007 ; Facon et al, 2001 ; Fonseca et al, 2004 ; Mateo et al, 2008 ; Paiva et al, 2009 ; Willems et al, 2005).

1.5. Suivi, traitements et survie

Les données chiffrées concernant le suivi, le traitement et la survie de la population étudiée sont récapitulées dans le tableau ci-après (Tableau XVI).

Notons qu'un des patient a été perdu de vue. Pour ce dernier, la survie et la réponse au traitement ne sont pas évaluables, ce qui nous ramène à un effectif de quarante-neuf patients pour l'évaluation de la survie, et quarante-six patients traités et suivis suffisamment longtemps pour pouvoir évaluer leur réponse au traitement.

Notre étude est handicapée par un suivi des patients relativement court (la médiane de suivi est seulement de 15 mois). Cela nous permet difficilement d'analyser la survie de notre population. Ainsi, la survie globale (OS) et la survie sans progression (PFS) sont globalement faibles, et très proches. Cela explique également la « petite » proportion de patients décédés au cours du suivi (16%, contre plus de 30% dans la littérature) (Mateo et al, 2008 ; Nowakowski et al, 2005 ; Paiva et al, 2008 ; Paiva et al, 2009).

Parmi les cinquante patients de l'étude, quarante-sept ont reçu un traitement « anti-MM ». Il s'agit des quarante-sept patients atteints de MM symptomatique. Les trois patients atteints de SMM n'ont pas reçu de traitement spécifique. Notons qu'aucun d'entre eux n'a progressé en MM symptomatique au cours de l'étude (développement d'une atteinte organique liée à la prolifération plasmocytaire maligne, critères « CRAB »), ce qui est attendu compte-tenu de la courte durée de suivi de ces patients (entre 9 et 13,5 mois) comparée au risque de progression (10% par an pour les cinq premières années, 3% par an pour les cinq années suivantes et 1% par an pour les dix ans suivants) (Swerdlow et al, 2008).

Parmi les patients traités, plus d'un tiers a bénéficié en première ligne d'un schéma thérapeutique « intensif » (intensification-autogreffe de CSH), destiné aux patients « jeunes » (moins de 65 ans). Les autres ont été traités selon les protocoles « standards ».

Un peu plus de 20% des patients traités ont bénéficié d'une deuxième voire d'une troisième ligne de traitement (pour cause de rechute de la maladie après la première ligne de traitement ou progression de la maladie au cours de la première ligne de traitement). Là encore, il s'agit d'une proportion faible en comparaison à ce qui est rapporté dans la littérature (plus de 60%) (*Mateo et al, 2008 ; Paiva et al, 2009*), attribuable à la courte durée de suivi des patients.

Il n'est pas évident de comparer les données relatives à la réponse au traitement dans la population étudiée par rapport à celles de la littérature. En effet, les réponses aux traitements dépendent beaucoup des critères d'inclusion des patients et des traitements utilisés (et donc des dates auxquelles les études ont été réalisées, puisque les thérapeutiques évoluent rapidement), de même que des critères utilisés pour évaluer la réponse. Néanmoins, le taux de RC observé dans notre population de quarante-six patients n'est pas discordant avec la récente publication d'Anderson *et al* qui estiment un taux de RC inférieur à 30-40%, même avec les nouvelles thérapeutiques (*Anderson et al, 2008*). Retenons également le taux de réponse globale pour notre étude (patients ayant atteint une RC, une TBRP ou une RP) qui est de 74%.

Tableau XVI : Récapitulatif des résultats concernant le suivi, le traitement et la survie de la population étudiée.

MP, maladie progressive ; MS, maladie stable ; OS, *overall survival* (survie globale) ; PFS, *progression free survival* (survie sans progression) ; RC, réponse complète ; RP, réponse partielle ; TBRP, très bonne réponse partielle.

	Médiane (min.-max.)	Nombre de patients	Pourcentage de patients
<u>Suivi</u>	15,0 mois (1,0-47,0)		
perdus de vue		1	2%
<u>Traitement du MM</u>		47	94%
Schémas thérapeutiques			
intensification-autogreffe		16	34%
autres		31	66%
Réponses			
RC		9	19%
TBRP		10	22%
RP		15	33%
MS/MP		12	26%
Nombre de ligne(s) de traitement			
1		35	76%
2		10	22%
3		1	2%
<u>Survie</u>			
PFS	7,5 mois (0,5-33,0)		
OS	8,0 mois (0,5-33,0)		
décès		8	16%

2. L'immunophénotypage plasmocytaire

Nous venons de voir que la population de cinquante patients sur laquelle porte notre travail correspond globalement (en ce qui concerne les paramètres clinico-biologiques utilisés en routine dans la prise en charge du MM) aux séries publiées dans la littérature. Nous allons à présent nous intéresser aux résultats de l'analyse phénotypique réalisée dans cette population et à leur interprétation. Certains cas particuliers seront discutés plus précisément dans la partie suivante (*cf* paragraphe 3.).

2.1. Prélèvements et identification des cellules à phénotyper

Les prélèvements pour l'immunophénotypage plasmocytaire ont été réalisés pour chacun des cinquante patients au diagnostic de la maladie. Il s'agit majoritairement de prélèvements de moelle osseuse (N=47). Néanmoins notons que l'analyse des plasmocytes par CMF a également été réalisée à partir d'autres types d'échantillons : du sang périphérique (N=2) et un liquide d'ascite (N=1) ; ces trois cas seront détaillés dans la partie suivante (*cf* paragraphe 3.).

Les prélèvements ont été réalisés dans le service clinique d'Hématologie Adulte selon les modalités décrites précédemment (*cf* -II- 1.2.1.) et les échantillons ont été acheminés au service d'Hématologie Biologique et traités comme précisé précédemment (*cf* -II- 1.2.2. et 3.).

Le repérage des cellules plasmocytaires est réalisé grâce à la combinaison de marqueurs CD38/CD138/CD45 (*cf* -II- 3.4.), considérée comme l'approche la plus efficace pour l'identification des cellules plasmocytaire en CMF (*cf* -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 3.4.1.) (*Davies et al, 2002 ; Lin et al, 2004 ; Rawstron et al, 2008*). Notons que la co-expression des antigènes CD19 et CD20 n'est trouvée dans aucun cas, excluant la possibilité d'une contamination par des cellules B dans l'analyse.

2.2. Phénotypes plasmocytaires obtenus dans la population étudiée

2.2.1. Validation biologique de la technique

Nous nous sommes intéressés à la sensibilité de la technique utilisée dans notre travail, autrement dit à la capacité de mettre en évidence un phénotype plasmocytaire anormal (expression ou non expression de certains marqueurs par rapport au phénotype de plasmocyte normal) chez un patient atteint de MM selon les critères de diagnostic consensuels internationaux (*Annexe 1*).

Si l'on considère les six marqueurs de malignité testés, l'immunophénotypage plasmocytaire est anormal pour quarante-neuf patients de la population (N=50) (« vrais positifs »). Un phénotype plasmocytaire correspondant au profil phénotypique physiologique du plasmocyte a été mis en évidence dans un cas (Tableau XVIII, phénotype n°17, patient n°46), qui remplissait par ailleurs sans ambiguïté les critères diagnostiques de MM (« faux négatif ») (ce cas sera rediscuté plus en détail ultérieurement, cf paragraphe 3.).

D'où une sensibilité de :

$$49/50 \times 100 = \mathbf{98\%}$$

Si l'on ne considère que les quatre principaux marqueurs de malignité (CD19/CD56/CD28/CD27), quarante-huit échantillons présentent un phénotype plasmocytaire aberrant (« vrais positifs »). Deux cas correspondent à un phénotype plasmocytaire normal (Tableau XIX, phénotype n°9', patients n°46 et 48), tout en remplissant sans ambiguïté les critères diagnostiques de MM (« faux négatif ») (ces cas seront détaillés dans la partie suivante, cf paragraphe 3.).

D'où une sensibilité de :

$$48/50 \times 100 = \mathbf{96\%}$$

Ces chiffres de sensibilité peuvent s'interpréter de la manière suivante : dans notre étude, 96 à 98% (selon les combinaisons de marqueurs de malignité retenues) de la population de patients atteints de MM présentent au diagnostic un phénotype plasmocytaire aberrant, distinct du phénotype du plasmocyte normal. Cette observation est en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs équipes rapportent, toujours selon les combinaisons de marqueurs utilisées, plus de 80% de phénotypes plasmocytaires aberrants dans des séries de patients avec un diagnostic de MM (*Almeida et al, 1999 ; Lin et al, 2004 ; Paiva et al, 2008 ; San Miguel et al, 2006*).

Notons que la spécificité de la technique n'a pas pu être estimée compte tenu du fait qu'aucun immunophénotypage plasmocytaire n'a été réalisé chez des patients non atteints de MM (le fait de répondre aux critères diagnostiques de MM est un critère d'inclusion dans l'étude).

2.2.2. Analyse marqueur par marqueur

L'expression (positivité ou négativité) par les cellules plasmocytaires des six marqueurs de malignité testés dans notre étude est reportée dans le tableau ci-après (Tableau XVII), pour l'ensemble des cinquante patients d'une part, et uniquement pour les trois patients atteints de SMM et les trois patients atteints de PCL d'autre part. Ces deux sous-ensembles de patients (SMM et PCL) seront détaillés plus précisément dans la partie suivante (cf paragraphe 3.). Néanmoins, pour ce qui concerne l'étude des phénotypes plasmocytaires dans la population étudiée (cf paragraphe 2.2.2. et suivants.), nous n'avons pas choisi d'exclure ces patients de la population totale, compte tenu du petit effectif qu'ils représentent et de notre volonté d'analyser les données phénotypiques obtenues dans leur globalité. Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas différencié dans cette partie les phénotypes obtenus en fonction du type d'échantillon (moelle osseuse, sang périphérique ou liquide d'ascite).

Tableau XVII : Expression des différents marqueurs de malignité dans la population étudiée, en comparaison aux données de la littérature.

En orange : profil d'expression aberrant par rapport à celui d'un plasmocyte normal.

* Bataille et al, 2006 ; Leleu, 2006 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Moreau et al, 2005 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Perez-Andres et al, 2006 ; Robillard et al, 1998 ; Robillard et al, 2003 ; Robillard et al, 2005b ; Sahara et al, 2006 ; San Miguel et al, 2006.

PCL, *plasma cell leukemia* (leucémie à plasmocytes) ; SMM, *smoldering myeloma* (myélome indolent ou asymptomatique).

		CD19		CD56		CD28		CD27		CD20		CD33	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tous patients N=50													
nombre de patients		3	47	36	14	20	30	31	19	6	44	7	43
pourcentage		6%	94%	72%	28%	40%	60%	62%	38%	12%	88%	14%	86%
SMM N=3													
nombre de patients		0	3	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2
pourcentage		0%	100%	67%	33%	67%	33%	67%	33%	67%	33%	33%	67%
PCL N=3													
nombre de patients		1	2	1	2	1	2	2	1	0	3	1	2
pourcentage		33%	67%	33%	67%	33%	67%	67%	33%	0%	100%	33%	67%
Séries publiées dans la littérature *		~	~	60	30	15	55	50	40	~	~	~	~
		5%	95%	à 70%	à 40%	à 45%	à 85%	à 60%	à 50%	20%	80%	20%	80%

L'analyse des phénotypes plasmocytaires obtenus pour notre population de cinquante patients montre une répartition des marqueurs de malignité CD19, CD56, CD28, CD27, CD20 et CD33 similaire à celle trouvée dans la littérature (synthèse des différentes études publiées, [Tableau XVII](#)). Cette observation valide techniquement la réalisation du phénotypage plasmocytaire dans le service d'Hématologie Biologique (CHU de Nancy).

2.2.3. Analyse par phénotype

La grande majorité des travaux publiés dans la littérature sur l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM rapporte les données phénotypiques en considérant chaque marqueur individuellement, comme ce que nous venons de voir dans le paragraphe précédent (*cf* [paragraphe 2.2.2.](#)). À notre connaissance, jusqu'à présent très peu d'études se sont intéressées au phénotype plasmocytaire dans sa globalité, ou même à des combinaisons de marqueurs. Pellat-Deceunynck *et al* ont rapporté les fréquences d'expression des différentes combinaisons des marqueurs CD19/CD56/CD40/CD28 (*Pellat-Deceunynck et al, 1994*). Notons que cette étude, relativement ancienne, porte sur un petit effectif de patients atteints de MM (N=31) et a été réalisée avec une technique de CMF deux couleurs. Sahara *et al* se sont intéressés à la combinaison des marqueurs de malignité CD19/CD56 dans un cas de MM (*Sahara et al, 2000*). Et plus récemment, Mateo *et al* ont analysé l'impact pronostique de la combinaison CD28/CD117 dans le MM (*Mateo et al, 2008*).

▪ **Hétérogénéité du profil phénotypique des cellules myélomateuses**

L'analyse des phénotypes plasmocytaires obtenus dans la population dans leur globalité, du moins en considérant l'ensemble des marqueurs de malignité étudiés, montre une grande hétérogénéité du profil phénotypique des cellules myélomateuses. En effet, nous avons observé dix-neuf phénotypes différents pour une population de cinquante patients ([Tableau XVIII](#)). Notons qu'en ne considérant que les quatre principaux marqueurs de malignité (CD19/CD56/CD28/CD27), on dénombre toujours pas moins de dix phénotypes plasmocytaires différents pour les cinquante échantillons analysés ([Tableau XIX](#)).

Cette caractéristique avait déjà été mise en évidence par plusieurs auteurs, le plus souvent en analysant les données phénotypiques marqueur par marqueur (*Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008*). D'une façon plus générale, il est reconnu que le MM est une pathologie très hétérogène. Une grande partie de cette hétérogénéité serait liée aux anomalies chromosomiques multiples survenant dans le MM (*Robillard et al, 2003*) et, comme cela a déjà évoqué (*Robillard et al, 2003*), notre

analyse suggère que le profil phénotypique des cellules myélomateuses pourrait également constituer une composante importante de l'hétérogénéité de la tumeur.

▪ **Identification de profils phénotypiques récurrents**

Malgré l'hétérogénéité des immunophénotypages plasmocytaires obtenus, nous nous sommes demandés s'il n'était pas possible d'identifier certains profils phénotypiques récurrents. Effectivement, en prenant en compte les six marqueurs de malignité étudiés, nous avons pu mettre en évidence trois phénotypes plasmocytaires qui représentent à eux trois plus de 50% des cas analysés (Tableau XVIII, phénotypes n°1 à 3, en bleu). Et lorsqu'on ne considère que les quatre principaux marqueurs de malignité (CD19/CD56/CD28/CD27), il est également possible d'identifier trois phénotypes plasmocytaires qui représentent à eux trois plus de 65% des cas (Tableau XIX, phénotypes 1' à 3', en violet).

Il serait ainsi possible d'envisager la délimitation de sous-groupes de patients en fonction du profil phénotypique des cellules myélomateuses et on peut imaginer que cette délimitation pourrait fournir des informations en rapport avec la biologie de la maladie et son pronostic.

Tableau XVIII : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés dans la population étudiée, avec les six marqueurs de malignité utilisés.

En bleu : les trois phénotypes les plus fréquemment observés.

	CD19	CD56	CD28	CD27	CD20	CD33	Nombre de patients <i>n° patients</i>	Pourcentage de patients (N=50)
1.	-	+	-	+	-	-	10 <i>n° 5, 15, 18, 20, 31, 32, 35, 40, 43, 50</i>	20%
2.	-	+	-	-	-	-	10 <i>n° 2, 4, 8, 12, 21, 22, 29, 30, 33, 41</i>	20%
3.	-	+	+	+	-	-	6 <i>n° 16, 17, 28, 34, 42, 47</i>	12%
4.	-	+	+	+	+	-	3 <i>n° 11, 27, 39</i>	6%
5.	-	+	+	-	-	-	3 <i>n° 19, 23, 37</i>	6%
6.	-	+	-	+	-	+	2 <i>n° 7, 45</i>	4%
7.	-	-	+	+	-	-	2 <i>n° 13, 26</i>	4%
8.	-	-	+	+	+	-	2 <i>n° 24, 38</i>	4%
9.	-	-	-	-	-	-	2 <i>n° 25, 49</i>	4%
10.	-	+	-	-	-	+	1 <i>n° 10</i>	2%
11.	-	+	+	+	-	+	1 <i>n° 44</i>	2%
12.	-	-	-	+	-	-	1 <i>n° 9</i>	2%
13.	-	-	-	+	-	+	1 <i>n° 14</i>	2%
14.	-	-	-	-	+	-	1 <i>n° 1</i>	2%
15.	-	-	+	-	-	-	1 <i>n° 36</i>	2%
16.	-	-	+	-	-	+	1 <i>n° 3</i>	2%
17.	+	-	-	+	-	-	1 <i>n° 46</i>	2%
18.	+	-	-	+	-	+	1 <i>n° 48</i>	2%
19.	+	-	+	+	-	-	1 <i>n° 6</i>	2%

Tableau XIX : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés dans la population étudiée, avec uniquement les quatre principaux marqueurs de malignité utilisés.

En violet : les trois phénotypes les plus fréquemment observés.

	CD19	CD56	CD28	CD27	Nombre de patients <i>n° patients</i>	Pourcentage de patients (N=50)
1'. <i>n° 5, 7, 15, 18, 20, 31, 32, 35, 40, 43, 45, 50</i>	-	+	-	+	12	24%
2'. <i>n° 2, 4, 8, 10, 12, 21, 22, 29, 30, 33, 41</i>	-	+	-	-	11	22%
3'. <i>n° 11, 16, 17, 27, 28, 34, 39, 42, 44, 47</i>	-	+	+	+	10	20%
4'. <i>n° 13, 24, 26, 38</i>	-	-	+	+	4	8%
5'. <i>n° 19, 23, 37</i>	-	+	+	-	3	6%
6'. <i>n° 1, 25, 49</i>	-	-	-	-	3	6%
7'. <i>n° 9, 14</i>	-	-	-	+	2	4%
8'. <i>n° 3, 36</i>	-	-	+	-	2	4%
9'. <i>n° 46, 48</i>	+	-	-	+	2	4%
10'. <i>n° 6</i>	+	-	+	+	1	2%

L'expression d'antigènes aberrants par les cellules plasmocytaires concourt au diagnostic de MM, puisqu'elle permet d'identifier avec certitude les cellules myélomateuses des plasmocytes normaux. L'immunophénotypage des cellules plasmocytaires permet de dégager les spécificités phénotypiques des cellules myélomateuses pour chaque patient. Idéalement, l'identification d'un profil phénotypique particulier pour chaque patient atteint de MM au diagnostic serait utile au suivi de la maladie, et permettrait notamment d'optimiser l'évaluation de la maladie résiduelle, de façon similaire à l'approche utilisée pour les leucémies aiguës. Cette perspective sera développée ultérieurement (cf -IV-).

2.3. Phénotype plasmocytaire et survie

Plusieurs groupes ont exploré les implications pronostiques des marqueurs phénotypiques des cellules myélomateuses. Malgré des résultats parfois hétérogènes (souvent du fait de petits effectifs de patients et/ou de la diversité des traitements), la valeur pronostique de l'expression aberrante ou de la perte de certains antigènes est affirmée par plusieurs études (*cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 3.2.*).

Dans le cadre de notre étude, nous avons également souhaité évaluer l'impact du phénotype plasmocytaire sur la survie des patients, à travers la survie sans progression (PFS), la survie globale (OS) et le nombre de décès survenus au cours du suivi. Nous avons donc analysé ces trois paramètres en fonction du phénotype plasmocytaire, en considérant d'une part chaque marqueur phénotypique individuellement, comme cela a été fait dans la majorité des études réalisées sur ce sujet, et d'autre part en considérant le phénotype plasmocytaire dans sa globalité (combinaison des six marqueurs étudiés). Les résultats sont récapitulés dans les tableaux XX et XXI respectivement.

▪ En considérant chaque marqueur phénotypique individuellement

Lorsque l'on considère chaque marqueur phénotypique individuellement (*Tableaux XX*), on peut observer une survie globale plus élevée chez les patients CD28⁻ par rapport aux patients CD28⁺ d'une part, et de même chez les patients CD27⁻ par rapport aux patients CD27⁺ d'autre part. L'association du phénotype CD28⁺ à une survie moindre est une donnée trouvée également dans l'étude de Mateo *et al*, portant sur une large série de patients atteints de MM (Mateo *et al*, 2008). Plusieurs autres travaux montrent d'ailleurs que l'expression de l'antigène CD28 par les cellules plasmocytaires se traduit par une expansion plus importante de la tumeur myélomateuse (Pellat-Deceunynck *et al* 1994 ; Rawstron *et al*, 2008 ; Robillard *et al*, 1998). En revanche, en ce qui concerne l'expression de l'antigène CD27, les données publiées dans la littérature ne vont pas dans le sens de notre étude, puisque c'est la perte de cet antigène qui serait liée à l'agressivité de la maladie, donc à un mauvais pronostic et non à une meilleure survie (Bataille *et al*, 2006 ; Moreau *et al*, 2005).

A part ces deux tendances, il ne ressort pas de nos résultats d'autre influence de l'expression ou de la perte de marqueurs phénotypiques sur la survie. Notre étude ne nous permet donc pas de retrouver l'association des phénotypes CD56⁻ et CD33⁺ avec une survie globale moindre par rapport aux phénotypes CD56⁺ et CD33⁻ respectivement (Mateo *et al*, 2008 ; Sahara *et al*, 2002). Ces données restent de toute façon à confirmer puisque, selon Robillard *et al*, le phénotype CD56⁻ n'influencerait

pas la survie des patients atteints de MM (*Robillard et al, 1998*) et l'association du phénotype CD33+ à une survie plus courte mise en évidence dans la série de Mateo *et al* n'est pas statistiquement significative (*Mateo et al, 2008*).

▪ **En considérant le phénotype plasmocytaire dans sa globalité**

Pour étudier l'impact du phénotype plasmocytaire global (combinaison des six marqueurs étudiés) sur la survie, nous avons choisi de séparer la population totale en quatre sous-groupes de patients selon le phénotype plasmocytaire au diagnostic, à savoir chacun des trois phénotypes les plus fréquents (Tableau XVIII, phénotypes n°1 à 3, en bleu) par rapport au reste des patients, c'est-à-dire tous les autres phénotypes (Tableau XVIII, phénotypes n°4 à 19, en noir). À notre connaissance, aucune étude publiée à ce jour n'a utilisé cette approche « par phénotype », à l'exception de Mateo *et al* qui ont analysé l'impact pronostique de la combinaison CD28/CD117 (*Mateo et al, 2008*).

On observe, pour les patients présentant les phénotypes n°1 (CD19- CD56+ CD28- CD27+ CD20- CD33-) et 2 (CD19- CD56+ CD28- CD27- CD20- CD33-), une tendance à une meilleure survie (PFS et OS plus élevées, et nombre de décès nul pour le groupe « phénotype n°2 ») par rapport au groupe « autres phénotypes » (Tableau XXI). En revanche, lorsque l'on compare les données obtenues pour les patients présentant le phénotype n°3 (CD19- CD56+ CD28+ CD27+ CD20- CD33-) à celle du groupe « autres phénotypes », aucune tendance particulière ne se dégage (Tableau XXI).

Au vu de ces résultats, il ressort donc peu d'informations quant à l'impact du phénotype plasmocytaire sur la survie des patients. Il est vrai que, comme nous l'avons dit précédemment, notre étude pêche par une durée de suivi trop courte qui atténue la valeur des paramètres utilisés (PFS, OS et nombre de décès).

2.4. Phénotype plasmocytaire et réponse au traitement

Dans le cadre de notre étude, comme pour la survie, nous avons évalué l'impact du phénotype plasmocytaire sur la réponse au traitement. Cette réponse est évaluée selon les critères de l'IMWG (*cf -I- Le myélome multiple, 8.2.*) récapitulés en annexe (Annexe 2). Nous avons retenu quatre catégories de réponses : réponse complète (RC), très bonne réponse partielle (TBRP), réponse partielle (RP) et une dernière catégorie regroupant les maladie stable et maladie progressive (MS/MP). Nous avons également dénombré les patients ayant bénéficié de deux lignes de traitement ou plus, c'est-à-dire les

patients dont la maladie a progressé au cours de la première ligne de traitement ou qui ont rechuté après la première ligne de traitement.

Ces paramètres sont analysés en fonction du phénotype plasmocytaire, en considérant comme précédemment, d'une part chaque marqueur phénotypique individuellement et d'autre part le phénotype plasmocytaire dans sa globalité (combinaison des six marqueurs étudiés).

Les résultats sont récapitulés dans les tableaux XX et XXI respectivement. Ils ne révèlent pas de différence de réponse au traitement en fonction du phénotype plasmocytaire, que l'on considère chaque marqueur individuellement ou le phénotype dans sa globalité (Tableaux XX et XXI).

Notre étude ne nous permet donc pas de retrouver certaines corrélations phénotype-réponse au traitement rapportées dans la littérature, notamment l'association de l'expression plasmocytaire de CD28 et de CD33 avec une résistance aux traitements (*Robillard et al, 1998 ; Sahara et al, 2006*).

En ce qui concerne l'analyse des réponses aux traitements, une des principales limites de notre étude réside dans le fait que, comme beaucoup d'autres travaux publiés dans la littérature, tous les patients inclus ne sont pas traités de façon uniforme (traitements standards, traitements intensifs ...). Malgré l'utilisation de critères de réponse bien définis, cela rend difficile voir ininterprétable l'analyse des réponses aux traitements dans la population étudiée.

Tableaux XX a et b : Réponses au traitement et survie de la population étudiée en fonction du profil d'expression des différents marqueurs de malignité.

N=46 : MM symptomatiques, traités ; patient perdu de vue exclu.

En orange : profil d'expression aberrant par rapport à celui d'un plasmocyte normal.

** progression de la maladie au cours de la première ligne de traitement ou rechute de la maladie après la première ligne de traitement.

MP, maladie progressive ; MS, maladie stable ; OS, *overall survival* (survie globale) ; PFS, *progression free survival* (survie sans progression) ; RC, réponse complète ; RP, réponse partielle ; TBRP, très bonne réponse partielle.

Pour des raisons de mise en page, ces résultats sont présentés en deux tableaux : a- Avec les marqueurs CD19, CD56 et CD28. b- Avec les marqueurs CD27, CD20 et CD33.

Tableau XX a.

		CD19		CD56		CD28	
		+	-	+	-	+	-
		N=3 (7%)	N=43 (93%)	N=34 (74%)	N=12 (26%)	N=19 (41%)	N=27 (59%)
<u>Réponses au traitement</u>							
RC							
nombre de patients		0	9	7	2	6	3
pourcentage		0%	21%	21%	17%	32%	11%
TBRP							
nombre de patients		2	8	6	4	4	6
pourcentage		67%	18%	18%	33%	21%	22%
RP							
nombre de patients		0	15	12	3	5	10
pourcentage		0%	35%	35%	25%	26%	37%
MS/MP							
nombre de patients		1	11	9	3	4	8
pourcentage		33%	26%	26%	25%	21%	30%
<u>≥ 2 lignes de traitement**</u>							
nombre de patients		0	11	8	3	2	9
pourcentage		0%	26%	24%	25%	11%	33%
<u>Survie</u>							
PFS							
médiane (min.-max.)		7,5 (3,5-33,0)	7,5 (0,5-32,0)	7,8 (0,5-32,0)	6,8 (2,5-33,0)	6,5 (0,5-32,0)	8,0 (1,0-33,0)
OS							
médiane (min.-max.)		7,5 (3,5-33,0)	8,0 (0,0-32,0)	7,8 (0,5-32,0)	9,8 (2,5-33,0)	6,5 (0,5-32,0)	11,5 (1,5-33,0)
Décès							
nombre de patients		1	7	6	2	3	5
pourcentage		33%	16%	18%	17%	16%	19%

Tableau XX b.

	CD27		CD20		CD33	
	+	-	+	-	+	-
	N=29 (63%)	N=17 (37%)	N=5 (11%)	N=41 (89%)	N=5 (11%)	N=41 (89%)
Réponses au traitement						
RC						
nombre de patients	6	3	1	8	1	8
pourcentage	21%	18%	20%	20%	20%	19%
TBRP						
nombre de patients	7	3	0	10	1	9
pourcentage	24%	18%	0%	24%	20%	22%
RP						
nombre de patients	9	6	2	13	2	13
pourcentage	31%	35%	40%	32%	40%	32%
MS/MP						
nombre de patients	7	5	2	10	1	11
pourcentage	24%	29%	40%	24%	20%	27%
≥ 2 lignes de traitement**						
nombre de patients	5	6	1	10	1	10
pourcentage	17%	35%	20%	24%	20%	24%
Survie						
PFS						
médiane (min.-max.)	6,5 (0,5-33,0)	8,0 (2,0-32,0)	6,5 (0,5-32,0)	7,5 (1,0-33,0)	8,0 (3,0-16,0)	7,5 (0,5-33,0)
OS						
médiane (min.-max.)	6,5 (0,5-33,0)	11,5 (2,0-32,0)	6,5 (0,5-32,0)	8,0 (1,5-33,0)	8,0 (3,0-22,0)	8,0 (0,5-33,0)
Décès						
nombre de patients	6	2	1	7	1	7
pourcentage	21%	12%	20%	17%	20%	17%

Tableau XXI : Réponses au traitement et survie de la population étudiée en fonction du phénotype plasmocytaire.

N=46 : MM symptomatiques, traités ; patient perdu de vue exclu.

* phénotypes décrits dans le tableau XVIII : phénotype 1. (CD19- CD56+ CD28- CD27+ CD20- CD33-), phénotype 2. (CD19- CD56+ CD28- CD27- CD20- CD33-) et phénotype 3. (CD19- CD56+ CD28+ CD27+ CD20- CD33-) sont les trois phénotypes les plus fréquents dans la population étudiée (en bleu) ; « autres phénotypes » regroupe les seize autres phénotypes, observés moins fréquemment dans la population étudiée.

** progression de la maladie au cours de la première ligne de traitement ou rechute de la maladie après la première ligne de traitement.

MP, maladie progressive ; MS, maladie stable ; OS, *overall survival* (survie globale) ; PFS, *progression free survival* (survie sans progression) ; RC, réponse complète ; RP, réponse partielle ; TBRP, très bonne réponse partielle.

	Phénotype 1.* N=10 (22%)	Phénotype 2.* N=10 (22%)	Phénotype 3.* N=6 (13%)	Autres phénotypes* N=20 (43%)
Réponses au traitement				
RC				
nombre de patients	1	2	2	4
pourcentage	10%	20%	33%	20%
TBRP				
nombre de patients	3	2	1	4
pourcentage	30%	20%	17%	20%
RP				
nombre de patients	3	4	2	6
pourcentage	30%	40%	33%	30%
MS/MP				
nombre de patients	3	2	1	6
pourcentage	30%	20%	17%	30%
≥ 2 lignes de traitement**				
nombre de patients	3	4	0	4
pourcentage	30%	40%	0%	20%
Survie				
PFS				
médiane (min.-max.)	9,0 mois (1,0-22,5)	11,5 mois (4,0-32,0)	6,0 mois (4,0-31,5)	6,3 mois (0,5-33,0)
OS				
médiane (min.-max.)	10,0 mois (1,5-31,0)	11,5 mois (6,0-32,0)	6,0 mois (4,0-31,5)	7,0 mois (0,5-33,0)
Décès				
nombre de patients	3	0	1	4
pourcentage	30%	0%	17%	20%

2.5. Phénotype plasmocytaire et anomalies cytogénétiques

Les plasmocytes myélomateux présentent, comme nous l'avons déjà évoqué, une grande hétérogénéité, et ce à la fois dans leurs caractéristiques phénotypiques, mais aussi dans leurs profils cytogénétiques (Mateo et al, 2005). Nous nous sommes demandé s'il était possible d'établir un lien entre la diversité phénotypique de ces cellules et la présence de caractéristiques cytogénétiques particulières.

Les résultats obtenus dans la population étudiée sont détaillés dans les tableaux XXII et XXIII.

Tableau XXII : Expression des différents marqueurs de malignité en fonction de la présence ou de l'absence des anomalies cytogénétiques del13, del17p et t(4;14).

En orange : profil d'expression aberrant par rapport à celui d'un plasmocyte normal.

		CD19		CD56		CD28		CD27		CD20		CD33	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
del13													
présente	N=7												
nombre de patients		0	7	5	2	2	5	3	4	0	7	1	6
pourcentage		0%	100%	71%	29%	29%	71%	43%	57%	0%	100%	14%	86%
absente	N=8												
nombre de patients		1	7	6	2	2	6	7	1	2	6	1	7
pourcentage		12%	88%	75%	25%	25%	75%	88%	12%	25%	75%	12%	88%
del17p													
présente	N=3												
nombre de patients		0	3	3	0	2	1	3	0	1	2	1	2
pourcentage		0%	100%	100%	0%	67%	33%	100%	0%	33%	67%	33%	67%
absente	N=25												
nombre de patients		1	24	17	8	11	14	15	10	2	23	3	22
pourcentage		4%	96%	68%	32%	44%	56%	60%	40%	8%	92%	12%	88%
t(4;14)													
présente	N=4												
nombre de patients		0	4	4	0	2	2	2	2	0	4	0	4
pourcentage		0%	100%	100%	0%	50%	50%	50%	50%	0%	100%	0%	100%
absente	N=24												
nombre de patients		2	22	17	7	11	13	17	7	3	21	3	21
pourcentage		8%	92%	71%	29%	46%	54%	71%	29%	13%	87%	13%	87%

Tableau XXIII : Récapitulatif des différents phénotypes plasmocytaires observés en fonction de la présence des anomalies cytogénétiques del13, del17p et t(4;14).

En bleu : phénotypes parmi les trois plus fréquemment observés avec les six marqueurs de malignité étudiés (Tableau XVIII).

En violet : phénotypes parmi les trois plus fréquemment observés avec uniquement les quatre principaux marqueurs de malignité étudiés (Tableau XIX).

Anomalie cytogénétique présente							Nombre de patients <i>n° patients</i>
	CD19	CD56	CD28	CD27	CD20	CD33	
<u>del13</u> N=7							
	-	+	-	+	-	-	2 <i>n° 5, 15</i>
	-	+	-	-	-	-	2 <i>n° 21, 41</i>
	-	+	+	+	-	-	1 <i>n° 16</i>
	-	-	-	-	-	-	1 <i>n° 49</i>
	-	-	+	-	-	+	1 <i>n° 3</i>
<u>del17p</u> N=3							
	-	+	-	+	-	-	1 <i>n° 31</i>
	-	+	+	+	+	-	1 <i>n° 27</i>
	-	+	+	+	-	+	1 <i>n° 44</i>
<u>t(4;14)</u> N=4							
	-	+	-	+	-	-	2 <i>n° 5, 20</i>
	-	+	+	-	-	-	2 <i>n° 19, 37</i>

Les résultats de notre travail ne suggèrent pas qu'il existe un marqueur phénotypique ou une combinaison de marqueurs spécifiques d'une anomalie cytogénétique (pour les six marqueurs phénotypiques étudiés et les trois anomalies cytogénétiques qui ont été recherchées dans le cadre de ce travail) (Tableaux XXII et XXIII).

Pourtant, Mateo *et al* ont mis en évidence une corrélation entre l'expression de l'antigène CD28 et la présence de la del17p dans une large série de patients atteints de MM (Mateo *et al*, 2008). La même équipe quelques années plus tôt avait également montré l'association du phénotype CD20- avec la

présence de réarrangements du gène des chaînes lourdes des Ig (locus 14q32) avec divers loci partenaires autres que 11q13, comme par exemple t(4;14) (Mateo *et al*, 2005). En outre, il a été mis en évidence une plus forte incidence de t(4;14) chez les patients de phénotype CD33+ par rapport au phénotype CD33- (Robillard *et al*, 2005b).

D'autres associations ont été rapportées ces dernières années dans la littérature, entre des marqueurs phénotypiques et des anomalies cytogénétiques autres que ceux/celles étudié(e)s dans notre travail. Ainsi, chez les patients de phénotype CD117- sont rapportées plus fréquemment del13 et des réarrangements du gène des chaînes lourdes des Ig comme t(4;14) et t(11;14) (Mateo *et al*, 2005 ; Mateo *et al*, 2008). De même t(11;14) est identifiée de façon plus fréquente chez les patients exprimant le marqueur CD20 que chez ceux ne l'exprimant pas, et chez les patients de phénotype CD56- par rapport aux patients CD56+ (Mateo *et al*, 2005 ; Robillard *et al*, 2003 ; Sahara *et al*, 2002). L'équipe de Mateo *et al* décrit également une association entre l'expression plasmocytaire de l'antigène CD28 et la présence de t(14;16) (Mateo *et al*, 2008). Enfin, il existerait une corrélation entre l'expression de CD221 et la présence de t(4;14) et de t(14;16) (Bataille *et al*, 2005).

Ainsi, au regard des données de la littérature, il semble bien qu'il existe un lien entre le phénotype plasmocytaire (déterminé par CMF) et la cytogénétique (par FISH) dans le MM. En ce qui concerne notre étude, les données de cytogénétique n'étant pas disponibles pour la totalité de la population étudiée, les effectifs réduits dont nous disposons nous permettent difficilement de mettre en évidence une quelconque association. Notons que les études de l'équipe de Mateo *et al* citées précédemment portent sur de larges séries de patients (plus de six cent patients atteints de MM) (Mateo *et al*, 2005 ; Mateo *et al*, 2008). En outre, il ne nous a pas été possible d'étudier tous les marqueurs phénotypiques ni toutes les anomalies cytogénétiques d'intérêt décrites dans la littérature.

Quoiqu'il en soit, en se basant sur les associations rapportées dans la littérature, il paraît concevable que l'hétérogénéité phénotypique observée dans le MM résulte de caractéristiques cytogénétiques particulières. D'ailleurs, des associations entre l'immunophénotypage des cellules malignes et les anomalies génétiques sous-jacentes ont déjà été observées dans d'autres hémopathies malignes (leucémies aiguës notamment). L'existence d'une relation entre les profils phénotypique et génétique offre un nouvel aspect de la biologie du MM. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les associations démontrées à ce jour ne sont pour la plupart pas suffisamment puissantes pour pouvoir considérer l'immunophénotypage comme un outil de *screening* au diagnostic des anomalies cytogénétiques chez les patients atteints de MM (Rawstron *et al*, 2008).

3. Analyses de cas particuliers

Comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises dans la partie précédente, certains cas rencontrés dans notre étude méritent une analyse particulière. Nous allons ainsi exposer et discuter successivement de :

- trois cas de MM asymptomatique (SMM),
- trois cas de leucémie à plasmocytes (PCL),
- un immunophénotypage plasmocytaire réalisé à partir d'un prélèvement de liquide d'ascite,
- des phénotypes de plasmocytes « normaux »,
- des profils phénotypiques obtenus au diagnostic et à la rechute de la maladie chez un même patient.

Trois cas de MM asymptomatique	
Patient n°1	CD19- CD56- CD28- CD27- CD20+ CD33-
Patient n°23	CD19- CD56+ CD28+ CD27- CD20- CD33-
Patient n°45	CD19- CD56+ CD28- CD27+ CD20- CD33+

L'expression des six marqueurs de malignités étudiés dans ce groupe de patients « SMM » est détaillée dans le tableau XVII. Notons que, compte tenu du petit effectif (N=3), il n'est pas possible de comparer les données phénotypiques obtenues (pourcentages d'expression des différents marqueurs) à celles rapportées dans la littérature, ni même, dans le cadre de notre étude, à celles du groupe de patients présentant un MM symptomatique.

Intéressons-nous maintenant au phénotype plasmocytaire dans sa globalité (combinaison des marqueurs de malignité). Bien que les profils phénotypiques des patients n°1 et 23 ne figurent pas parmi les plus fréquemment observés dans la population (Tableau XVIII, phénotypes n°14 et 5 respectivement ; Tableau XIX, phénotypes n°6' et 5' respectivement), on peut remarquer que le phénotype plasmocytaire du patient n°45 correspond à celui qui est le plus fréquemment mis en évidence si l'on considère les quatre principaux marqueurs de malignité étudiés (CD19/CD56/CD28/CD27) (Tableau XVIII, phénotype n°6 ; Tableau XIX, phénotype n°1', en violet).

Globalement, il apparaît que les phénotypes des patients présentant un SMM présentent la même hétérogénéité que les phénotypes plasmocytaires de la population étudiée (Tableaux XVIII et XIX).

En d'autres termes, il ne semble pas exister de phénotype plasmocytaire spécifique du stade de SMM. D'ailleurs, nous n'avons pas trouvé, dans la littérature, de données suggérant une telle particularité.

Trois cas de leucémie à plasmocytes	
Patient n°36	CD19- CD56- CD28+ CD27- CD20- CD33-
Patient n°48	CD19+ CD56- CD28- CD27+ CD20- CD33+
Patient n°50	CD19- CD56+ CD28- CD27+ CD20- CD33-

Précisons que, pour ces trois patients, les plasmocytes circulant dans le sang périphérique représentent au diagnostic plus de 20% des leucocytes totaux et/ou plus de 2 G/L (Tableau XXIV), ce qui correspond à la définition de leucémie à plasmocytes primaire ou *de novo*, considérée comme une forme particulière de MM.

Notons également que parmi ces trois cas, deux immunophénotypages plasmocytaires ont été réalisés à partir d'échantillons de sang périphérique (patients n°36 et 50). Pour le patient n°48, les analyses par CMF ont été faites à partir d'un prélèvement de moelle osseuse.

Tableau XXIV : Récapitulatif des plasmocytoses périphériques et médullaires des trois patients présentant une leucémie à plasmocytes.

	Patient n°36	Patient n°48	Patient n°50
<u>Sang périphérique</u>			
leucocytes	2,70 G/L	8,69 G/L	23,9 G/L
plasmocytes circulants			
pourcentage des leucocytes	20%	30%	91%
valeur absolue	0,54 G/L	2,61 G/L	21,75 G/L
<u>Moelle osseuse</u>			
plasmocytose	50%	37%	94%

L'expression des six marqueurs de malignité étudiés dans ce groupe de patients « PCL » est détaillée dans le tableau XVII. Pour la même raison que celle évoquée précédemment pour les patients présentant un SMM (effectif réduit, N=3), il n'est pas possible de comparer les données phénotypiques obtenues (pourcentages d'expression des différents marqueurs) à celles rapportées

dans la littérature, ni même, dans le cadre de notre étude, à celles du groupe de patients présentant un MM « non PCL ».

En outre, de la même manière que pour le groupe de patients « SMM », on observe que les profils phénotypiques globaux des patients n°36 et 48 ne figurent pas parmi les plus fréquemment observés dans la population (Tableau XVIII, phénotypes n°15 et 18 respectivement ; Tableau XIX, phénotypes n°8' et 9' respectivement). En revanche, le phénotype plasmocytaire du patient n°50 correspond à celui qui est le plus fréquemment mis en évidence (Tableau XVIII, phénotype n°1, en bleu ; Tableau XIX, phénotype n°1', en violet).

Globalement, d'après les résultats de notre travail, il ne semble pas se dégager un phénotype plasmocytaire particulier des PCL. Mais n'oublions pas que, du fait du schéma de notre étude et de la rareté de cette entité, l'effectif étudié est très réduit et donc pas forcément représentatif. Cette observation est donc à relativiser.

Dans la littérature, relativement peu d'études ont été publiées récemment sur ce sujet, et aucune d'entre elles ne porte sur de grandes séries de patients (parmi les publications de ces dix dernières années, la plus grande étude est celle de Colovic *et al* avec un effectif de trente patients) (Colovic *et al*, 2008). Néanmoins, plusieurs données montrent l'existence de particularités phénotypiques dans la PCL, par rapport au MM (« non PCL »).

Citons en premier lieu une expression plus fréquente des marqueurs B CD19 et CD20 dans la PCL par rapport au MM (Colovic *et al*, 2008 ; Costello *et al*, 2001 ; Garcia-Sanz *et al*, 1999 ; Johnson *et al*, 2006). Dans notre étude, on observe l'expression de CD19 dans un cas parmi les trois PCL ; l'antigène CD20 n'est exprimé dans aucun cas.

D'autre part, s'il existe une surexpression de CD56 par les cellules plasmocytaires au diagnostic de MM (dans presque 70% des cas, cf -I- L'immunophénotypage plasmocytaire, 2.) (Bataille *et al*, 2006 ; Lin *et al*, 2004 ; Mateo *et al*, 2005 ; Mateo *et al*, 2008 ; Ocqueteau *et al*, 1998 ; Perez-Andres *et al*, 2005 ; Robillard *et al*, 1998 ; San Miguel *et al*, 2006), la plupart des PCL (plus de 80% des cas) sont de phénotype CD56- (Colovic *et al*, 2008 ; Costello *et al*, 2001 ; Garcia-Sanz *et al*, 1999 ; Guieze *et al*, 2005 ; Johnson *et al*, 2006). Un lien a effectivement été défini entre la perte de cet antigène et la dissémination extra-médullaire des cellules myélomateuses (Pellat-Deceunynck *et al*, 1994 ; Pellat-Deceunynck *et al*, 1998), et même avec le nombre de plasmocytes circulants (Rawstron *et al*, 1999). CD56 est une molécule d'adhésion impliquée dans le phénomène de croissance axonale. Dans le MM, elle jouerait un rôle dans le *homing* et la

circulation des cellules malignes, comme pour les cellules normales durant l'embryogénèse. En fait, la molécule CD56 permettrait l'adhésion des cellules plasmocytaires malignes au micro-environnement médullaire (composants cellulaires et de la matrice extra-cellulaire). Les cellules CD56- seraient donc capables de s'échapper de la niche médullaire. Autrement dit, lorsqu'elles perdent l'expression de CD56, les cellules myélomateuses acquièrent une grande propension à circuler dans le sang périphérique, au lieu de s'accumuler dans la moelle osseuse.

Parmi les trois cas de PCL que nous avons étudiés dans notre travail, deux présentent effectivement un phénotype CD56-. Et sur ces deux cas, un immunophénotypage a été réalisé à partir d'un échantillon de sang périphérique (patient n°36), et l'autre (patient n°48) à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Cela est en accord avec l'étude de Pellat-Deceunynck *et al*, selon laquelle les cellules de PCL sont caractérisées par un phénotype CD56-, dans la moelle osseuse comme dans le sang périphérique (Pellat-Deceunynck *et al*, 1998).

L'antigène CD28, marqueur lymphocytaire T, est une molécule impliquée dans les interactions entre cellules B et T. Selon les études, 15 à 45% des cas de MM expriment CD28 (Mateo *et al*, 2005 ; Mateo *et al*, 2008 ; Ocqueteau *et al*, 1998 ; Pellat-Deceunynck *et al*, 1994 ; Rawstron *et al*, 2008 ; Robillard *et al*, 1998 ; San Miguel *et al*, 2006) et parmi les PCL, l'expression de CD28 permettrait de distinguer les formes secondaires (dans le cadre de l'évolution d'un MM), majoritairement CD28+, des formes primaires ou *de novo* (dont il est question ici), qui n'expriment ce marqueur que dans un tiers des cas (Pellat-Deceunynck *et al*, 1998 ; Robillard *et al*, 1998). Parmi les trois PCL de notre étude, deux présentent un phénotype CD28-.

Ainsi, malgré le peu de données sur le sujet et bien que notre travail ne mette en évidence aucune particularité, la littérature décrit des caractéristiques phénotypiques propres à la PCL, par rapport au MM. Les principales différences phénotypiques entre les deux présentations de la maladie concernent des molécules impliquées dans les interactions entre les plasmocytes et le micro-environnement médullaire, comme CD56 (Paiva *et al*, 2010), ainsi que des molécules de co-stimulation, comme CD28, et de présentation de l'antigène (Perez-Andres *et al*, 2005).

Un immunophénotypage plasmocytaire réalisé à partir d'un prélèvement de liquide d'ascite	
Patient n°7	CD19- CD56+ CD28- CD27+ CD20- CD33+

Le patient n°7 correspond à un cas très particulier puisque l'immunophénotypage plasmocytaire a été réalisé à partir d'un prélèvement de liquide d'ascite (le patient présentait, dans le cadre de son MM, une ascite exsudative). La plasmocytose dans cet échantillon s'élève à 64%.

Le phénotype obtenu est détaillé ci-dessus. Il correspond au phénotype trouvé le plus fréquemment dans la population lorsque l'on considère uniquement les quatre principaux marqueurs de malignité étudiés (CD19/CD56/CD28/CD27) (Tableau XVIII, phénotype n°6 ; Tableau XIX, phénotype n°1', en violet).

Il s'agit là d'un cas de MM avec un envahissement extra-médullaire. Pourtant, les cellules plasmocytaires analysées par CMF expriment la molécule d'adhésion CD56, ce qui n'était pas attendu puisque comme nous l'avons abordé pour les cas de PCL, c'est la perte de CD56 qui permet aux cellules myélomateuses de s'échapper de la niche médullaire pour disséminer dans l'organisme via le sang périphérique (*Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Pellat-Deceunynck et al, 1998*).

En fait, l'expression de CD56 semble être sous le contrôle de mécanismes de régulation complexes. Cette molécule d'adhésion serait réprimée durant la migration des cellules, puis ré-exprimée lorsque celles-ci atteignent un site spécifique ou un organe cible (*Raja et al, 2010*). Plus précisément, *Pellat-Deceunynck et al* se sont intéressés au phénotype de plasmocytes malins ayant migré au niveau de la cavité péritonéale, chez des patients présentant un MM. Leurs observations indiquent que les cellules myélomateuses localisées dans la cavité péritonéale expriment CD56 et ont une forte activité proliférative (*Pellat-Deceunynck et al, 1994 ; Pellat-Deceunynck et al, 1998*). Ainsi, on peut supposer que les cellules myélomateuses, au niveau médullaire, perdent l'expression de CD56 ce qui leur permet de disséminer via le sang périphérique (où elles sont toujours CD56-), jusqu'à atteindre des sites cibles extra-médullaires qu'elles envahissent, tout en ré-exprimant CD56.

Des phénotypes de plasmocytes « normaux »	
Patient n°46	CD19+ CD56- CD28- CD27+ CD20- CD33-
Patient n°48	CD19+ CD56- CD28- CD27+ CD20- CD33+

Précédemment (cf paragraphe 2.2.1.), nous avons déterminé la sensibilité de la technique d'immunophénotypage plasmocytaire utilisée dans notre travail, c'est-à-dire sa capacité à mettre en évidence un phénotype plasmocytaire anormal (expression ou non expression de certains marqueurs par rapport au phénotype de plasmocyte normal) chez un patient atteint de MM selon les critères de diagnostic consensuels internationaux. La sensibilité dépend du nombre de marqueurs phénotypiques pris en compte. Elle est respectivement de 98 ou 96% selon que l'on considère respectivement la totalité des six marqueurs étudiés ou seulement les quatre principaux. Le fait qu'elle n'atteigne pas 100% témoigne de l'existence de « faux positifs », c'est-à-dire de cas de MM avérés (remplissant sans ambiguïté les critères diagnostiques de MM) présentant un phénotype plasmocytaire non différent de celui de plasmocytes normaux.

Nous avons effectivement identifié dans notre étude un patient correspondant à ce cas de figure (Tableau XVIII, phénotype n°17, patient n°46). Un deuxième cas peut être discuté. Il s'agit d'un patient présentant un profil d'expression normal pour la combinaison des quatre principaux marqueurs de malignité étudiés (CD19/CD56/CD28/CD27) (Tableau XIX, phénotype n°9', patient n°48). Mais lorsque l'on prend en compte la totalité des marqueurs étudiés, on peut s'apercevoir que les cellules myélomateuses de ce patient présentent bien un phénotype malin puisqu'elles expriment de façon aberrante l'antigène myéloïde CD33 (les plasmocytes normaux sont CD33-) (Tableau XVIII, phénotype n°18, patient n°48).

Notons bien, comme nous l'avons déjà mentionné, que ces deux patients remplissent sans ambiguïté les critères diagnostiques usuels et consensuels de MM (Tableau XXV).

Tableau XXV : Critères diagnostiques et caractéristiques du myélome (type et classification) pour les patients n°46 et 48 (phénotypes plasmocytaires « normaux »).

EPS, électrophorèse des protéines sériques ; IF, immunofixation ; Ig, immunoglobuline ; ISS, *international staging system*.

	Patient n°46	Patient n°48
<u>Critères diagnostiques</u>		
plasmocytose médullaire	19%	37%
Ig monoclonale sérique (EPS/IF)		
type	IgGκ	IgGλ
quantification	72 g/L	70 g/L
critère(s) « CRAB »	anémie (hémoglobine < 10 g/dL)	lésions osseuses
<u>Classification</u>		
Durie et Salmon	IIIA	IIIA
ISS	II	III

Ainsi il existe, selon les résultats de notre travail, une petite proportion de patients (respectivement 2 ou 4% de la population selon que l'on prend en compte les six marqueurs de malignité étudiés ou seulement les quatre principaux) présentant un MM avéré mais dont le phénotype plasmocytaire n'est pas différent de celui d'un plasmocyte normal.

Cette observation est confirmée par d'autres études publiées dans la littérature. Ainsi Sahara *et al* ont décrit un cas de MM dont l'analyse des plasmocytes en CMF trois couleurs montre un phénotype CD19+/CD56- (Sahara *et al*, 2000), pourtant considéré comme caractéristique des plasmocytes normaux et jamais observé sur des cellules myélomateuses (Pellat-Deceunynck *et al*, 1994). En outre, selon les travaux de plusieurs équipes portant sur de plus vastes séries de patients, 10 à 15% des cas de MM (selon les combinaisons de marqueur utilisées) ne présentent pas d'aberration phénotypique (Almeida *et al*, 1999 ; Lin *et al*, 2004 ; Paiva *et al*, 2008 ; San Miguel *et al*, 2006).

L'existence de cellules myélomateuses présentant un phénotype non différent de celui des plasmocytes normaux ne pose *a priori* pas de problème diagnostique puisque, comme nous l'avons remarqué, dans la plupart des cas le diagnostic de MM repose sur plusieurs autres critères bien établis et n'est pas remis en cause. L'analyse phénotypique des plasmocytes concourt certes au diagnostic de MM, mais n'y est indispensable que dans des cas particuliers.

En revanche, l'intérêt de la CMF pour le suivi de la maladie est de pouvoir détecter et quantifier de faible taux de plasmocytes malins résiduels parmi les plasmocytes normaux (reconstitution de l'immunité normale), ce qui devient impossible si l'on ne peut pas différencier phénotypiquement les cellules myélomateuses du compartiment plasmocytaire physiologique. Néanmoins, ces cas sont tout de même peu fréquents, et l'utilisation de marqueurs phénotypiques supplémentaires augmente la probabilité de mettre en évidence une (ou plusieurs) aberration(s) sur les cellules malignes par rapport aux plasmocytes normaux, de même que l'évaluation de la clonalité permet de mettre en évidence une population de plasmocytes monoclonaux bien que sans aberration phénotypique. Cet aspect sera détaillé ultérieurement (*cf -IV-*).

Un cas de MM à IgM	
Patient n°25	CD19- CD56- CD28- CD27- CD20- CD33-

Le patient n°25 présente un MM dont le composant monoclonal est de type IgM. Il s'agit d'une entité très rare (moins de 0,5% des MM) (*Feyler et al, 2008 ; Kyle et al, 2003 ; Paiva et al, 2008*), susceptible de poser un problème de diagnostic différentiel puisqu'elle représente moins de 0,2% des gammopathies monoclonales à IgM (*Feyler et al, 2008*). En effet, une protéine monoclonale de type IgM s'observe beaucoup plus fréquemment dans un contexte de maladie de Waldenström (MW), ou dans d'autres pathologies prolifératives lymphoïdes B.

Le MM à IgM partage des caractéristiques cliniques communes avec la MW, comme une asthénie, souvent liée à un syndrome anémique, la survenue d'un syndrome d'hyperviscosité, lié à la présence de l'Ig pentamérique, ou encore des lymphadénopathies ou une hépatosplénomégalie (*Swerdlow et al, 2008*). Les critères de diagnostic de la MW (ou macroglobulinémie) comprennent la mise en évidence d'une protéine monoclonale de type IgM associée à une infiltration médullaire lymphoplasmocytaire, composée de petits lymphocytes avec des lymphoplasmocytes et/ou des plasmocytes en nombre variable, à hauteur de 10% ou plus des cellules nucléées (*Kyle & Rajkumar, 2009 ; Swerdlow et al, 2008*). On se rend bien compte qu'en l'absence de caractéristiques cliniques ou même parfois morphologiques vraiment typiques de l'une ou l'autre de ces deux entités, il peut être difficile de faire la distinction entre MM à IgM et MW. Ainsi, d'autres outils peuvent être nécessaires pour poser de façon certaine le diagnostic de MM à IgM, d'autant plus que MM à IgM et MW sont deux pathologies qui n'évoluent pas de la même manière et ne nécessitent pas la même prise en charge. En effet, si la MW évolue plutôt sur un mode indolent avec une survie médiane de 5 à 10 ans, le MM à IgM est associé à un pronostic plus sombre avec une évolution plus péjorative comparée aux MM à IgG ou IgA, et nécessite une prise en charge particulière (*Raja et al, 2010*).

L'immunophénotypage des cellules malignes est utilisé pour le diagnostic de MW afin d'exclure toute autre pathologie lymphoproliférative (notamment leucémie lymphoïde chronique et lymphome du manteau) (*Kyle & Rajkumar, 2009 ; Swerdlow et al, 2008*). Comme nous allons le voir, il peut être aussi d'une grande utilité pour distinguer MW et MM à IgM.

L'expression du marqueur plasmocytaire CD138 peut être un bon critère de diagnostic différentiel, puisque cet antigène est fortement exprimé par les cellules myélomateuses, mais habituellement pas par les cellules lymphoplasmocytaires de MW. Néanmoins, le profil d'expression de CD138 peut dans certains cas de MW être identique à celui des cellules myélomateuses. En effet, la cellule à l'origine de la MW serait une cellule B post-folliculaire, acquérant une différenciation plasmocytaire (*Swerdlow et al, 2008*). Notons également que l'expression de l'antigène CD38 est variable dans la MW (*Swerdlow et al, 2008*).

La discrimination entre cellules myélomateuses et cellules malignes de MW repose plus sûrement sur l'expression des marqueurs B CD19 et CD20 (*Raja et al, 2010*). En effet, les plasmocytes malins de MM sont pour la grande majorité CD19-/CD20-. Certains conservent l'expression de l'un ou l'autre de ces marqueurs B (moins de 5% des cas de MM sont CD19+ mais 20% peuvent exprimer le CD20) (*Bataille et al, 2006 ; Lin et al, 2004 ; Mateo et al, 2005 ; Mateo et al, 2008 ; Ocqueteau et al, 1998 ; Robillard et al, 1998 ; Robillard et al, 2003 ; San Miguel et al, 2006*), mais la co-expression de ces deux marqueurs B CD19 et CD20 n'est observée dans aucun cas de MM (*Lin et al, 2004*). En revanche, les cellules malignes de MW sont caractérisées par un profil phénotypique de cellules B CD19+/CD20+ (*Swerdlow et al, 2008*).

Une étude récente de dix cas de MM à IgM analysés en CMF et immunohistochimie montre que cette entité est caractérisée par un profil phénotypique CD20-/CD56-/CD117-, les autres antigènes testés présentant une expression plus variable (60% des cas sont CD19- et 2 tiers sont CD27+) (*Feyler et al, 2008*). Notons tout de même que pour un patient parmi les dix, les cellules myélomateuses expriment l'antigène CD20 ; mais dans ce cas le CD19 n'est pas exprimé (*Feyler et al, 2008*).

En ce qui concerne notre travail, le profil phénotypique du patient n°33 est détaillé ci-dessus. Ce patient présente une gammapathie monoclonale à IgM associée entre autre, sur le plan clinique, à un syndrome d'hyperviscosité important, mais sans lésions osseuses ni atteinte rénale. Le résultat de l'immunophénotypage est en accord avec les caractéristiques phénotypiques d'un MM et non d'une MW, puisque les cellules n'expriment aucun des deux marqueurs B CD19 ou CD20. L'analyse phénotypique a permis dans ce cas de poser avec certitude le diagnostic de MM à IgM, alors que la présentation clinique ne montrait aucune caractéristique spécifique de MM par rapport à une MW et que l'évaluation morphologique du myélogramme ne permettait pas non plus d'affirmer la nature myélomateuse de l'infiltration médullaire (morphologie plasmocytaire et lymphoplasmocytaire). L'évolution de ce MM à IgM a été rapidement défavorable puisque les différentes (trois) lignes de traitements mises en place n'ont pas permis d'obtenir une meilleure réponse qu'une stabilité de la

maladie, et le patient est décédé quelques mois après que le diagnostic n'ait été posé (PFS 4 mois ; OS 6 mois).

Ce cas et les données de la littérature exposées précédemment montrent bien que l'utilisation de l'immunophénotypage constitue ainsi un outil diagnostique permettant d'établir une distinction claire indispensable entre MM à IgM et MW.

A propos de profils phénotypiques obtenus au diagnostic et à la rechute de la maladie	
Patient n°33	CD19- CD56+ CD28- CD27- CD20- CD33-

Le patient n°33 a, comme la totalité des patients de notre étude, bénéficié d'un immunophénotypage plasmocytaire au diagnostic de la maladie. Le profil phénotypique obtenu est l'un des plus fréquemment observés dans la population étudiée (Tableau XVIII, phénotype n°2 ; Tableau XIX, phénotype n°2). Malgré l'obtention d'une très bonne réponse partielle suite à la première ligne de traitement, ce patient a présenté une rechute précoce de sa maladie (PFS 4 mois).

Comme lors du diagnostic, un immunophénotypage plasmocytaire à partir d'un prélèvement de moelle osseuse a été réalisé au moment de la rechute. Le profil phénotypique obtenu alors est identique à celui du diagnostic, pour les six marqueurs analysés. Autrement dit, le phénotype des cellules myélomateuses n'a été modifié ni par l'évolution de la maladie ni par le traitement.

Cette observation est en accord avec celles de Lin *et al*, qui montrent que l'immunophénotypage des cellules myélomateuses n'est pas différent entre les patients traités et non traités (Lin *et al*, 2004), suggérant une conservation de l'expression d'antigènes aberrants malgré les traitements. Les auteurs se sont également demandés si le profil phénotypique restait stable dans le temps pour un même patient, mais ont considéré que le nombre de cas dont ils disposaient était insuffisant pour pouvoir répondre à cette question (Lin *et al*, 2004).

Néanmoins, l'incidence similaire de l'expression des marqueurs phénotypiques entre patients traités et non traités donne tout son sens à la détermination de l'immunophénotypage plasmocytaire au diagnostic de MM et à son utilisation dans le suivi de la maladie, notamment pour l'évaluation de la maladie résiduelle.

4. Limites

Nous avons déjà discuté (*cf* paragraphe 2.) des limites de notre travail **liées au schéma de l'étude**, à savoir un effectif dans certains cas trop réduit pour être représentatif et une durée de suivi trop courte pour pouvoir exploiter pleinement les données relatives à la survie des patients.

L'utilisation d'une technique de CMF permet, par comparaison aux techniques de microscopie de fluorescence, de déterminer des profils phénotypiques avec une grande sensibilité et spécificité, puisque l'analyse porte sur un très grand nombre de cellules, avec plusieurs marqueurs testés concomitamment, et donne une évaluation de l'intensité de fluorescence. Néanmoins, l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF comporte certaines limites, principalement **liées à la nature des cellules et des prélèvements analysés**.

Les plasmocytes sont des cellules « fragiles », pour lesquelles la « congélation/décongélation » est impossible. Il convient donc, comme nous l'avons décrit (*cf* -II- 1.2.2.), d'acheminer et de traiter les échantillons dans les meilleurs délais et de les maintenir à température ambiante (20°C). Notons que certains auteurs ont décrit une perte de l'antigène CD138 (marqueur de repérage des plasmocytes) par les cellules conservées dans un environnement froid, ou lorsque le traitement du prélèvement est retardé (*Lin et al, 2004*).

Un autre facteur limitant est le pourcentage de cellules plasmocytaires dans le prélèvement destiné aux analyses de CMF. Comme nous l'avons précisé dans la partie précédente (*cf* -II- 1.2.2.), la plasmocytose limite pour la réalisation de l'immunophénotypage plasmocytaire par notre technique est de 3%. Cela peut donc poser un problème dans les cas de très faible plasmocytoses, d'autant plus qu'il faut tenir compte du facteur « hémodilution » (pour un prélèvement médullaire, le pourcentage de cellules plasmocytaires dans l'échantillon destiné à la CMF est plus faible que dans celui destiné à l'évaluation morphologique). Néanmoins, des plasmocytoses inférieures à 3% sont rares au diagnostic. De plus, le développement de la CMF multiparamétrique (plus de trois ou quatre couleurs) va permettre d'augmenter la sensibilité des techniques (cette perspective sera développée dans la partie suivante, *cf* -V-). Pour s'affranchir du facteur « hémodilution » (des prélèvements médullaires), il pourra être judicieux d'associer aux marqueurs phénotypiques testés des marqueurs de repérage des précurseurs myéloïdes (CD34 et CD117), afin d'exprimer les résultats sous forme de ratio des « plasmocytes/précurseurs myéloïdes » (*cf* -IV-).

Finalement, ces paramètres ne nous ont pas posé de difficultés dans notre travail, étant donné que l'immunophénotypage plasmocytaire était réalisé au diagnostic de la maladie. Ils sont en revanche susceptibles d'avoir un impact plus important lorsque la CMF est utilisée dans le suivi de la maladie (évaluation de la réponse au traitement et de la maladie résiduelle, *cf* -IV-).

- IV -

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'immunophénotypage des cellules malignes par CMF est largement utilisé et recommandé selon des référentiels bien établis, pour le diagnostic et la prise en charge des hémopathies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs. En revanche, dans les pathologies de la lignée plasmocytaire, l'exploration du phénotype est relativement récente et encore peu utilisée en pratique courante.

Une revue attentive des travaux publiés depuis une quinzaine d'années montre des disparités quant au phénotype exact des plasmocytes et leur signification clinique en pathologie. Ces controverses sont souvent dues à des problèmes méthodologiques, comme des effectifs insuffisants, l'utilisation de différents clones d'anticorps monoclonaux, de fluorochromes différents, de procédures de CMF deux ou trois couleurs qui ne permettent pas une bonne identification des cellules à analyser...

Mais malgré tout, les caractéristiques phénotypiques des plasmocytes (physiologiques et pathologiques) sont aujourd'hui relativement bien établies. Ces dernières années, les études se multiplient sur de larges séries de patients. Les pratiques s'uniformisent, avec la publication de consensus quant aux panels de marqueurs phénotypiques à utiliser (marqueurs de repérages pour l'identification des cellules, marqueurs de malignité pour la caractérisation des plasmocytes malins) (*Raja et al, 2010 ; Rawstron et al, 2008*) ; les techniques se standardisent et se perfectionnent, avec notamment le développement de la CMF multiparamétrique (ou multicolore). Si bien qu'à l'heure actuelle, l'analyse des plasmocytes par CMF représente une approche attractive, plus seulement pour la recherche mais aussi pour la pratique clinique.

Ainsi, des diverses études publiées par les différentes équipes européennes qui travaillent sur ce thème ressort un consensus quant à l'utilité clinique de l'immunophénotypage par CMF dans les pathologies malignes du plasmocyte au sens large, selon trois axes principaux (*Paiva et al, 2010 ; Raja et al, 2010 ; Rawstron et al, 2008*) :

- **au diagnostic**, pour le diagnostic différentiel et la classification des pathologies plasmocytaires,
- **pour le pronostic**, pour évaluer le risque de progression des MGUS et SMM en MM symptomatique, et aussi dans le MM par l'identification de marqueurs phénotypiques de valeur pronostique,
- **sur le plan thérapeutique**, avec la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et surtout dans le suivi de la maladie, pour l'évaluation de la réponse aux traitements et de la maladie résiduelle.

Dans le cadre du travail que nous venons de présenter, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM. Malgré un effectif pas toujours suffisamment important pour être représentatif et une durée de suivi trop réduite pour disposer de données justes sur la survie des patients, l'analyse de nos résultats combinée à celle des études publiées dans la littérature ces dernières années nous ont permis d'acquérir une idée plus précise de la place de l'immunophénotypage plasmocytaire dans la prise en charge de patients atteints de MM en pratique courante.

▪ **Intérêt diagnostique**

Par la mise en évidence d'une population plasmocytaire phénotypiquement anormale, monoclonale et non réactionnelle, il est clair que l'immunophénotypage concourt au diagnostic de MM. Mais la plupart du temps, le MM a une présentation cliniquement bruyante et biologiquement caractéristique, et il faut admettre que l'analyse par CMF n'est indispensable au diagnostic de MM que dans de rares cas.

C'est dans les situations où les critères diagnostiques consensuels internationaux du MM sont pris en défaut que l'immunophénotypage plasmocytaire trouve tout son intérêt diagnostique. C'est le cas pour les faibles plasmocytoses (vraies ou liées à la variabilité de l'infiltrat plasmocytaire dans la moelle osseuse), les gammopathies monoclonales non significatives (MM oligo-sécrétants ou non sécrétants/excrétants), et également lorsque l'on est confronté à un problème de diagnostic différentiel comme, nous avons pu le constater dans notre travail, entre un MM à IgM et une MW... Si ces situations sont certes relativement peu fréquentes, il faut reconnaître, lorsqu'elles se présentent, l'utilité majeure de l'immunophénotypage par CMF.

▪ **Intérêt pronostique**

Malgré, comme nous l'avons expliqué au début de cette partie, des discordances entre les études, la valeur pronostique de certains marqueurs phénotypiques (expression aberrante ou perte) dans le MM est relativement bien établie, et le profil phénotypique des cellules myélomateuses peut permettre d'identifier des patients à fort risque de progression (*Mateo et al, 2008*).

Néanmoins, à l'heure actuelle, l'intérêt pronostique de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM n'a qu'une application très réduite en pratique clinique. L'évaluation du pronostic est basée sur la valeur de la β_2m sérique et sur l'ISS, dont la valeur pronostique forte est clairement démontrée, ainsi que sur la mise en évidence de certaines anomalies cytogénétiques.

On peut imaginer que l'impact pronostique de l'immunophénotypage aurait plus de force, ou du moins une plus grande signification clinique, en considérant le phénotype plasmocytaire dans sa globalité (combinaison de marqueurs), ce qui est aujourd'hui plus aisément réalisable grâce au développement des techniques de CMF multiparamétrique. Nous avons voulu étudier cet aspect dans le cadre de notre travail. Malheureusement, une durée de suivi insuffisante ne nous a pas permis d'obtenir d'information pertinente. Pour cela, il serait intéressant de poursuivre le suivi de la population et d'analyser à nouveau la survie en fonction du phénotype plasmocytaire, dans 2 ou 3 ans.

Un autre aspect attrayant de l'immunophénotypage plasmocytaire pour le pronostic du MM est le lien qui semble exister entre le profil phénotypique et la cytogénétique. La force de cette association n'est pas encore suffisamment démontrée pour avoir une application en pratique clinique (d'autres études sont nécessaires), mais cela pourrait permettre d'envisager l'utilisation de l'immunophénotypage plasmocytaire au diagnostic de MM comme un moyen de *screening* des anomalies cytogénétiques d'intérêt pronostique.

▪ **Intérêt thérapeutique**

L'intérêt thérapeutique de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM présente deux aspects distincts : d'une part l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, et d'autre part, dans le suivi de la maladie, l'évaluation de la réponse aux traitements et de la maladie résiduelle.

o Identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles

Malgré de récents progrès dans la prise en charge des patients atteints de MM (traitements intensifs, thalidomide et ses dérivés, inhibiteurs du protéasome), la maladie reste létale après une période variable de quelques semaines à plus de 10 ans. Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires. L'immunophénotypage par CMF permet l'identification d'antigènes exprimés à la surface des cellules myélomateuses, pouvant constituer des cibles pour le développement de nouvelles armes thérapeutiques, sous la forme d'anticorps monoclonaux. Sur ce modèle, plusieurs anticorps monoclonaux ont fait l'objet d'études, mais aucun d'entre eux n'a pour le moment révélé une réelle efficacité dans le traitement du MM. A ce jour, il ne reste à notre connaissance qu'une molécule en cours d'évaluation (essais cliniques de phase 2). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé (HuLuc63, Elotuzumab, *Facet Biotech & Bristol-Myers Squibb*) dirigé contre l'antigène CS1 (glycoprotéine de surface exprimée par plus de 95% des cellules myélomateuses) (*Jakubowiak et al, 2009*).

- o Suivi de la maladie : évaluation de la réponse aux traitements et de la maladie résiduelle

Pendant de nombreuses années, l'objectif dans le traitement du MM était d'atteindre une réponse partielle ou stabilisation de la maladie. Avec l'amélioration de la prise en charge thérapeutique ces dernières années, les taux de rémission complète, de survie sans événement et de survie globale se sont considérablement améliorés, mais la rechute reste toujours inéluctable. Dans ce contexte, il devient primordial de disposer d'outils plus sensibles et spécifiques pour définir la qualité de la réponse et détecter au plus tôt la rechute.

A l'heure actuelle, la réponse au traitement dans le MM est évaluée, selon les critères de l'IMWG, par l'évolution de la plasmocytose médullaire (évaluation morphologique) et les modifications des concentrations sériques et/ou urinaires de protéine M (EPS/EPU et IF) et/ou des CLL sériques (*Durie et al, 2006 ; Kyle & Rajkumar, 2009*). Deux critères supplémentaires ont récemment été proposés, afin de définir une nouvelle catégorie de réponse complète de définition plus stricte que la RC (réponse complète stricte, RCs ou *stringent complete response, sCR*). Il s'agit de la normalisation du ratio des CLL sériques et l'absence de plasmocytes clonaux résiduels dans la moelle osseuse par immunochimie ou **immunofluorescence** (*Durie et al, 2006 ; Kyle & Rajkumar, 2009*).

La rechute de la maladie est la conséquence de la persistance de cellules myélomateuses résiduelles. Pour détecter au plus tôt la rechute et développer des stratégies thérapeutiques efficaces destinées à prolonger les états de RC ou RCs, il est indispensable d'être capable d'évaluer de manière sensible et spécifique cette maladie résiduelle. L'évaluation morphologique de la plasmocytose médullaire est de sensibilité médiocre. La mesure de la protéine M sérique et/ou urinaire (EPS/EPU et IF) n'est pas vraiment adaptée, du fait de la demi-vie longue de certaines Ig, et pas suffisamment sensible (sensibilité de l'EPS : 2 à 5 g/L ; sensibilité de l'IF : 0,05 g/L). Malgré leur récente introduction dans les critères de réponse pour définir la RCs, le dosage des CLL sériques, comme la recherche de plasmocytes clonaux résiduels dans la moelle osseuse par immunochimie, ne présentent pas non plus une sensibilité satisfaisante pour l'évaluation de la maladie résiduelle (10^{-2} à 10^{-3}) (*Paiva et al, 2010 ; Rawstron et al, 2008*). Enfin, les techniques de PCR sont certes très sensibles (*Davies et al, 2002 ; Sarasquete et al, 2005*), mais aussi chronophages, très coûteuses et difficilement applicables en pratique clinique. Dans ce contexte, l'analyse des cellules myélomateuses par CMF a donc une place à prendre...

Comme nous venons de le suggérer, l'évaluation de la maladie résiduelle constitue une perspective très intéressante pour l'utilisation des techniques de CMF dans le MM. Ces dernières années, plusieurs études publiées dans la littérature ont en effet montré d'une part l'intérêt majeur de l'évaluation de la maladie résiduelle dans le MM (ce qui n'était pas le cas il y a encore quelques années), et d'autre part que la CMF était pour cela une technique de choix, grâce aux informations fournies, à sa sensibilité et son applicabilité en pratique clinique (*Davies et al, 2002 ; Owen & Rawstron, 2005 ; Paiva et al, 2008 ; Rawstron et al, 2008 ; San Miguel et al, 2006*).

▪ **Les informations fournies par l'analyse cytométrique des plasmocytes**

La CMF permet d'identifier les cellules myélomateuses sur la base de leur profil phénotypique par rapport aux plasmocytes normaux (expression aberrante ou perte de marqueurs phénotypiques bien identifiés, évaluation de la monoclonalité). Elle est ainsi capable d'une part de détecter les cellules malignes résiduelles et de les quantifier, et d'autre part de renseigner sur la reconstitution de l'immunité « normale », paramètre qui aurait également un impact sur l'évolution de la maladie (*Davies et al, 2002 ; San Miguel et al, 2002 ; San Miguel et al, 2006 ; Sarasquete et al, 2005*).

▪ **La sensibilité de la CMF**

Depuis une dizaine d'années, l'augmentation des capacités techniques des cytomètres en flux a considérablement amélioré les performances de l'analyse cytométrique. La combinaison de plusieurs lasers associée à la génération de nombreux fluorochromes offre la possibilité d'étudier simultanément un nombre croissant de marqueurs à la surface de la même population cellulaire. Appliquée à l'immunophénotypage des cellules plasmocytaires, la CMF multiparamétrique (ou multicolore) permet ainsi d'associer, au niveau de la même analyse, les marqueurs de repérage de la population (triple identification), des marqueurs de malignité et des marqueurs de clonalité. Cela entraîne un gain en sensibilité et en spécificité, primordial pour la détection des événements rares, ce qui prend toute sa valeur dans l'évaluation de la maladie résiduelle. Ainsi, si notre travail a été réalisé en CMF quatre couleurs, limitant l'étude des marqueurs d'intérêt, plusieurs équipes ont montré, pour l'évaluation de la maladie résiduelle, l'intérêt d'une analyse en CMF six couleurs (*De Tute et al, 2007 ; Morice et al, 2007*), offrant la possibilité de combiner les marqueurs de repérage avec l'évaluation de la clonalité et la caractérisation phénotypique simultanément, dans un plus petit nombre d'essais individuels que la CMF trois ou quatre couleurs.

Ainsi, les techniques de CMF multiparamétriques actuellement disponibles sont capables de détecter un clone pathologique monoclonal avec une sensibilité de 10^{-4} soit 0,01% (une cellule maligne parmi dix mille leucocytes) (Almeida et al, 1999 ; Sarasquete et al, 2005). Cela fait de la CMF un outil bien sûr plus performant que l'évaluation morphologique de la plasmocytose médullaire, mais aussi plus sensible que l'IF utilisée pour le suivi de la protéine M (Davies et al, 2002 ; Rawstron et al, 2002 ; San Miguel et al, 2002 ; San Miguel et al, 2006). La sensibilité de la CMF approche celle de la PCR (bien que certaines techniques de PCR montrent une sensibilité encore plus importante, jusqu'à 10^{-6}). Elle est en tout cas tout à fait adéquate (Owen & Rawstron, 2005), puisqu'elle correspond à la valeur seuil démontrée comme étant significative sur le plan clinique (10^{-4}). D'ailleurs plusieurs équipes ayant comparé les deux types d'analyses s'accordent à dire que CMF et PCR fournissent finalement une information clinique similaire (De Tute et al, 2007 ; Paiva et al, 2008 ; San Miguel et al, 2002 ; Sarasquete et al, 2005).

▪ L'applicabilité en pratique clinique

La CMF est applicable pour l'évaluation de la maladie résiduelle à partir du moment où l'immunophénotypage est capable de différencier les cellules myélomateuses des plasmocytes normaux : la présence d'aberrations dans le profil phénotypique des cellules myélomateuses (par rapport au phénotype physiologique des plasmocytes) constitue un pré-requis à l'utilisation de la CMF dans le suivi de la maladie. En pratique, la CMF est applicable à une très grande majorité des cas, puisqu'au diagnostic, 80% à 98% des patients présentent un phénotype plasmocytaire aberrant (Almeida et al, 1999 ; Lin et al, 2004 ; Paiva et al, 2008 ; San Miguel et al, 2006 ; et données de notre étude). D'autant plus qu'avec les analyses en CMF multiparamétrique, cette proportion est encore susceptible de croître. En effet, plus le nombre de marqueurs phénotypiques testés est important, plus la probabilité de mettre en évidence une (ou plusieurs) aberration(s) phénotypique(s) est grande. De plus, la CMF multiparamétrique permet, concomitamment à la caractérisation phénotypique des cellules, d'évaluer la clonalité, ce qui peut « rattraper » certains cas en mettant en évidence une population de plasmocytes monoclonaux bien que sans aberration phénotypique.

Ainsi, pour l'évaluation de la maladie résiduelle, la CMF est applicable à la quasi-totalité des patients, ce qui constitue un avantage réel par rapport aux techniques de PCR qui selon les données de la littérature ne seraient pas applicables à plus de 75% des cas (San Miguel et al, 2006 ; Sarasquete et al, 2005). En outre, toujours en comparaison aux techniques de PCR qui sont très coûteuses et très

chronophages, la CMF multiparamétrique offre un coût et un temps d'analyse nettement réduits (*De Tute et al, 2007 ; Morice et al, 2007 ; Owen & Rawstron, 2005*).

Notons enfin, toujours en faveur de l'applicabilité de la CMF, que si aucune étude n'a encore formellement établi les conditions minimales nécessaires à une évaluation optimale de la maladie résiduelle dans le MM, les techniques se développent et commencent à se standardiser, avec la publication de propositions et même de consensus quant aux panels de marqueurs à utiliser (*Paiva et al, 2008 ; Rawstron et al, 2008*).

Néanmoins, si on analyse en détail les deux principales études cliniques sur l'exploration de la maladie résiduelle dans le MM par CMF (*De Tute et al, 2007 ; Paiva et al, 2008*), on peut s'apercevoir que les panels utilisés ne sont pas optimaux au regard des connaissances actuelles sur l'immunophénotypage plasmocytaire et des récentes avancées techniques en CMF. En effet, l'étude espagnole utilise un panel quatre couleurs, limitant l'analyse des marqueurs phénotypiques d'intérêt, étant donné que chaque combinaison doit contenir les marqueurs de repérage des cellules plasmocytaires (*Paiva et al, 2008*). L'équipe anglaise a, quant à elle, développé une stratégie d'évaluation de la maladie résiduelle par une analyse en CMF six couleurs, mais le panel ne comprend que des marqueurs de repérage des cellules plasmocytaires (CD38/CD138/CD45), d'exclusion des cellules B (CD19) et de monoclonalité (κ/λ), sans prendre en compte les marqueurs phénotypiques caractérisant les cellules myélomateuses.

Dans ce contexte, et dans la continuité de notre travail qui a montré tout l'intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le MM et qui valide techniquement sa réalisation au sein de la plateforme cytométrique du CHU de Nancy, un projet d'étude de l'évaluation de la maladie résiduelle par CMF a vu le jour au CHU de Nancy (collaboration du service d'Hématologie Biologique et du laboratoire d'Immunologie pour les analyses biologiques, et du service d'Hématologie Adulte pour le recrutement des patients et l'aspect clinique).

Le but de cette étude est d'utiliser les capacités d'analyse dix couleurs du cytomètre en flux de dernière génération acquis récemment par le pôle Biologie du CHUN (cytomètre Navios®, *Beckman Coulter*) pour optimiser en terme de sensibilité, de spécificité et d'efficacité l'évaluation de la maladie résiduelle chez les patients atteints de MM.

Il s'agit d'une étude prospective dans laquelle il est prévu d'inclure trente patients répondant aux critères diagnostiques de MM, avec une durée de suivi de 2 ans. L'analyse par CMF sera réalisée

pour chaque patient à trois temps différents : au diagnostic, en post-induction et après autogreffe (traitement intensif).

Sur la base des panels proposés dans la littérature (*Paiva et al, 2008 ; Rawstron et al, 2008*), le panel d'immunophénotypage choisi pour ce travail associe dans un seul tube l'ensemble des marqueurs d'identification des cellules plasmocytaires (CD38/CD138/CD45) et des marqueurs de caractérisation des cellules myélomateuses (CD27, CD28, CD56 et CD33), avec également un repérage des précurseurs myéloïdes (CD34 et CD117) afin de s'affranchir du facteur « hémodilution du prélèvement » (expression des résultats sous forme de ratio « plasmocytes/précurseurs myéloïdes »).

Il s'agit donc d'une combinaison de neuf marqueurs en un seul tube, soit neuf « couleurs » ou fluorochromes. Afin de compléter ce panel, il est ajouté un second tube pour l'évaluation de la clonalité (κ/λ intracytoplasmiques, après perméabilisation cellulaire).

L'objectif principal de cette analyse cytométrique multiparamétrique est d'optimiser le diagnostic de la maladie, avec une caractérisation optimale du clone malin, et surtout le suivi, par l'évaluation du nombre de cellules myélomateuses résiduelles, ce qui permettra d'analyser la décroissance de la masse tumorale en réponse au traitement. L'impact pronostique de l'étude phénotypique de la maladie résiduelle sur la survie pourra être déterminé, ainsi que la sensibilité maximale de l'analyse multiparamétrique et la variabilité phénotypique des cellules myélomateuses après traitement et en rechute.

L'optimisation de cet immunophénotypage plasmocytaire multicolore devrait permettre de l'appliquer en routine, afin d'améliorer l'efficacité technique et la prise en charge des patients. En effet, il est clair que la surveillance biologique utilisée actuellement en routine dans le MM ne permet pas d'atteindre le niveau de sensibilité de la maladie résiduelle, ce qui est pourtant devenu indispensable pour prendre en charge le plus précocement possible la rechute, identifier les patients pouvant bénéficier de stratégies thérapeutiques d'entretien et monitorer l'efficacité de telles stratégies. Le but final étant de fournir des informations cliniquement pertinentes pour améliorer la prise en charge des patients.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD (2006)** Chemokines in multiple myeloma. *Experimental Hematology*, 34:1289-1295.

2. **Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero D, Blade J, Moro J, Hernandez J, San Miguel JF (1999)** High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 107:121-131.

3. **Anderson KC, Kyle RA, Rajkumar SV, Stewart AK, Weber D, Richardson P (2008)** Clinically relevant end points and new drug approvals for myeloma. *Leukemia*, 22:231-239.

4. **Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillermin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C (2007)** Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 109:3489-3495.

5. **Barille S, Thabard W, Robillard N, Moreau P, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M (1999)** CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 106:532-535.

6. **Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Epstein J, Fenton RG, Jacobson J, Kuehl WM, Shaughnessy J, Tricot G (2003)** Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology, American Society of Hematology Education Program Book*:248-278.

7. **Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P (2005)** CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica*, 90:706-707.

8. **Bataille R, Jigo G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C (2006)** The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*, 91:1234-1240.

9. **Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P (2008)** CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leukemia Research*, 32:379-382.

10. **Binet C, Domenech J, Herault O (2004)** Cellules souches hématopoïétiques : propriétés, description des différents types, schéma de l'hématopoïèse. <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/diaporamas.html> (consulté le 1^{er} septembre 2010).
11. **Burmester GR & Pezzutto A (2005)** Développement et différenciation des lymphocytes B. In: Atlas de poche d'immunologie. Bases, analyses biologiques, pathologies. 2^{ème} édition. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. p.22-35.
12. **Colovic M, Jankovic G, Suvajdzic N, Milic N, Dordevic V, Jankovic S (2008)** Thirty patients with primary plasma cell leukemia: a single center experience. *Medical Oncology*, 25:154-160.
13. **Costello R, Sainty D, Bouabdallah R, Femand JP, Delmer A, Divine M, Marolleau JP, Gastaut JA, Olive D, Rousselot P, Chaibi P (2001)** Primary plasma cell leukaemia: a report of 18 cases. *Leukemia Research*, 25:103-107.
14. **Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ (2002)** Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Practice and Research, Clinical Haematology*, 15:197-222.
15. **De Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC (2007)** A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia*, 21:2046-2049.
16. **Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Bataille R, Amiot M (2009)** A humanised anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances Bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. *British Journal of Cancer*, 100:366-369.
17. **Dignat-Georges F, Bardin N, Brunet C (2006)** Lymphocytes et réponse immunitaire. In: Sebahoun G. Hématologie clinique et biologique. 2^{ème} édition. Arnette. p.245-354.
18. **Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BGM, on behalf of the International Myeloma Working Group (2009)** International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 23:215-224.
19. **Durie BG & Salmon SE (1975)** A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36:842-854.

20. **Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadoro M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV, on behalf of the International Myeloma Working Group (2006)** International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20:1467-1473.

21. **Ely SA & Knowles DM (2002)** Expression of CD56/Neural Cell Adhesion Molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *American Journal of Pathology*, 160:1293-1299.

22. **Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Lai JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY (2001)** Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum {beta}2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*, 97:1566-1571.

23. **Frenandez Y, Miller TP, Denoyelle C, Esteban JA, Tang WH, Bengston AL, Soengas MS (2006)** Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 :1107-1118.

24. **Feuillard J & Raphaël M (2000)** Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie*, 6:345-359.

25. **Feyler S, O'Connor SJM, Rawstron AC, Subash C, Ross FM, Pratt G, Drayson MT, Ashcroft J, Cook G, Owen RG (2008)** IgM myeloma: a rare entity characterized by a CD20-CD56-CD117- immunophenotype and the t(11;14). *British Journal of Haematology*, 140:547-551.

26. **Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel L, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Stewart AK, Avet-Loiseau H (2004)** Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Research*, 64:1546-1558.

27. **Garand R, Avet-Loiseau H, Accard F, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R (2003)** t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia*, 17:2032-2035.

28. **Garcia-Sanz R, Orfao M, Tabernero MD, Blade J, Moro MJ, Fernandez-Calvo J, Sanz MA, Perez-Simon JA, Rasillo A, San Miguel JF (1999)** Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*, 93:1032-1037.

29. **Gardais J, Genevieve F, Foussard C, Delisle V, Zandecki M (2001)** Is there any significance for intracellular crystals in plasma cells from patients with monoclonal gammopathies? *European Journal of Haematology*, 67:119-122.

30. **Goasguen JE, Zandecki M, Mathiot C, Scheiff JM, Bizet M, Ly-Sunnaram B, Grosbois B, Monconduit M, Michaux JL, Facon T (1999)** Mature plasma cells as indicator of better prognosis in multiple myeloma. New methodology for the assessment of plasma cell morphology. *Leukemia Research*, 23:1133-1140.

31. **Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, Kyle RA (1998)** Plasmablastic morphology. An independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG myeloma laboratory group. *Blood*, 91:2501-2507.

32. **Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shutsik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J (2005)** International Staging System for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 23:3412-3420.

33. **Guieze R, Moreau AS, Dupire S, Coiteux V, Facon T, Leleu X (2005)** Leucémie à plasmocytes. *Hématologie*, 11:217-225.

34. **Harousseau JL, Shaughnessy J, Richardson P (2004)** Multiple myeloma. *Hematology, American Society of Hematology Education Program Book*:237-256.

35. **Hulin C (2007)** Mise au point. Les nouveaux médicaments du myélome. *La Revue de médecine interne*, 28:682-688.

36. **Hutchison CA, Cockwell P, Reid S, Chandler K, Mead GP, Harrison J, Hattersley J, Evans ND, Chappell MJ, Cook M, Goehl H, Storr M, Bradwell AR (2007)** Efficient removal of immunoglobulin free light chains by hemodialysis for multiple myeloma: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18:886-895.

37. **The International Myeloma Working Group (IMWG) (2003)** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*, 121:749-757.

38. **Jakubowiak AJ, Bensinger W, Siegel D, Zimmerman TM, Benson DM, Mohrbacher A, Richardson P, Van Tornout JM, Zhao C, Singhal A, Anderson K (2009)** Phase ½ study of elotuzumab in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma following 1 to 3 prior therapies: interim results. *ASH 2009 (New Orleans)*, poster presentation.

39. **Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C (1999)** Reactive plasmocytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*, 94:701-712.
40. **Johnson MR, Del Carpio-Jayo D, Lin P, Giralt S, Anderlini P, Champlin RE, Khouri IF, Vadhan-Raj S, Medeiros J, Bueso-Ramos CE (2006)** Primary plasma cell leukemia: morphologic, immunophenotypic, and cytogenetic features of 4 cases treated with chemotherapy and stem cell transplantation. *Annals of Diagnostic Pathology*, 10:263-268.
41. **Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B (2009)** An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*, 114:5173-5181.
42. **Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar V, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR (2003)** Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, 78:21-33.
43. **Kyle RA & Rajkumar SV (2009)** Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23:3-9.
44. **LeBien TW (2000)** Fates of human B-cell precursors. *Blood*, 96:9-23.
45. **LeBien TW & Tedder TF (2008)** B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112:1570-1580.
46. **Lees O & Béné MC et les membres du GEIL (1998)** Immunophénotypage des leucocytes. Paris: *Biotem Editions*.
47. **Leleu X, Genevieve F, Guieze R, Duhamel A, Andrieux J, Berthon C, Godon A, Prat-Lesaffre S, Depil S, Lai JL, Facon T, Zandecki M, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) (2005)** Irregular nuclear shape of bone marrow plasma cells defines a multiple myeloma subgroup related to hypodiploidy and to short survival. *Leukemia Research*, 29:665-671.
48. **Leleu X (2006)** Signification pronostique du marqueur CD33 dans le myélome multiple. *Hématologie*, 12:299.
49. **Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS (2004)** Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*, 121:482-488.
50. **Lopez J, Dauwalder O, Joly P, Dimet I, Bienvenu J, Bernon H (2006)** Intérêt et limites des dosages sériques et urinaires des chaînes légères libres pour le diagnostic et le suivi des dysglobulinémies monoclonales. *Annales de Biologie Clinique*, 64:287-297.

51. **Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW (2002)** L'essentiel en immunologie. Paris: *BERTI Editions*.
52. **Mateo G, Castellanaos M, Rasillo A, Gutierrez NC, Montalban MA, Martin ML, Hernandez JM, Lopes-Berges MC, Montejano L, Blade J, Mateos MV, Sureda A, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Pandiella A, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF (2005)** Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 11:3661-3667.
53. **Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutierrez N, Rosinol L, Montejano L, Blade J, Martinez R, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Sureda A, Ribera JM, Ojanguren JM, de Arriba F, Palomera L, Terol MJ, Orfao A, San Miguel JF (2008)** Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26:2737-2744.
54. **Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA (2002)** The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*, 99:2154-2161.
55. **Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, Pineau D, Morineau N, Milpied N, Harousseau JL, Bataille R (2004)** Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*, 89:547-551.
56. **Moreau P, Robillard N, Jigo G, Pellat C, Le Gouill S, Thoumi S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Bataille R (2005)** Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *British Journal of Haematology*, 132:168-170.
57. **Moreau P, Voillat L, Benboukher L, Mathiot C, Dumontet C, Robillard N, Hérault O, Garnache F, Garand R, Varoquaux N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Bataille R (2007)** Rituximab in CD20 positive multiple myeloma. *Leukemia*, 21:835-836.
58. **Morice WG, Hanson CA, Kumar S, Frederick LA, Lesnick CE, Greipp PR (2007)** Novel multi-parameter flow cytometry sensitively detects phenotypically distinct plasma cell subsets in plasma cell proliferative disorders. *Leukemia*, 21:2043-2083.
59. **Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Dispenzieri A, Greipp PR, Kyle RA, Rajkumar V (2005)** Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 106:2276-2279.

60. **Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges C, Moro MJ, Hernandez J, Escribano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF (1998)** Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *American Journal of Pathology*, 152:1655-1665.
61. **Owen RG & Rawstron AC (2005)** Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *British Journal of Haematology*, 2005;128:732-733.
62. **Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, Sureda A, Montejano L, Gutierrez NC, Garcia de Coca A, de las Heras N, Mateos MV, Lopez-Berges MC, Garcia-Boyero R, Galende J, Hernandez J, Palomera L, Carrera D, Martinez R, de la Rubia J, Martin A, Blade J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF (2008)** Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*, 112:4017-4023.
63. **Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ, Mateo G, Montalban MA, Mateos MV, Blade J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF (2009)** Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*, 94:1599-1602.
64. **Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, San Miguel JF, Orfao A (2010)** Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Clinical Cytometry*, 78B:239-252.
65. **Pasquier F, Moreau AS, Tricot S, Wemeau M, Facon T, Leleu X (2006)** Place actuelle des inhibiteurs du protéasome dans le traitement du myélome multiple. *Hématologie*, 12:67-76.
66. **Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M (1994)** Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*, 84:2597-2603.
67. **Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M (1995)** Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Research*, 55:3647-3653.
68. **Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R (1998)** The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukaemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia*, 12:1977-1982.

69. **Pellat-Deceunynck C & Bataille R (2004)** Normal and malignant plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32:293-301.
70. **Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Borrego D, Rodriguez MJ, Ortega F, Hernandez J, Moreno I, Dominguez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A (2005)** Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia*, 19:449-455.
71. **Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, De Las Heras N, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Cuello R, Abuin I, Moreno I, Dominguez M, Hernandez J, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A (2009)** Soluble and membrane levels of molecules involved in the interaction between clonal plasma cells and the immunological microenvironment in multiple myeloma and their association with the characteristics of the disease. *International Journal of Cancer*, 124:367-375.
72. **Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, Garcia de Coca A, Galende J, Martin-Nunez G, Alonso JM, de las Heras N, Hernandez JM, Martin A, Lopez-Berges C, Orfao A, San Miguel JF (2007)** New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110:2586-2592.
73. **Raja K, Kovarova L, Hajek R (2010)** Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *British Journal of Haematology*, 149:334-351.
74. **Rawstron A, Barrans S, Blythe D, Davies F, English A, Pratt G, Child A, Morgan G, Jack A (1999)** Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *British Journal of Haematology*, 104:138-143.
75. **Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA, Morgan GJ (2002)** Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*, 100:3095-3100.
76. **Rawstron AC, Laycock-Brown G, Hale G, Davies FE, Morgan GJ, Child JA, Hillmen P, Owen RG (2006)** CD52 expression patterns in myeloma and the applicability of alemtuzumab therapy. *Haematologica*, 91:1577-1578.

77. **Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omede P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, De Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johsen HE, on behalf of the European Myeloma Network (2008)** Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 93:431-438.

78. **Robillard N, Jego G, Pellat-Deceunynck C, Pineau D, Puthier D, Mellerin MP, Barille S, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R (1998)** CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 4:1521-1526.

79. **Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R (2003)** CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood*, 102:1070-1071.

80. **Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R (2005a)** Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*, 105:4845-4848.

81. **Robillard N, Wuilleme S, Lode L, Magrangeas F, Minvielle S, Avet-Loiseau H (2005b)** CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and many represent a therapeutic target. *Leukemia*, 19:2021-2022.

82. **Roodman GD (2009)** Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*, 23:435-441.

83. **Sahara N, Ihara M, Ono T, Tamashima S, Matsui H, Takeshita A, Ohno R (2000)** Multiple myeloma expressing CD19+CD56- phenotype. *American Journal of Hematology*, 64:311-313.

84. **Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, Fujisawa S, Takeshita K, Naito K, Ihara M, Ono T, Yamashita S, Nara K, Ohnishi K, Ohno R (2002)** Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 117:882-885.

85. **Sahara N, Ohnishi K, Ono T, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takeshita K, Shigeno K, Nakamura S, Naito K, Tamashima S, Nara K, Tobita T, Takeshita A, Ohno R (2006)** Clinicopathological and prognostic characteristics of CD33-positive multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 77:14-18.

86. **San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, Hernandez J, Moro MJ, Fernandez-Calvo J, Diaz-Medavilla J, Palomera L, Orfao A (2002)** Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*, 99:1853-1856.

87. **San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A (2006)** Conventional diagnostics in multiple myeloma. *European Journal of Cancer*, 42:1510-1519.
88. **Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P, Ribera JM, Hernandez JM, Lahuerta JJ, Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF (2005)** Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*, 90:1365-1372.
89. **Shapiro-Shelef M & Calame K (2005)** Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 5:231-242.
90. **Snozek CLH, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV (2008)** Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*, 22:1933-1937.
91. **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.) (2008)** WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: *IARC*.
92. **Van Camp B, Durie BGM, Spier C, De Waele M, Van Riet I, Vela E, Frutiger Y, Richter L, Grogan TM (1990)** Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*, 76:377-382.
93. **Wuilleme S, Robillard N, Lode L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau JL, Proffitt J, Minvielle S, Avet-Loiseau H, for the Intergroupe Francophone du Myélome (2005)** Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*, 19:275-278.

ANNEXES

ANNEXE 1

CRITERES DIAGNOSTIQUES INTERNATIONAUX

(d'après *The IMWG, 2003 ; Kyle et al, 2009 ; Swerdlow et al, 2008*)

Critères diagnostiques de MM Myélome multiple symptomatique
Présence d'une Ig monoclonale sérique ou urinaire <i>Aucune valeur seuil quantitative n'est incluse dans les critères, mais généralement IgG > 30 g/L, IgA > 25 g/L ou PBJ > 1 g/24 heures</i> Plasmocytose médullaire excessive (généralement > 10%) ou plasmocytome Atteinte(s) organique(s) compatible(s) avec la présentation clinique d'un MM (ROTI, <i>Related Organ or Tissue Impairment</i>), c'est-à-dire présence d'au moins un des critères « CRAB » (hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésions osseuses)

Abréviations : Ig, immunoglobuline ; MM, myélome multiple ; PBJ, protéinurie de Bence Jones.

Atteintes organiques attribuables au processus de prolifération plasmocytaire ROTI, <i>Related Organ or Tissue Impairment</i>
Critères « CRAB » : - hyperCalcémie : calcémie > 2,75 mmol/L (soit 110 mg/L) ou > 0,25 mmol/L au-dessus de la limite supérieure normale - atteinte Rénale : créatininémie > 175 µmol/L (soit 20 mg/L) - Anémie : hémoglobine < 10 g/dL ou > 2 g/dL en-dessous de la limite inférieure normale - lésions osseuses (<u>B</u>one) : lésions lytiques ou ostéopénie sévère ou fractures pathologiques Autres : - hyperviscosité symptomatique - amylose - infections bactériennes récurrentes (> deux épisodes en 12 mois)

Critères diagnostiques de SMM <i>Smoldering Multiple Myeloma</i> Myélome multiple asymptomatique ou indolent
Présence d'une Ig monoclonale sérique à des concentrations compatibles avec un MM (> 30 g/L) ET/OU Plasmocytose médullaire ≥ 10% Absence d'atteinte organique compatible avec la présentation clinique d'un MM (ROTl, <i>Related Organ or Tissue Impairment</i>), c'est-à-dire absence des critères « CRAB » (hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésions osseuses)

Abréviations : Ig, immunoglobuline ; MM, myélome multiple.

Critères diagnostiques de MGUS <i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i> Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
Présence d'une Ig monoclonale sérique < 30 g/L Plasmocytose médullaire < 10% et faible infiltration plasmocytaire à la BOM, si réalisée Absence d'atteinte organique compatible avec la présentation clinique d'un MM (ROTl, <i>Related Organ or Tissue Impairment</i>), c'est-à-dire absence de critère « CRAB » (hypercalcémie, atteinte rénale, anémie, lésions osseuses) Absence d'autre syndrome lymphoprolifératif B

Abréviations : BOM, biopsie ostéo-médullaire ; Ig, immunoglobuline ; MM, myélome multiple.

ANNEXE 2

CRITERES DE REPONSES DE L'*INTERNATIONAL MYELOMA* *WORKING GROUPE* (IMWG)

(d'après *Durie et al, 2006 ; Kyle et al, 2009*)

Catégories de réponses	
Niveau de réponse	Critères requis
Réponse complète stricte, RCs <i>Stringent complete response, sCR</i>	RC plus les deux critères suivants : - Ratio des CLL normal <u>et</u> - Absence de plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse par immunohistochimie ou immunofluorescence.
Réponse complète, RC <i>Complete response, CR</i>	- IF sérique et urinaire négative <u>et</u> - Disparition des plasmocytomes extra-osseux <u>et</u> - ≤ 5% de plasmocytes dans la moelle osseuse.
Très bonne réponse partielle, TBRP <i>Very good partial response, VGPR</i>	- Détection d'Ig monoclonales sériques et urinaires par IF (et non par électrophorèse) <u>ou</u> - Réduction ≥ 90% de l'Ig monoclonale sérique et réduction de l'Ig urinaire < 100 mg/24h.
Réponse partielle, RP <i>Partial response, PR</i>	- Réduction ≥ 50% de l'Ig monoclonale sérique et réduction de l'Ig monoclonale urinaire ≥ 90% ou < 200 mg/24h. - Si les Ig monoclonales sériques et urinaires ne sont pas mesurables, une baisse ≥ 50% de la différence entre le taux de chaînes légères impliquées et le taux de chaînes légères non impliquées est exigée en lieu et place des critères requis pour les Ig monoclonales sériques et urinaires. - Si ni les Ig monoclonales sériques et urinaires, ni le dosage des CLL ne sont mesurables, une baisse ≥ 50% des plasmocytes est exigée en lieu et place des critères requis pour les Ig monoclonales sériques et urinaires, pourvu que le pourcentage initial de plasmocytes dans la moelle osseuse soit ≥ 30%. - En plus des critères listés ci-dessus, si des plasmocytomes extra-osseux sont présents à l'état initial, une réduction ≥ 50% de leur taille est également exigée.
Maladie stable, MS <i>Stable disease, SD</i>	Absence de critères nécessaires pour RC, TBRP, RP ou maladie progressive*.

Abréviations : CLL, chaînes légères libres ; IF, immunofixation ; Ig, immunoglobuline ; MS, maladie stable ; RC, réponse complète ; RCs, réponse complète stricte ; RP, réponse partielle ; TBRP, très bonne réponse partielle.

* Critères de maladie progressive détaillés dans le tableau suivant « Progression et rechute de la maladie ».

Progression et rechute de la maladie	
Niveau de rechute	Critères requis
Maladie progressive, MP <i>Progressive disease, PD</i>	Requiert un ou plusieurs des critères suivants : - Augmentation $\geq 25\%$ de l'Ig monoclonale sérique (augmentation absolue ≥ 5 g/L) et/ou de l'Ig monoclonale urinaire (augmentation absolue ≥ 200 mg/24h). - Si les Ig monoclonales sériques et urinaires ne sont pas mesurables, augmentation $\geq 25\%$ de la différence entre le taux de chaînes légères impliquées et le taux de chaînes légères non impliquées (augmentation absolue ≥ 100 mg/L). - Augmentation $\geq 25\%$ du pourcentage de plasmocytes dans la moelle osseuse (augmentation absolue $\geq 10\%$). - Augmentation notable de la taille ou apparition de nouvelles lésions osseuses ou de nouveaux plasmocytomes extra-osseux. - Apparition d'une hypercalcémie (> 115 mg/L ou $2,65$ mmol/L) en lien avec la maladie.
Rechute clinique <i>Clinical relapse</i>	Requiert un ou plusieurs des critères d'aggravation de la maladie et/ou de dysfonction organique CRAB suivants : - Hypercalcémie > 115 mg/L ou $2,65$ mmol/L - Augmentation de la créatinine sérique ≥ 20 mg/L ou 177 μmol/L. - Baisse de l'hémoglobine ≥ 2 g/dL ou $1,25$ mmol/L. - Apparition de nouveaux plasmocytomes extra-osseux et/ou de nouvelles lésions osseuses. - Augmentation notable de 50% (et ≥ 1cm) de la taille des lésions osseuses ou des plasmocytomes pré-existants.
Rechute à partir d'une RC <i>Relapse from CR</i>	Requiert un ou plusieurs des critères suivants : - Réapparition des Ig monoclonales sériques et urinaires par IF ou électrophorèse. - Augmentation $\geq 5\%$ des plasmocytes dans la moelle osseuse. - Apparition d'autres signes de progression de la maladie (nouveaux plasmocytomes, nouvelles lésions osseuses ou hypercalcémie).

Abréviations : IF, immunofixation ; Ig, immunoglobuline ; MP, maladie progressive ; RC, réponse complète.

ANNEXE 3

CRITERES D'EVALUATION

(d'après Anderson et al, 2008 ; Kyle et al, 2009)

Critères d'évaluation	
Critère	Définition
Temps jusqu'à progression <i>Time to progression, TTP</i>	Durée depuis le début du traitement jusqu'à la progression de la maladie, sans prendre en compte les décès qui ne sont pas attribuables à la progression de la maladie.
Survie sans progression <i>Progression-free survival, PFS</i>	Durée depuis le début du traitement jusqu'à la progression de la maladie ou le décès (quelque soit la cause du décès), selon l'événement qui survient en premier.
Survie sans événement <i>Event-free survival, EFS</i>	Dépend de la définition d' « événement ». Dans de nombreuses études, la définition est la même que celle de PFS. L'EFS peut inclure des « événements » supplémentaires, comme des effets indésirables des thérapeutiques.
Survie sans maladie <i>Disease-free survival, DFS</i>	Durée depuis le début de la RC jusqu'à la rechute. S'applique uniquement aux patients en RC.
Durée de réponse <i>Duration of response, DOR</i>	Durée depuis la première observation d'une RP jusqu'à la progression de la maladie, sans prendre en compte les décès qui ne sont pas attribuables à la progression de la maladie. Les durées de RC et de RP doivent chacune être rapportées.
Survie globale <i>Overall survival, OS</i>	Durée depuis le début du traitement jusqu'au décès ou à la fin de suivi.

Abréviations : RC, réponse complète ; RP, réponse partielle.

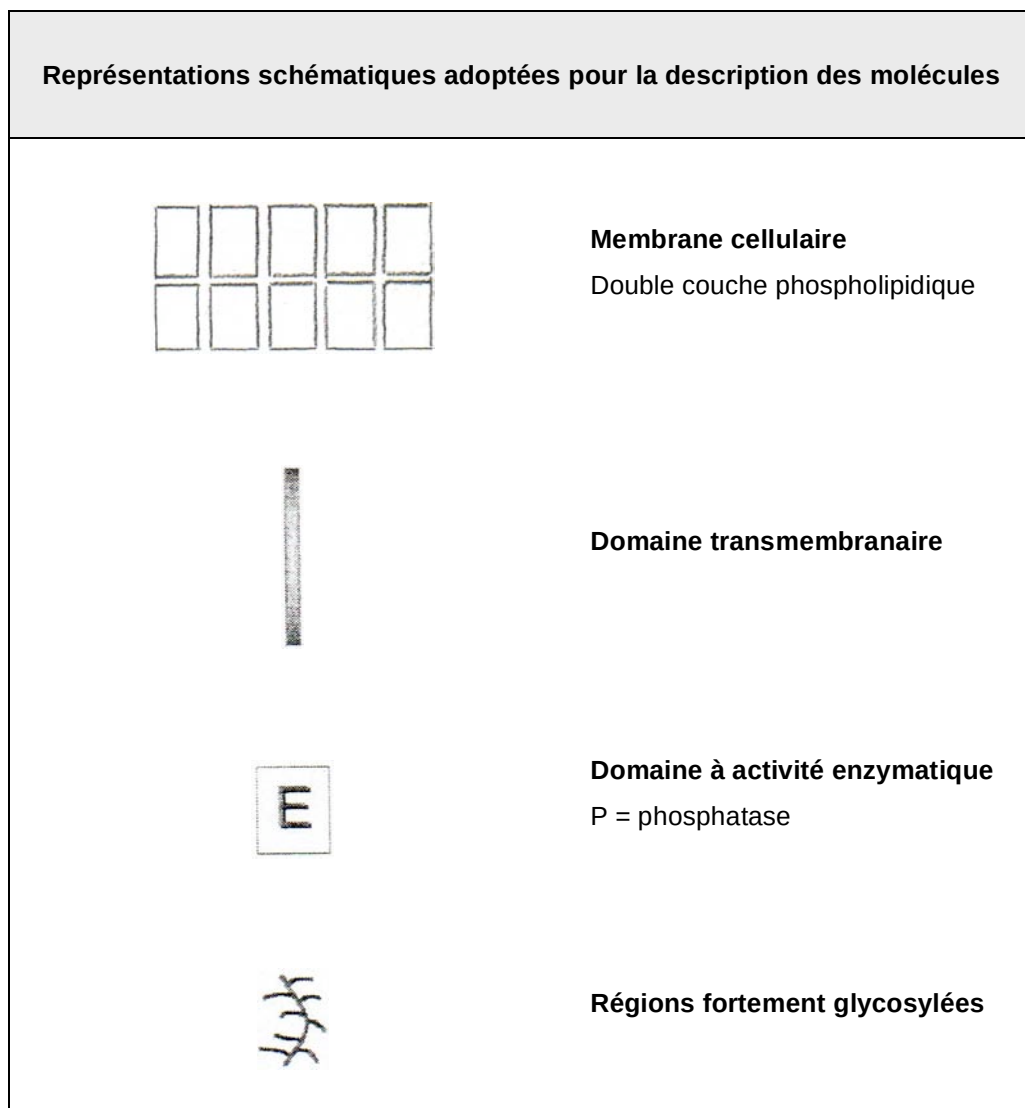
ANNEXE 4

DESCRIPTIF DES *CLUSTERS* DE DIFFERENCIATION HUMAINS UTILISES DANS L'ETUDE

(d'après Lees & Béné et al, 1998 ; Raja et al, 2010)

Les antigènes de différenciation leucocytaires ont été progressivement définis grâce à l'obtention d'anticorps monoclonaux et au développement des techniques de biologie moléculaire. La cristallographie a plus récemment permis d'élucider encore la structure de ces molécules.

Un anticorps monoclonal reconnaît un épitope ou déterminant antigénique d'une molécule. On appelle classe ou *cluster* de différenciation (CD) l'ensemble des anticorps reconnaissant la même molécule. Ce CD est associé à un numéro arbitraire permettant de l'identifier, selon la nomenclature internationale des CD. Par extension, le terme CD désigne aussi bien la molécule antigénique que les anticorps qui la reconnaissent.





Domaines de la superfamille des Ig

Il s'agit de domaines protéiques d'environ cent dix à cent vingt acides aminés, et comportant deux résidus cystéine liés par un pont disulfure, formant une boucle d'environ soixante acides aminés. Tous ces domaines sont constitués de deux feuillets β -plissés superposés, comportant chacun trois ou quatre brins anti-parallèles, et fixés par le pont disulfure.



Domaines fibronectine de type III

Cette structure a d'abord été observée dans la fibronectine qui est une molécule de la matrice extra-cellulaire. L'organisation spatiale implique deux feuillets β -plissés anti-parallèles d'une séquence d'une centaine d'acides aminés avec un motif conservé « tryptophane-sérine-X-tryptophane-sérine » (WSXWS).



Domaines de la superfamille du récepteur du TNF

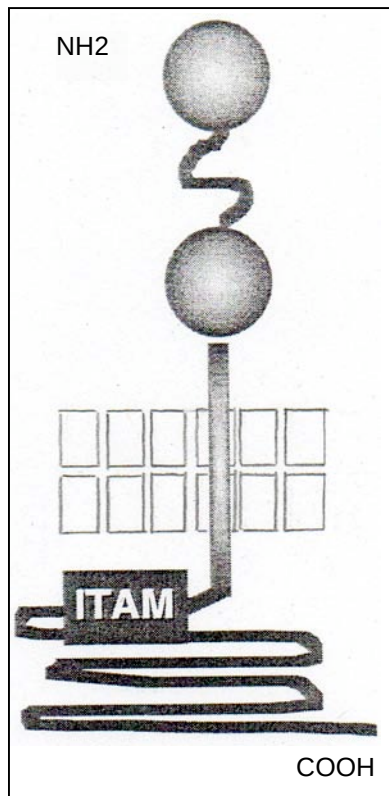
On parle aussi de la superfamille du récepteur du NGF (*nerve growth factor*). Les molécules de cette famille comportent dans leur partie extra-cellulaire des structures répétitives d'une quarantaine d'acides aminés comprenant quatre à six résidus cystéines formant un motif qui n'est pas retrouvé dans les autres domaines riches en cystéine.



Motifs ITAM

Il s'agit de domaines intra-cytoplasmiques associés à des molécules impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires. L'abréviation correspond à des motifs riches en tyrosine portés par des récepteurs et induisant une activation de la cellule portant cette molécule (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*). Les séquences caractéristiques des motifs ITAM lient des tyrosine kinases intra-cytoplasmiques.

CD19



Autre nom : B4

Structure moléculaire et famille : CD19 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig.

Masse moléculaire : 90 kDa

Ligand : CD77

Expression cellulaire : CD19 apparaît précocement sur les progéniteurs hématopoïétiques, persiste à la surface des lymphocytes B tout au long de leur maturation et activation, et disparaît au stade plasmocytaire. Il est également présent à faible niveau sur certains macrophages et cellules dendritiques.

Principales fonctions : CD19 s'associe à la surface des lymphocytes B avec CD21, CD81 et Leu 13 pour former un co-récepteur du BCR qui stimule l'activation cellulaire déclenchée par la rencontre avec l'antigène. CD19 joue également un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B indépendante de l'antigène (phases précoces de la maturation B).

CD20

Autre nom : B1

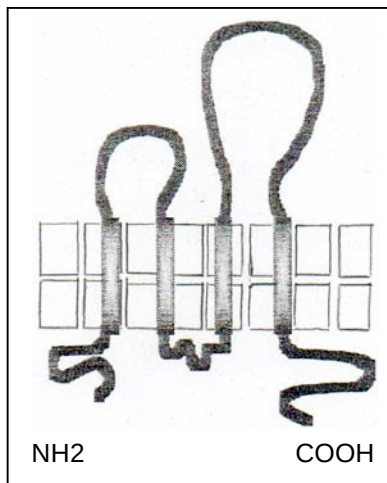
Structure moléculaire et famille : Il s'agit d'une protéine transmembranaire, non glycosylée.

Masse moléculaire : 33-37 kDa

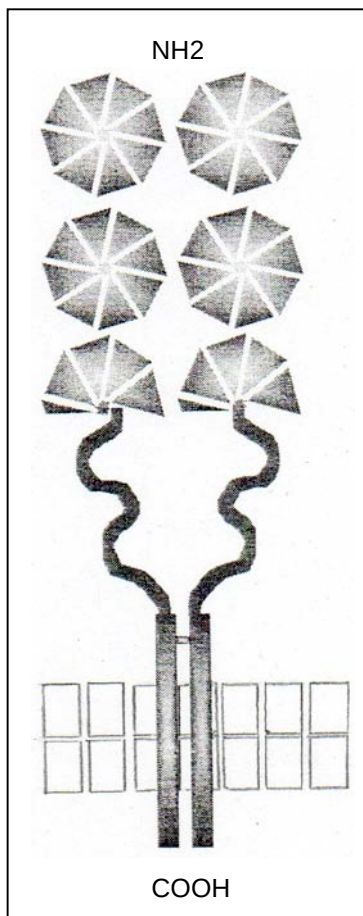
Ligand(s) : inconnu(s)

Expression cellulaire : CD20 apparaît sur les cellules B à un stade intermédiaire de maturation dans la moelle osseuse, persiste sur les cellules B matures et disparaît au stade plasmocytaire.

Principales fonctions : CD20 devient fortement phosphorylé après activation des cellules B et déclenche l'activité de tyrosines kinases et l'expression de *c-myc*. Il fonctionne aussi en tant que sous unité de canaux ioniques.



CD27



Autres noms : T14, S152

Structure moléculaire et famille : L'antigène CD27 est un homodimère constitué de deux glycoprotéines transmembranaires liées par un pont disulfure. Il appartient à la superfamille du récepteur du TNF.

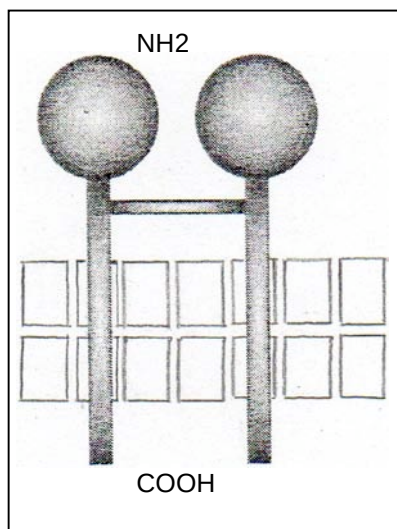
Masse moléculaire : 110 kDa (2 fois 55 kDa)

Ligand : CD70

Expression cellulaire : CD27 est exprimé par les thymocytes médullaires, les lymphocytes T matures et activés, les cellules NK, certaines cellules B (cellules centrogerminatives, cellules mémoires et plasmocytes) et les macrophages.

Principales fonctions : La molécule devient fortement phosphorylée après activation des lymphocytes T. L'interaction CD27/CD70 joue un rôle dans la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes matures.

CD28



Autres noms : Tp44, T44

Structure moléculaire et famille : C'est un homodimère constitué de deux glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des Ig, liées par un pont disulfure.

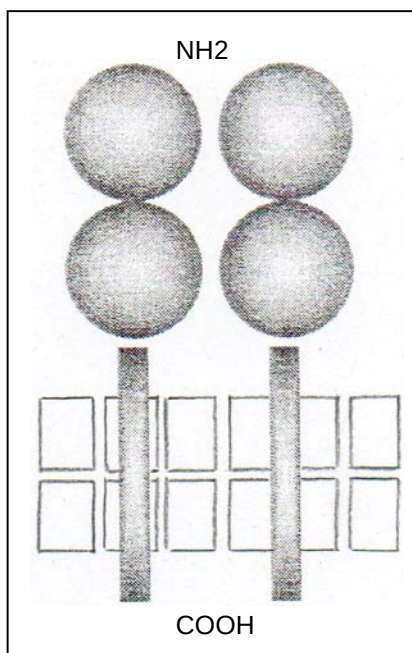
Masse moléculaire : 44 kDa

Ligands : CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2)

Expression cellulaire : CD28 est présent sur des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ matures. Il est surexprimé sur les lymphocytes T activés.

Principales fonctions : L'antigène CD28 est important pour l'activation des cellules T. La liaison de CD28 à son ligand induit un signal de co-stimulation important dans les interactions T-B.

CD33



Autre nom : gp67

Structure moléculaire et famille : Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig. CD33 peut aussi être exprimé sous forme d'un homodimère.

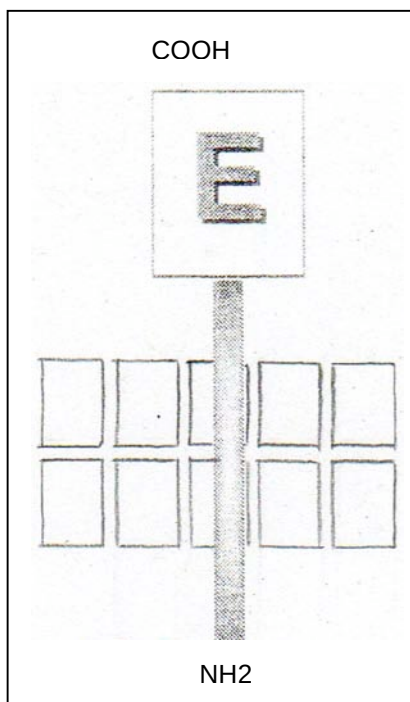
Masse moléculaire : 67 kDa

Ligand(s) : inconnu(s)

Expression cellulaire : Cet antigène est exprimé précocement par des cellules de la lignée myéloïde dans la moelle osseuse. On le trouve à la surface des monocytes matures, des macrophages, des mastocytes, et sur une sous-population de cellules dendritiques. CD33 est exprimé fréquemment par les cellules leucémiques (particulièrement dans les leucémies aiguës myéloïdes).

Principales fonctions : Les fonctions de CD33 sont peu connues.

CD38



Autres noms : T10, gp45

Structure moléculaire et famille : CD38 est une glycoprotéine transmembranaire.

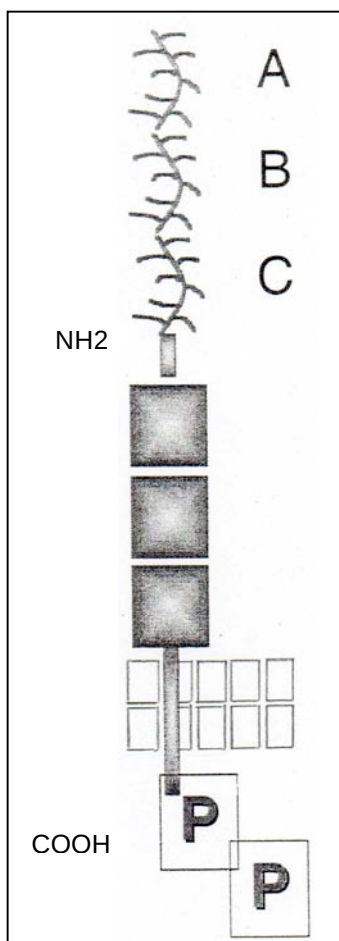
Masse moléculaire : 45 kDa

Ligands : « substrats » : NAD, ADP ribose cyclique ;
ligands : CD31 et autres ?

Expression cellulaire : CD38 est fortement exprimé sur les thymocytes. Il est aussi présent sur les lymphocytes T et B jeunes, les cellules NK, les lymphocytes T activés, les plasmocytes et les globules rouges. Il est absent des lymphocytes au repos.

Principales fonctions : Cette glycoprotéine a les fonctions pléiotropiques d'une ectoenzyme. Elle pourrait aussi jouer un rôle comme récepteur de surface et intervenir dans les voies d'activation cellulaire.

CD45



Autre nom : LCA (*leukocyte common antigen*), T200

Structure moléculaire et famille : Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire. Le *cluster* CD45 rassemble une famille d'isoformes.

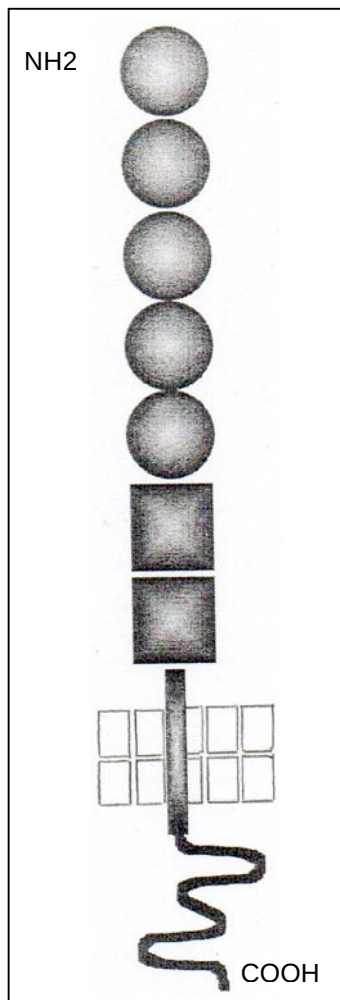
Masse moléculaire : 180 à 220 kDa

Ligand(s) : inconnu(s)

Expression cellulaire : CD45 est exprimé à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques, à l'exception des plaquettes et des globules rouges.

Principales fonctions : Cette molécule a une activité tyrosine phosphatase et joue un rôle régulateur dans les voies de signalisation médiées par l'antigène et l'activation lymphocytaire.

CD56



Autres noms : NCAM (*neural cell adhesion molecule*), NKH1, Leu19

Structure moléculaire et famille : CD56 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig.

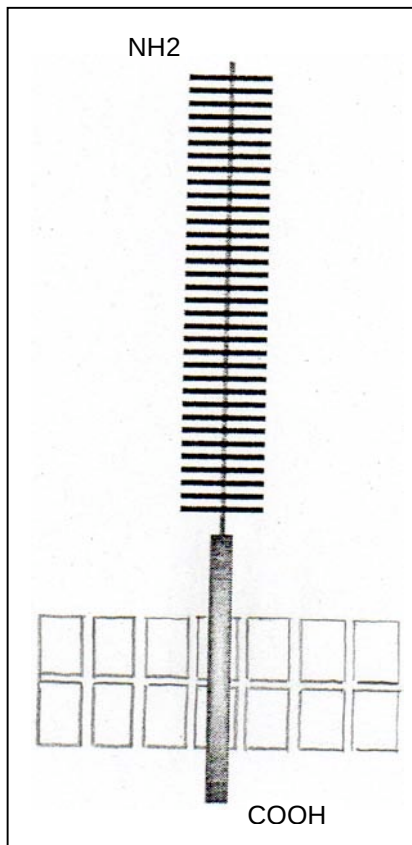
Masse moléculaire : 120 à 140 kDa

Ligands : CD56, héparine sulfate, collagène (?)

Expression cellulaire : En dehors du tissu nerveux, l'expression normale de CD56 est restreinte aux cellules NK et à une petite sous-population de lymphocytes T. Certaines cellules leucémiques et tumorales peuvent également l'exprimer.

Principales fonctions : CD56 intervient dans des liaisons homophiles calcium-indépendantes (tissus embryonnaires et nerveux) et pourrait jouer un rôle dans l'attachement des cellules tumorales aux cellules endothéliales. Sa fonction sur les cellules NK n'est pas claire.

CD138



Autres noms : *syndecan-1*, B-B4, *heparane sulfate proteoglycan*

Structure moléculaire et famille : C'est un protéoglycane.

Masse moléculaire : 80 à 160 kDa

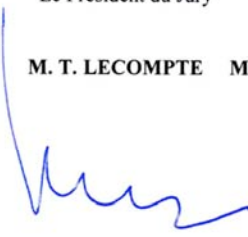
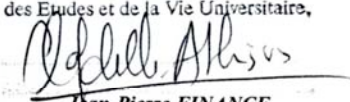
Ligands : facteurs de croissance, matrice extra-cellulaire, cytosquelette

Expression cellulaire : CD138 est présent à la surface des cellules B immatures, des plasmocytes, des cellules épithéliales et des cellules endothéliales des bourgeons capillaires.

Principales fonctions : La portion extra-cellulaire de la molécule se fixe à la matrice extra-cellulaire et retient des facteurs de croissance. La portion intra-cellulaire se lie aux molécules du cytosquelette. Cela permet à CD138 d'intervenir dans l'activité des facteurs de croissance, la mobilité cellulaire et le contrôle de la morphologie des cellules.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : vendredi 8 octobre 2010 à 15 h 30

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE présenté par Lise MORLON-MONNE <u>Sujet :</u> Intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiple. <u>Jury :</u> Président : M. le Professeur T. LECOMPTE (PU-PH, Faculté de Médecine) Directeur : Mme le Docteur V. LATGER-CANNARD (PH) Juges : Mme le Professeur MC. BENE (PU-PH, Faculté de Médecine) M. le Professeur C. VIGNERON (Faculté de Pharmacie) M. le Docteur C. HULIN (PH)	Vu, Nancy, le 30 août 2010 Le Président du Jury Le Directeur de Thèse M. T. LECOMPTE Mme V. LATGER-CANNARD  
Vu et approuvé, Nancy, le 06 SEP. 2010 Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,  Francine PAULUS 	Vu, Nancy, le Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1, Pour le Président et par Délégation, La Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire,  Jean-Pierre FINANCE C. CAPDEVILLE-ATKINSON N° d'enregistrement : 3400

N° d'identification :

TITRE

**Intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire
dans le myélome multiple.**

**Thèse soutenue le 8 octobre 2010
par Lise MORLON épouse MONNE**

RESUME :

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par l'émergence et l'accumulation dans la moelle osseuse d'un clone de cellules plasmocytaires malignes. Bien que largement utilisé et recommandé selon des référentiels bien établis dans la prise en charge des hémopathies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs, l'immunophénotypage des cellules malignes par cytométrie en flux (CMF) ne fait pas partie à ce jour des analyses biologiques de pratique courante dans le MM. Pourtant, le phénotype plasmocytaire est aujourd'hui relativement bien établi, avec d'une part la présence de marqueurs caractéristiques de lignée, permettant d'identifier ces cellules parmi les autres cellules hématopoïétiques analysées, et d'autre part l'expression de marqueurs « aberrants », permettant de différencier phénotypiquement les cellules plasmocytaires malignes de celles physiologiques. Il est ainsi possible d'identifier, caractériser et quantifier les cellules myélomateuses. Les données publiées ces dernières années dans la littérature témoignent de l'intérêt croissant pour l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF, avec un bénéfice clinique potentiel pour les patients chez qui le diagnostic de MM est suspecté ou établi.

L'objet de ce mémoire est précisément d'évaluer l'intérêt de l'analyse phénotypique des plasmocytes par CMF dans la prise en charge des patients atteints de MM. Le volet expérimental de ce travail a consisté en un protocole d'immunophénotypage en CMF 4 couleurs, comprenant 3 marqueurs de repérage des cellules plasmocytaires (CD38/CD138/CD45) et 6 marqueurs de malignité (CD19, CD56, CD28, CD27, CD20 et CD33) analysés de façon indépendante, dans le but de caractériser le clone plasmocytaire malin sur le plan phénotypique dans une population de 50 patients répondant aux critères diagnostiques de MM.

L'analyse des résultats globaux obtenus dans la population étudiée et celle de certains cas particuliers, combinée aux données publiées dans la littérature ces dernières années, nous ont permis d'acquérir une idée plus précise de la place de l'immunophénotypage plasmocytaire par CMF dans la prise en charge de patients atteints de MM, selon 3 axes principaux : **(i) au diagnostic**, par la mise en évidence d'une population plasmocytaire phénotypiquement anormale, monoclonale et non réactionnelle, dans les rares situations où les critères diagnostiques internationaux de MM sont pris en défaut, et/ou lorsque se pose un problème de diagnostic différentiel ; **(ii) pour le pronostic**, par l'identification de marqueurs phénotypiques de valeur pronostique, mais cet aspect reste encore à approfondir ; **(iii) sur le plan thérapeutique**, avec la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et surtout dans le suivi de la maladie, pour l'évaluation de la réponse aux traitements et de la maladie résiduelle. C'est finalement dans ce dernier axe que l'étude phénotypique des cellules myélomateuses par CMF prend tout son intérêt en pratique courante, de part la richesse et la pertinence des informations qu'elle fournit, la sensibilité des techniques et leur applicabilité en pratique clinique.

MOTS CLES : myélome multiple (MM) - plasmocyte - immunophénotypage - cytométrie en flux (CMF) - maladie résiduelle

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr V. LATGER-CANNARD	Service d'Hématologie Biologique CHU de Nancy	Expérimentale ☒ Bibliographique ☐ Thème 5

Thèmes

**1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie**

**2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle**

