

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES

ANNEE : **2022**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Yasmine Lathrache

**Comparaison des deux méthodes NGS et CMF pour analyser la MRD dans le
myélome multiple**

Thèse soutenue le 12 octobre 2022

Directeurs de thèse :
Pr Jill Corre
Dr François Vergez

JURY

Président : Gandia Peggy, PU-PH, chef de service du laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie, IFB Purpan

1er assesseur : Corre Jill, PU-PH, hématologie cellulaire et unité génomique du myélome, IUCT Oncopole

2ème assesseur : Vergez François, MCU-PH, hématologie cellulaire et génétique des hémopathies (immunophénotypage et hématopoïèse), IUCT Oncopole

3ème assesseur : Avet-L'Oiseau Hervé, PU-PH, unité génomique du myélome, IUCT Oncopole

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 4 avril 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme LARGEAUD L	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme AMRANE Dyhia	Chimie Thérapeutique
------------------	----------------------

Remerciements

Aux membres du jury :

A ma présidente de thèse, le Pr Peggy Gandia, professeur des universités et chef de service du laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie à l'IFB Purpan.

Soyez assurée de toute ma considération et de ma gratitude. Merci d'avoir accepté de présider cette thèse.

A ma directrice de thèse, le Pr Jill Corre, professeur des universités et praticien hospitalier au sein du laboratoire d'Hématologie et de l'unité génomique du myélome à l'IUCT.

Au-delà de votre bienveillance, de votre délicatesse et de votre patience tout le long de cette année de travail, je demeure profondément reconnaissante pour le temps passé à répondre à mes innombrables questions.

Merci d'avoir accepté d'encadrer et diriger cette thèse avec autant de gentillesse.

A mon directeur de thèse, le Dr François Vergez, maître de conférences et praticien hospitalier au sein du laboratoire d'Hématologie à l'IUCT.

Je garde en mémoire d'excellents moments durant les « points thèse » grâce à ton enthousiasme et tes conseils. Également navrée du nombre de mails envoyés pour répondre à mes incalculables interrogations.

Merci d'avoir accepté d'encadrer et diriger cette thèse avec autant de bonne humeur.

Au professeur Hervé Avet-L'Oiseau, professeur des universités et praticien hospitalier au sein de l'unité génomique du myélome à l'IUCT.

Vos nombreux travaux et articles ont indubitablement inspiré ce travail de thèse. Merci de m'avoir fait l'honneur de votre participation à ce jury.

A tous ceux qui ont participé à l'élaboration de cette thèse :

Merci à Marie-Laure Nicolau-Travers qui m'a enseignée les bases de l'analyse par cytométrie de flux. Au-delà de ton travail investi et méticuleux, ces quelques heures passées auprès de toi ont révélé une femme pertinente, passionnante et passionnée.

Merci à Sabrina Mahéo pour m'avoir initiée à la complexité du NGS et de la biologie moléculaire. Merci pour ta disponibilité et pour tout le temps accordé.

Merci à l'ensemble des équipes techniques de cytométrie de flux et de l'UGM et à tous les prescripteurs qui ont concouru au prélèvement des échantillons. Sans vous, ce travail n'aurait pas vu le jour.

A mes amis. Merci pour votre indéfectible soutien.

A mes cointernes. Merci pour ces années passées auprès de vous et pour cette évolution que nous poursuivrons ensemble.

A ma famille. Merci d'avoir toujours cru et de continuer à croire en moi. Sans vous rien n'aurait été possible.

A ma mère. Aucun mot ne serait assez poignant pour dire combien je t'aime.

A mon père. Je n'aurai pas pu prétendre à un pilier aussi solide que toi.

A ma sœur. Merci de donner un sens à ma vie.

Introduction et objectifs de travail

La maladie résiduelle minimale ou mesurable (MRD) est définie par la persistance de cellules malignes dans un tissu donné après traitement.

Initialement, le diagnostic et le suivi du myélome multiple reposaient sur l'immunofixation sérique, l'électrophorèse des protéines sériques, le dosage des chaînes légères libres sériques, le dénombrement et la morphologie des plasmocytes ([Mailankody et al 2015](#)). Ces méthodes conventionnelles ne permettent pas de détecter la MRD.

La MRD est actuellement devenue un biomarqueur de choix pour le suivi de la maladie et un critère d'évaluation privilégié au sein des essais cliniques.

En revanche, persiste une réticence liée au manque de consensus et de recommandations des sociétés savantes à propos de l'évaluation de la MRD dans la pratique quotidienne, hors protocoles thérapeutiques spécifiques. La MRD étant un facteur pronostique pertinent, il demeure indispensable de considérer son inclusion au cours de la prise en charge du patient.

Deux méthodes d'évaluation de la MRD sont disponibles : d'une part l'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF), d'autre part le séquençage haut débit (next generation sequencing, NGS).

La biologie moléculaire a longtemps fait débat jusqu'à la mise en œuvre du NGS qui a largement surpassé l'utilisation d'autres méthodes moléculaires (notamment l'ASO-qPCR) car plus sensible et moins contraignant.

De plus, il a montré une plus grande applicabilité avec un meilleur taux d'identification des marqueurs au diagnostic (90 à 92% avec le NGS à ses débuts contre 50-60% avec l'ASO-qPCR), surmontant ainsi l'échec de la détection de la clonalité par l'ASO-qPCR après hypermutation somatique ([Avet-Loiseau et al 2016](#)).

La cytométrie en flux permet de distinguer les plasmocytes polyclonaux normaux des plasmocytes tumoraux en détectant l'expression de marqueurs aberrants ou la disparition de marqueurs normaux à leur surface, associé à la monotypie des chaînes légères. Historiquement, des tests de cytométrie en flux de 4 à 7 couleurs ont été utilisés pour la détection de la MRD et ont montré une forte corrélation avec la survie sans progression et la survie globale ([Munshi NC et al 2017](#)).

Des essais cliniques permettent aujourd'hui d'évaluer le NGS par rapport à la cytométrie de flux. Dans l'étude FORTE, le NGS a été comparé à la CMF, tous deux à une sensibilité de 10^{-5} , chez des patients en rémission complète et a révélé un taux de concordance de 86 % ([Oliva S et al 2020](#)).

L'objectif de cette thèse est de discuter de ces deux méthodes et de comparer leurs performances dans l'évaluation de la MRD au cours du temps chez les patients atteints de myélome multiple, dans les conditions de travail de notre laboratoire.

PLAN

PARTIE I : Généralités à propos du myélome et de la maladie résiduelle minime (MRD)

- I. Définition, notions épidémiologiques
- II. Physiopathologie
 1. Anomalies intrinsèques : cytogénétiques et moléculaires
 2. Anomalies extrinsèques : le tropisme médullaire
- III. Aspects cliniques
 1. Syndrome anémique
 2. Syndrome osseux
 3. Complications rénales
 4. Infections
 5. Hyperviscosité
 6. Diagnostic différentiel : amylose AL (Amyloidosis Light-chain)
- IV. Explorations biologiques
 1. Hémogramme
 2. Bilan immunochimique
 - A. Électrophorèse des protéines sériques et urinaires
 - B. Immunofixation des protéines sériques
 - C. Dosage pondéral des chaînes légères libres sériques
 3. Bilans complémentaires
 4. Confirmation diagnostique
- V. Évaluation pronostique du myélome
- VI. Prise en charge et réponse thérapeutique
 1. Thérapies du myélome multiple
 2. Patients de plus de 65 ans (ou non éligibles à une greffe)
 3. Patients de moins de 65 ans (≤ 65 ans)
 4. Traitements en cas d'échec
 5. Évaluation de la réponse au traitement

PARTIE II : La maladie résiduelle (*minimal/mesurable residual disease, MRD*)

- I. Aspect généraux et intérêt pronostique dans le suivi du myélome
- II. Évaluation de la MRD : les outils techniques
 1. La PCR-ASO
 2. La cytométrie de flux

- A. Fonctionnement de la CMF
 - B. Récepteurs des plasmocytes normaux
 - C. Phénotypage des plasmocytes tumoraux
 - D. Intérêt de la CMF au cours de la prise en charge de la maladie résiduelle du myélome multiple
- 3. Le NGS (next generation sequencing)
 - A. Principe du NGS : recombinaison génétique et hypermutation somatique
 - B. Fonctionnement du NGS
 - C. Intérêt du NGS au cours de la prise en charge de la maladie résiduelle du myélome multiple
 - 4. Quelques études comparant CMF vs NGS

PARTIE III : Comparaison des méthodes de CMF et de NGS pour analyser la MRD dans le myélome multiple

- I. Matériel et méthode
 - 1. NGS : matériel et méthode
 - 2. CMF : matériel et méthode
- II. Résultats
- III. Discussion
- IV. Conclusion

PARTIE IV : Bibliographie

PARTIE I : Généralités à propos du myélome et de la maladie résiduelle (MRD)

I. Définition, notions épidémiologiques

Le myélome multiple (anciennement maladie de Kahler) est une hémopathie maligne liée à l'accumulation d'un clone plasmocytaire dans la moelle osseuse. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le myélome est classé parmi les tumeurs à cellules B matures (Swerdlow SH et al 2008).

Le clone en question s'accompagne de la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale, complète ou non, détectable dans le sérum et les urines.

Le myélome est une maladie rare qui concerne 6 patients pour 100 000 habitants par an soit 5000 nouveaux cas en France chaque année (46% chez la femme, 54% chez l'homme).

Il représente 10 à 12% des hémopathies (1% des cancers).

L'âge médian au diagnostic est de 65 ans. La survenue chez les patients jeunes (enfants, adolescents, jeunes adultes) est exceptionnelle (Kyle RA et al 2009) puisque 2.8% des cas sont diagnostiqués avant 40 ans (Estimation nationale 2010).

Les circonstances de découverte du myélome sont la plupart du temps aspécifiques : altération de l'état général, anomalies biologiques de découverte fortuite, douleurs osseuses...

II. Physiopathologie

L'apparition de plasmocytes tumoraux pourrait être la résultante de facteurs étiologiques divers qui sélectionneraient un clone tumoral et favoriseraient son expansion et sa progression vers différents degrés de malignité.

Une stimulation antigénique sur le long terme, comme lors d'infections chroniques, l'exposition à des corps toxiques (solvants, pesticides...), des facteurs génétiques prédisposants et des facteurs environnementaux seraient incriminés mais leur place réelle dans l'oncogenèse reste difficilement évaluable. Les radiations ionisantes, liées à des expositions accidentelles, pourraient constituer un facteur de risque (Dominik D et al 2007).

Concernant la physiopathologie, certaines hypothèses ont été étayées.

Pour un même patient, il existe dans la moelle des contingents formés de plasmocytes bloqués à différents stades de maturité ; selon Jago et al, il est possible que les plasmoblastes, qui constituent le contingent le plus immature et donc plus prolifératif, soient responsables

de l'expansion du clone tumoral. Ainsi, la plupart des cellules malignes ne forment pas une population cellulaire tumorale proliférative : il s'agirait d'un compartiment de cellules plasmocytaires matures accumulées, alimenté par un compartiment moins dense de plasmoblastes (Jego et al 1999).

Le myélome multiple est lié à deux éléments physiopathologiques largement étudiés : des anomalies intrinsèques aux plasmocytes (qui impliquent des atteintes du génome) et des atteintes extrinsèques (relatives à l'environnement médullaire).

1. Anomalies intrinsèques : cytogénétiques et moléculaires

Pour près de 90% des patients atteints de myélome multiple, on observe des anomalies chromosomiques, impliquées dans l'oncogenèse.

L'hypothèse originale de départ implique que la cellule incriminée au cours du myélome multiple soit probablement centrogerminative ou post-centrogerminative : elle est vraisemblablement postérieure aux événements de mutations somatiques, de sélection et de commutation isotypique des cellules B.

L'immunoglobuline monoclonale sécrétée est dans la majeure partie des cas une IgG (60% des cas), parfois une IgA (20%) rarement une IgD ou E (1-2% des cas) et exceptionnellement une IgM.

L'expression d'une protéine commutée constitue un argument en faveur du caractère post centro-germinatif de la cellule (Feuillard J et al 2000).

Le myélome multiple est caractérisé par des anomalies cytogénétiques à la fois nombreuses et complexes, différentes d'un patient à l'autre et même au sein d'un même patient (différents sous clones peuvent proliférer et évoluer de manière différentielle).

Concernant les anomalies numériques, la **ploïdie** est une donnée capitale de l'étude cytogénétique du myélome. Selon Wuilleme et al, pour 60% des patients, on observe une hyperploïdie jusqu'à 75 chromosomes (47 à 60 en moyenne) (Wuilleme et al 2005). La suite de cette étude, en 2007, menée à nouveau par l'Intergroupe Francophone du Myélome retrouve une hypoploïdie dans 30 à 40% des cas (Avet-L'Oiseau et al 2007).

Des anomalies structurales peuvent s'ajouter aux anomalies de nombre, via les **translocations**.

Selon Fonseca et al, les translocations ont un rôle prépondérant au cours de l'oncogenèse du myélome multiple. Leur prévalence est rapportée de manière quasi similaire par plusieurs équipes de recherches (Avet-L'Oiseau et al 2007, Fonseca R et al 2004, Barille-Nion et al 2003).

Parmi les chromosomes concernés, le chromosome 14, a fortiori le locus 14q32 des chaînes lourdes des immunoglobulines, porte des translocations dans 50 à 70% des cas de myélome multiple. Les translocations des locus 2p12 et 22q11 concernent respectivement les chaînes légères κ et λ , mais demeurent moins fréquentes (Fonseca R et al 2004).

Les translocations apparaissent au cours de la commutation isotypique dans les centres germinatifs. Elles se traduisent par une surexpression du(des) gène(s) – vraisemblablement

des oncogènes – à proximité de l'un des *enhancers* des gènes des immunoglobulines, fortement activés dans les plasmocytes.

Parmi ces translocations, les plus fréquentes sont :

- la translocation t(11 ;14)(p13 ;q32), 20% des cas : impliquant le gène de la cycline D1 qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire
- la translocation t(4 ;14)(p16 ;q32), 15% des cas : elle occasionne la dérégulation de NSD2, histone méthyl transférase impliquée dans le remodelage de la chromatine.

D'autres anomalies moléculaires ont été rapportés dans le cadre du myélome multiple : des mutations, des méthylations de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, la phosphorylation d'oncogènes...

Il n'existe pas une mutation unique dans le myélome ([Robiou du Pont S et al 2017](#)). Une mutation est clonale lorsqu'elle est portée par l'ensemble des cellules du myélome et sous-clonale lorsqu'elle n'intéresse qu'une sous-population.

Les mutations arriveraient plus tardivement par rapport aux phénomènes d'hyperploïdie ou de translocations. Ces mutations peuvent être stables dans le temps chez certains patients. Cependant *a contrario*, les clones peuvent évoluer différemment entre le moment du diagnostic et la rechute.

De manière assez inhabituelle, plusieurs gènes impliqués dans la même voie de signalisation peuvent être mutés (tels que KRAS et NRAS). En technique single-cell, l'analyse des plasmocytes mettrait en évidence l'existence de ce type de mutation non pas dans la même cellule, mais dans des cellules différentes, prouvant la coexistence de plusieurs clones tumoraux dans le MM (environ 5 sous clones pour un même patient) ([Manier S, et al 2017](#)).

A propos des anti-oncogènes, la perte des copies normales du gène p53 est un événement commun à un grand nombre de tumeurs humaines. La délétion del17p, responsable d'une inactivation de p53, est retrouvée chez 10% des patients atteints de myélome multiple. Sa prévalence est de 5 à 8% au diagnostic contre 20 à 40% au regard de stades plus avancés ([Avet-L'Oiseau et al 2007](#), [Fonseca R et al 2004](#)).

La perte de gènes suppresseurs de tumeurs compte également le chromosome 13 (rarement une délétion partielle, majoritairement une délétion totale) : la monosomie 13 est retrouvée chez 40% des patients atteints de myélome (mais également dans d'autres atteintes plasmocytaires malignes) ([Fonseca R et al 2004](#)). Actuellement, il n'est plus conféré à cette délétion de caractère défavorable spécifique.

L'activation d'oncogènes de la famille KRAS et NRAS est également fréquemment impliquée. ([Lomas OC et al 2019](#)).

Finalement, deux grands types d'anomalies cytogénétiques sont observées et séparent grossièrement les patients en deux groupes pronostiques :

- un groupe **hyperdiploïde** qui montre des trisomies portant surtout sur les chromosomes impairs (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19), avec incidence faible d'anomalies structurales, dont le pronostic est favorable ;
- un groupe **non hyperploïde** (40% des myélomes multiples), avec des anomalies structurales et notamment les translocations impliquant les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (majoritairement) (...) de pronostic variable, tel que (de manière non exhaustive) :

Gène impliqué	Locus	Prévalence	Pronostic
Cycline D1 (CCND1)	11q13	15-20% des myélomes multiples	Neutre
NSD2	4p13	15%	Défavorable (mais sensible au VELCADE®)
MAF	16q23	3%	Défavorable
MAFB	20q11	1%	Défavorable
Cycline D3 (CND3)	6p21	1%	Défavorable

Tableau 1 : Récapitulatif non exhaustif des altérations cytogénétiques structurales impliquées dans la physiopathologie du myélome multiple

NSD2 (nuclear receptor SET domain-containing 2)

MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog)

2. Anomalies extrinsèques : le tropisme médullaire

Le stroma de la moelle osseuse constitue le microenvironnement résidentiel des plasmocytes qu'ils soient malins ou non. Leur adhésion à ce microenvironnement leur permet de croître, de proliférer et de survivre.

Parmi les molécules qui permettent l'adhésion des cellules malignes aux récepteurs cellulaires et autres composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine...), on peut citer les β_1 intégrines, les β_2 intégrines, les protéoglycanes et les molécules de la superfamille des immunoglobulines. Certaines de ces molécules sont par ailleurs des marqueurs spécifiques des plasmocytes normaux (CD138, protéoglycane) et tumoraux (CD56, famille des immunoglobulines) ([Harousseau JL et al 2004](#)).

Des couples ligands/récepteurs de cet environnement médullaire participent à l'accueil des plasmocytes après leur migration dans l'endothélium vasculaire depuis les ganglions lymphatiques. Ils contribuent à la croissance du clone tumoral ainsi qu'aux atteintes cliniques détaillées ci-après (notamment la formation de lacunes osseuses ou « géodes »). [Aggarwal et al. propose en 2006 un modèle schématique, non exhaustif, de ces interactions \(Aggarwal et al 2006\)](#).

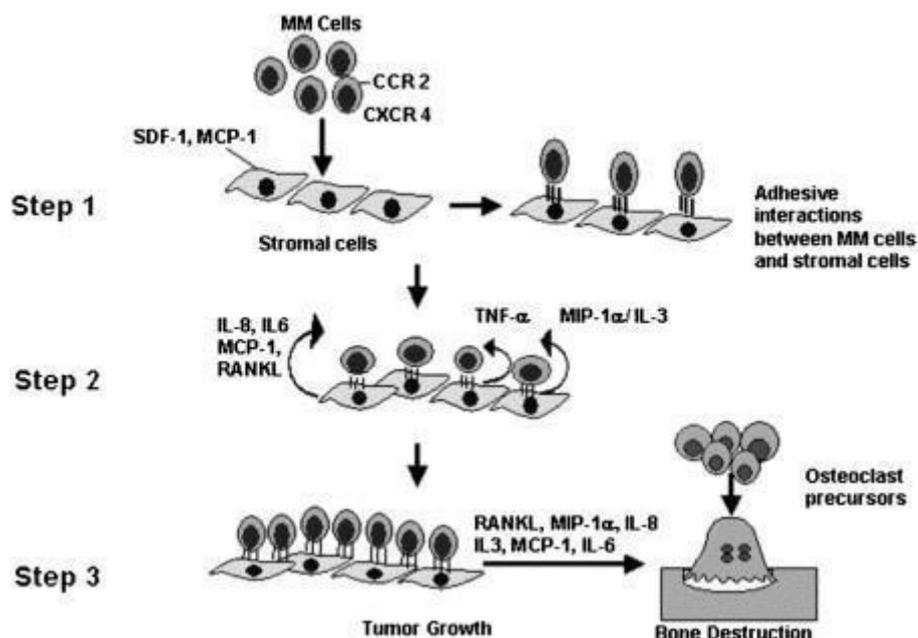


Figure 1 : Principales cytokines/chimiokines impliquées dans la physiopathologie du myélome multiple. Aggarwal et al (2006)

Les interactions entre cellules stromales et plasmocytaires (malignes ou non) sont possibles grâce à l'intervention de cytokines et chimiokines.

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est le prototype du facteur de croissance vasculaire : il est impliqué dans la perméabilité capillaire, la formation de structures capillaires en culture cellulaire et, *de facto*, la formation de néovaisseaux *in vivo*. Au cours du processus d'angiogenèse, il est produit par les plasmocytes tumoraux. Les cellules du stroma répondent à cette synthèse par la sécrétion d'IL6 (interleukine-6), entraînant une surproduction de VEGF par les plasmocytes malins. Cette boucle d'activation est responsable du maintien de l'angiogenèse et de la stimulation de la croissance tumorale (Haroiseau JL et al 2004).

L'IL-6 (interleukine 6) est un facteur de croissance et de survie. Les ostéoclastes et les ostéoblastes de la moelle osseuse la synthétisent. Les plasmocytes malins sont capables de la produire de manière autocrine. De fait, la concentration de cette interleukine est considérablement augmentée chez les patients atteints de myélome multiple (Haroiseau JL et al 2004).

Sprynski AC et al ont mis en évidence le rôle d'IGF1 (insulin growth factor-1) qui contribue à la croissance des plasmocytes tumoraux (Sprynski AC et al 2009).

III. Aspects cliniques

Les signes cliniques caractéristiques peuvent être présents dès le diagnostic (ils sont souvent la raison d'une première consultation) ou apparaître au cours de l'évolution de la maladie. Ils peuvent être spécifiques ou non (altération de l'état général, asthénie relativement bien tolérée, perte de poids modérée) (Kyle RA et al 2003).

1. Syndrome anémique

Le patient atteint de myélome multiple présente un syndrome anémique : pâleur cutanéomuqueuse, asthénie, dyspnée. Le syndrome anémique est souvent le premier signe clinique du myélome multiple.

2. Syndrome osseux

Au diagnostic, près de 70% des patients présentent des atteintes osseuses, 80% dans les cas de maladie avancée (IMWG 2003).

La moelle osseuse est le lieu d'accumulation des plasmocytes tumoraux, et par conséquent le siège de phénomènes d'ostéolyse. Ils résultent d'un remaniement osseux majeur, médié par la diminution de l'activité ostéoblastique et l'augmentation de la résorption osseuse (Roodman et al 2009).

Les ostéoblastes voient leur activité et leur différenciation inhibées par les cytokines et chimiokines secrétées par le plasmocyte tumoral, notamment l'IL-3, l'IL-7 et DKK1 (Dickkopf, inhibiteur de la voie de signalisation Wnt, majeure dans l'ostéogenèse) (Roodman et al 2009).

D'autre part, les ostéoclastes, sous l'action des diverses cytokines/chimiokines, sont exacerbés. Ils sont responsables de l'augmentation de la résorption osseuse, entretenue par de nombreuses molécules dont RANK-L (RANK – ligand, receptor activator for nuclear factor kappa b ligand), IL-6, IL-3, IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Ce processus ostéolytique entraîne la libération de facteurs de croissance qui accroissent la masse tumorale, engendrant une boucle d'amplification de la destruction osseuse (Roodman et al 2009).

Le syndrome osseux intéresse le rachis, le bassin, les côtes, le thorax, les os longs et le crâne.

Les premières lésions ostéolytiques se manifestent prioritairement au niveau des sites d'hématopoïèse, entraînant des tassements vertébraux, parfois compliqués de phénomènes de compression médullaire, visible à l'IRM (imagerie par résonance magnétique).

La compression de la gaine nerveuse est caractérisée par des signes radiculaires qui peuvent entraîner une paraplégie.

Un bilan radiologique standard est indispensable et permet de visualiser l'ensemble des atteintes osseuses. Il s'agit de lésions d'aspect lacunaire, précisément délimitées, dites « à l'emporte-pièce » évoluant volontiers en fractures, tassements vertébraux, tuméfactions osseuses, jusqu'à déminéralisation diffuse de l'os.

Parmi les examens d'imagerie, le PET-scanner est réalisé si le sujet est éligible à la greffe ou en cas de recherche d'une atteinte extra-médullaire ; si le PET-scan n'est pas disponible une IRM corps entier peut être envisagée. L'IRM rachidienne est pratiquée en cas de suspicion d'atteinte neurologique.

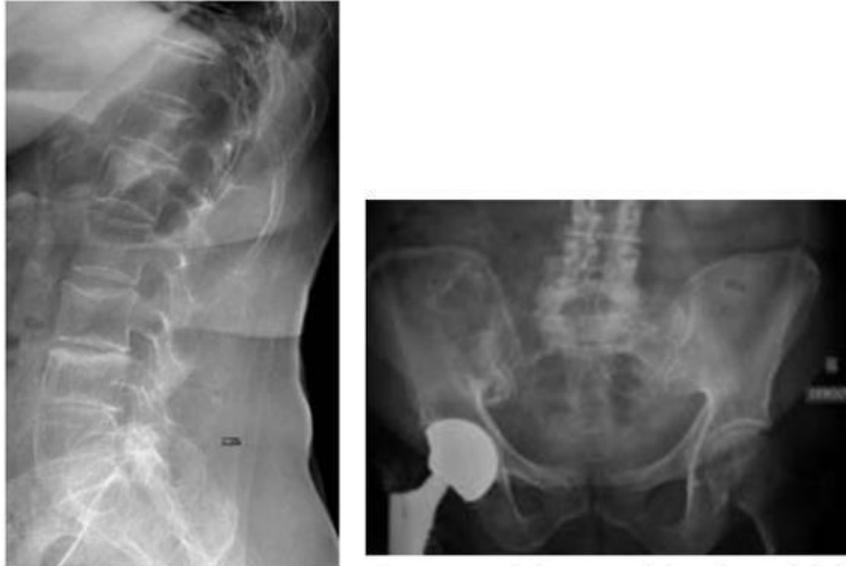


Figure 2 : (A gauche) *Rachis dorsolombaire déminéralisé, sans anomalie évidente de prime abord.* (A droite) *Bassin de face, lésion lytique de l'aile iliaque droite.* Monzani et al. 2010



Figure 3 : *Lésions ostéolytiques dites "à l'emporte-pièce".* Monzani et al. 2010

3. Complications rénales

Les atteintes rénales sont le plus fréquemment observées au cours des myélomes à chaînes légères libres (CLL).

Au diagnostic, 20 à 40% des patients présentent une atteinte rénale, qui est à proprement parler une néphropathie tubulo-interstitielle (« rein myélomateux ») et 10% d'entre eux devront être dialysés (Hutchison CA et al 2007).

Les plasmocytes malins produisent une immunoglobuline monoclonale complète ou formée d'une seule chaîne légère. Dans l'un ou l'autre cas, les capacités de filtration glomérulaire, de réabsorption et de sécrétion rénales sont rapidement dépassées par les quantités de chaînes légères libres (CLL) produites.

Deux actions des CLL sont décrites au niveau rénal : la première concerne leur précipitation intra-tubulaire sous forme de cylindres hyalins, obstruant les tubules rénaux distaux ; la seconde est relative à leur caractère tubulotoxique, induisant l'atrophie de l'épithélium local. Cliniquement, cette tubulopathie se traduit par une insuffisance rénale progressive.

4. Infections

Elles sont la première cause de décès chez les patients atteints de myélome multiple.

Pilier essentiel de la lutte contre les entités pathogènes, la fonction principale des plasmocytes est de produire des anticorps, d'induire et de réguler l'inflammation par la production de cytokines (interleukines 10 et 35 généralement) au cours d'atteintes auto-immunes et infectieuses (Quentin S et al 2019).

L'hypogammaglobulinémie est liée à l'expansion du clone malin dans la moelle osseuse : les plasmocytes produisent physiologiquement des immunoglobulines « antigène-spécifique ». Les plasmocytes tumoraux synthétisent, de manière limitée, une immunoglobuline monoclonale inapte à la fonction de défense immunitaire des plasmocytes car homogène, avec des régions variables des chaînes lourdes et légères identiques.

Les patients atteints de myélome sont donc sujets aux agressions infectieuses, fréquentes et sévères. Il s'agit majoritairement d'infections bactériennes à tropisme respiratoire, rénal ou systémique. Tous les germes peuvent être en cause, avec une prédominance des cocci Gram positif (*Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* au cours des pneumopathies et infections ORL) et des bacilles Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* et *Klebsiella* au décours d'infections rénales).

5. Hyperviscosité

Ce syndrome reste rare et survient dans les cas d'hyperprotéïnémie majeure (liée à l'hyperglobulinémie). Il est par ailleurs plutôt observé dans les myélomes multiples à IgA (dimériques) ou M (pentamériques) du fait de leur capacité de polymérisation.

Les principaux signes cliniques se manifestent par une triade : troubles neurologiques (ralentissement psychomoteur, céphalées, vertiges, acouphènes, états confusionnels dans les formes les plus graves), ophtalmiques (baisse de l'acuité visuelle, phosphènes, myodésopsies) et manifestations hémorragiques (saignements cutanéomuqueux tels que des épistaxis ou des ecchymoses) (Valade S et al 2018).

6. Amylose AL (Amyloidosis Light-chain)

On compte 500 à 600 nouveaux cas par an en France. L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans ; 10% des patients peuvent être touchés avant 50 ans.

L'amylose AL est liée au dépôt extracellulaire organisé en feuillets β plissés, formé par des chaînes légères d'immunoglobulines et d'autres protéines associées (dont le composant amyloïde P).

C'est une atteinte multi-systémique : selon les organes atteints, elle peut aboutir à une cardiopathie restrictive (dont la sévérité peut rapidement engager le pronostic vital), un syndrome néphrotique, des atteintes hépatiques, neurologiques, articulaires, musculaires ou cutanées. Il existe également des formes localisées d'amylose AL (sphère ORL, poumons, voies urinaires notamment).

L'amylose AL est mise en évidence sur biopsie de l'organe atteint (ou de tissus plus accessibles comme les glandes salivaires et la graisse abdominale) et permet d'observer des dépôts extracellulaires colorés par Rouge Congo, dichroïques et biréfringent jaune-vert en lumière polarisée.

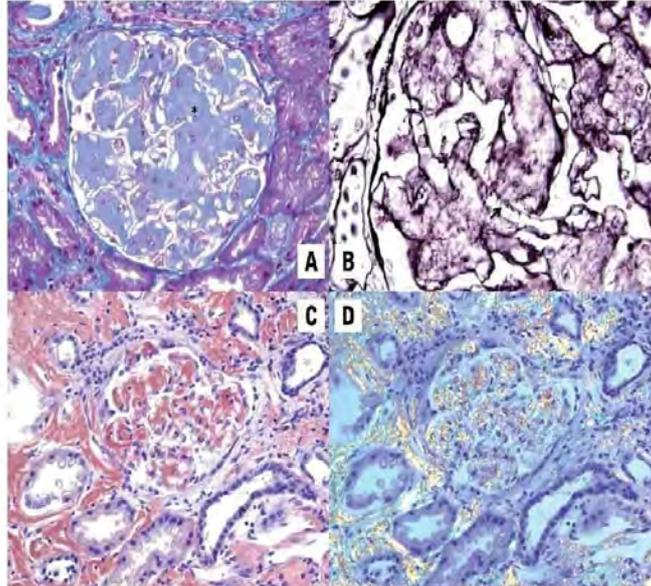


Figure 4 : (A) Amylose AL glomérulaire présentant des dépôts mésangiaux en "ciel d'orage" au trichome bleu de Masson. (B) Dépôts amyloïdes extramembraneux, coloration argentique. (C) Dépôts amyloïdes colorés au rouge Congo, distribution mésangiale et interstitielle. (D) Dépôts amyloïdes mésangiaux et interstitielle : dichroïsme et biréfringence en lumière polarisée. 2018-2022 © Manuel de NÉPHROLOGIE 8^e édition

IV. Explorations biologiques

Le myélome multiple, s'il est fréquemment évoqué devant la symptomatologie clinique précédemment décrite, peut être soupçonné au décours d'anomalies biologiques.

1. Hémogramme

L'hémogramme présente une anémie de nature normochrome, normocytaire et arégénérative, liée à l'insuffisance médullaire.

Du point de vue de la cytologie des globules rouges, un aspect caractéristique des hématies – les rouleaux érythrocytaires – peut être visible sur le frottis.

La leucopénie et la thrombopénie sont rares et de mauvais pronostic. La présence de plasmocytes dans le sang circulant est exceptionnelle.

2. Bilan immunochimique :

Le bilan biochimique, a fortiori le bilan protéique, est perturbé.

Du fait de la présence de l'immunoglobuline monoclonale, la protéinémie peut être élevée.

Au cours du myélome, l'immunoglobuline monoclonale, de structure normale, est produite en quantité massive. Il peut également s'agir d'un fragment d'immunoglobuline, d'une CLL monoclonale ou plus rarement, d'une chaîne lourde. Elle est retrouvée dans les urines où elle est appelée « protéine de Bence-Jones ».

Selon les recommandations de l'HAS, devant toute suspicion de myélome, le bilan biochimique initial comprend le dosage des protéines sériques totales, l'électrophorèse des protéines sériques (EPS) et en fonction des résultats de celle-ci, une immunofixation des protéines sériques. Le bilan protéique sérique s'accompagne d'un bilan urinaire pour lequel la protéinurie des 24h est complétée, en cas d'anomalie, par une électrophorèse des protéines urinaires (EPU) et une immunofixation pour rechercher la protéine de Bence-Jones, qui peut être parfois le seul signe pathologique (Lapalus E et al 2000).

L'International Myeloma Working Group (IMWG) a publié en 2016 les critères de consensus pour l'évaluation de la réponse au traitement (Kumar et al 2016). Ceux-ci impliquent :

- Pour un myélome à immunoglobuline intacte : EPS et dosage des chaînes légères libres
- Pour un myélome à chaînes légères libres : EPU et dosage des chaînes légères libres

Une bonne réponse au traitement est conditionnée par la diminution de la quantité de protéine monoclonale et donc, une diminution du pic à l'électrophorèse.

Chez les patients dont la maladie est mesurable en EPS, on observe pour une réponse partielle une diminution du pic d'au moins 50%, voire 90% dans le cas d'une très bonne réponse partielle. Pour une réponse complète, le pic monoclonal disparaît et l'IF est normale. Pour une réponse complète stringente, le ratio CLL se normalise (Rajkumar SV et al 2011).

A. Électrophorèse des protéines sériques et urinaires

L'électrophorèse du sérum et des urines permet de mettre en évidence la présence d'une immunoglobuline monoclonale ou d'une hypogammaglobulinémie sans Ig monoclonale (15% des cas) et d'évaluer la réponse thérapeutique.

Au diagnostic, l'électrophorèse des protéines urinaires complète l'analyse sérique.

En 2017, l'Intergroupe Francophone du Myélome réaffirme le caractère non substituable du dosage des CLL à l'électrophorèse urinaire qui évalue l'excrétion rénale et caractérise la protéinurie (Dejoie et al 2018).

Deux techniques d'électrophorèse sont utilisables pour le diagnostic et le suivi : l'électrophorèse sérique en gel et l'électrophorèse capillaire.

L'électrophorèse des protéines sériques (EPS) permet de détecter la présence d'une immunoglobuline monoclonale et de la quantifier par intégration densitométrique.

Au cours d'une EPS, les fragments protéiques sériques sont séparés sous l'influence d'un champ électrique, sur un support (acétate de cellulose, agarose). Les protéines se déplacent selon leur mobilité propre, la nature du support (électroendosmose et texture) et le courant d'évaporation. Elles sont par la suite colorées et intégrées par lecture densitométrique. Le tracé électrophorétique forme des pics.

Le pic qui le caractérise, ou pic M (monoclonal), a un aspect étroit, effilé, dit « en clocher d'église » dans la région de la globuline impactée (majoritairement les Y-globulines).

Dans le cas de gammopathies monoclonales bénignes (particulièrement la MGUS, gammopathie monoclonale de signification indéterminée), le pic est plus discret et la protéine de Bence-Jones n'est pas retrouvée dans les urines.

B. Immunofixation des protéines sériques

L'immunofixation ou immunoélectrophorèse est réalisée en cas de pic monoclonal à l'EPS : elle permet le typage de la protéine monoclonale (chaîne lourde et chaîne légère).

Elle repose sur l'immunoprécipitation des chaînes d'immunoglobuline en présence d'antisérums. C'est une technique qualitative, appliquée aux immunoglobulines du sérum, des urines et du liquide céphalo-rachidien (intérêt au cours du suivi de maladies inflammatoires du système nerveux central telles que la sclérose en plaques).

Une bande étroite observée avec un sérum anti-chaîne légère sans correspondance avec une bande au niveau d'un antisérum anti-chaîne lourde, nécessite de poursuivre les investigations. Il convient de réaliser une deuxième immunofixation en testant des antisérums anti-delta (anti IgD) et anti-epsilon (anti IgE), avant de conclure à la présence d'une IgD monoclonale, d'une IgE monoclonale ou (en l'absence de précipité avec ces antisérums) d'une protéine de Bence-Jones. Celle-ci migre à un niveau différent de l'immunoglobuline monoclonale avec laquelle elle est parfois associée car son poids moléculaire est différent (Karfo R et al 2018).

Au cours du myélome, une immunoglobuline G est présente dans 50% des cas, 20 à 25% en ce qui concerne l'IgA. Les IgD et E et M sont plus exceptionnelles. Concernant le myélome à chaînes légères, seule la partie de l'immunoglobuline constituée de chaînes légères est produite (et non pas les chaînes lourdes)

Les chaînes légères retrouvées sont de type κ dans la grande partie des cas (environ deux tiers des cas). Dans 2 % des cas, on observe des myélomes multiples non sécrétant pour lesquels aucune Ig monoclonale complète ou incomplète, sérique ou urinaire, n'est retrouvée (Alexander DD et al 2007).

C. Dosage pondéral des chaînes légères libres

Les chaînes légères libres sont le résultat d'un excès de synthèse lié à la croissance plasmocytaire maligne.

Elles sont dosées par turbidimétrie ou néphélométrie après adjonction au sérum d'un réactif contenant des anticorps anti- κ et anti- λ .

Les indications de ce dosage sont limitées à :

- L'amylose AL (et autres maladies de dépôt des chaînes légères) : diagnostic, suivi et critère de réponse au traitement
- Le suivi de myélome à CLL, myélome pauci sécrétant, myélome non sécrétant et du plasmocytome
- Le suivi des chaînes légères libres néphrotoxiques

Quatre variables sont obtenues à partir de ce dosage :

- La concentration en CLL impliquée, c'est-à-dire en CLL monoclonale (en mg/L)
- La concentration en CLL non impliquée, c'est-à-dire en CLL polyclonale (qui peut être augmentée en cas d'insuffisance rénale, au vu de la diminution du débit de filtration glomérulaire)
- Le ratio $\frac{CLL \kappa}{CLL \lambda}$ qui se pose en indicateur de clonalité

- La différence entre les dosages des deux concentrations précédentes qui conditionnera le suivi de la réponse au traitement

3. Bilans complémentaires

D'autres paramètres biochimiques sont également impactés.

La calcémie : une hypercalcémie (> 115 mg/L ou 2,65 mMol/L) est constatée dans 30% des cas au vu des phénomènes d'ostéolyse.

La concentration sérique de la créatinine : l'accumulation de chaînes légères libres d'immunoglobuline au niveau des tubules rénaux entraîne une insuffisance rénale dans 20% des cas, avec pour résultat une hypercréatininémie et la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG MDRD ou CKD < 40ml/min) et donc, de la fonction d'épuration rénale.

La β 2m sérique, l'albumine et la LDH (lactate déshydrogénase) : la β 2m est le reflet de la masse tumorale et constitue un puissant facteur pronostique lorsqu'elle excède 3mg/L. L'augmentation de la LDH, observée chez 15% des patients, et une hypoalbuminémie font état d'un clone plasmocytaire agressif.

4. Confirmation diagnostique

Un myélome est confirmé après mise en évidence d'une immunoglobuline monoclonale sérique ou urinaire et d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10%.

Le myélogramme est indispensable et peut présenter des anomalies morphologiques au niveau des plasmocytes : contour nucléaire irrégulier, multinucléarité, noyau centré, chromatine blastique, perte de l'archoplasme, cytoplasme flamme

La richesse du myélogramme est variable. Elle peut être normale ou augmentée si l'envahissement est considérable.

Une plasmocytose supérieure ou égale à 10% (au myélogramme ou à la biopsie) est le critère diagnostique principal, mais non le seul. L'infiltration peut être inhomogène et dépend donc du territoire prélevé.

Pour plus de 50% des patients, les plasmocytes médullaires ont un aspect morphologique normal. Certaines dysmorphies (formes blastiques, irrégularités nucléaires) sont corrélées à un pronostic plus défavorable.

Les autres lignées peuvent être diminuées au regard de l'envahissement du clone plasmocytaire.

Une biopsie ostéo-médullaire ou une biopsie osseuse peuvent également être envisagées si le myélogramme est non contributif dans un contexte de forte suspicion diagnostique.

Les analyses cytogénétiques font partie intégrante du bilan médullaire. Les techniques de FISH ou NGS sur plasmocytes triés recherchent les 4 anomalies pronostiques les plus fréquentes : del(17p), del(1p32), t(4;14) et gain 1q21. La translocation 11;14 peut être recherchée *a posteriori*, dans le cas d'études cliniques ciblées, sur du matériel tumoral congelé (non pas à visée pronostique mais thérapeutique : sensibilité aux inhibiteurs de BCL2).

Différentes formes cliniques peuvent être observées :

MGUS (gammopathie monoclonale de signification indéterminée, <i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>)	Myélome multiple asymptomatique ou myélome indolent	Myélome multiple symptomatique
Absence de signes cliniques (critères CRAB* et slimCRAB, décrits ci-après)	Absence de signes cliniques (critères CRAB et slimCRAB, décrits ci-après)	Signes cliniques (au moins un critère CRAB* ou slimCRAB, décrits ci-après)
Immunoglobuline monoclonale détectée mais <30g/L ET Plasmocytose médullaire <10%	Immunoglobuline monoclonale ≥30g/L Ou protéine monoclonale urinaire ≥ 500mg/24h Ou plasmocytose médullaire entre 10-60%	Immunoglobuline urinaire et sérique ET/OU Plasmocytose médullaire ≥10%

*CRAB : Calcium – Renal failure – Anemia – Bone lesions/pain

Tableau 2 : Critères diagnostiques des MGUS, myélome indolent et myélome multiple

La MGUS précède le myélome mais n'est pas systématiquement détectée du fait de l'absence de symptomatologie clinique. Cette gammopathie intéresse 6.1% des patients de 70 ans et plus (Alaterre E 2017). Le temps de passage au « stade myélome » est variable. Ainsi, la MGUS nécessite une surveillance annuelle ou biannuelle basée sur un examen clinique, l'électrophorèse des protéines sériques et la protéinurie des 24h à laquelle on adjoindra une électrophorèse des protéines urinaires si la protéinurie est significative.

Le myélome multiple symptomatique est défini par les critères cliniques de l'OMS depuis 2014, récemment revus en 2017 (Rajkumar SV 2016) :

- Une plasmocytose médullaire supérieure ou égale 10% ou présence d'un plasmocytome médullaire ou extra médullaire
- Au moins une anomalie clinico-biologique (dysfonction d'organe) définissant le myélome (*myeloma defining event*) parmi :
 - Les critères CRAB :
 - Calcémie >2.65mM (>11,5mg/dL) sans autre cause différentielle comme l'hyperparathyroïdie
 - Insuffisance rénale attribuable au myélome (avec une clairance de la créatinine inférieure à 40ml/min)
 - Anémie : hémoglobine <10g/dL
 - Au moins une lésion osseuse lytique (≥ 5mm) visible en technique d'imagerie : ostéolyse, tassement vertébral ostéoporotique
 - Les marqueurs de malignité (nouveaux critères dits slimCRAB) :
 - Au moins deux lésions nodulaires focales à l'IRM (≥ 5mm)
 - Une plasmocytose médullaire clonale ≥ 60%
 - Un ratio $\frac{\text{chaîne légère libre impliquée}}{\text{chaîne légère libre non impliquée}} > 100$

V. Évaluation pronostique du myélome

Les facteurs pronostiques permettent de guider les options thérapeutiques. Ils sont inhérents à la fois à la maladie et au patient.

Parmi les facteurs pronostiques "patient-dépendants", l'âge est un critère déterminant dans l'initiation de la stratégie thérapeutique : il implique un processus de sénescence des fonctions physiologiques et immunologiques, altérant la lutte contre les atteintes notamment tumorales. Le traitement choisi dépend ainsi étroitement de la survenue de comorbidités liées à l'âge (Patel BG et al 2020).

Parmi les facteurs pronostiques "maladie-dépendants", trois paramètres biochimiques sont historiquement retrouvés dans les premières classifications.

L'albumine est généralement diminuée au cours du myélome multiple : une albuminémie <35g/L est le reflet d'un clone agressif. Cette diminution est corrélée à une augmentation de la concentration d'IL-6 dans le sang, interleukine pro-inflammatoire en partie responsable de l'accumulation et l'expansion du clone plasmocytaire. L'IL-6 inhiberait la synthèse de l'albumine dans le foie. (Kim JE et al 2010).

La β 2-microglobuline (β 2m) est un marqueur primordial car son dosage présente un intérêt en tant que marqueur de masse tumorale et index d'évolutivité et de pronostic dans différentes maladies du système hématopoïétique (notamment le myélome multiple et autres lymphopathies). Elle est d'autant plus élevée que la masse tumorale est importante ; cependant au vu de son élimination rénale elle peut être augmentée devant une situation d'insuffisance rénale, non rare chez les patients atteints de myélome multiple. C'est donc un facteur important mais dont la signification n'est pas univoque (Barlogie B 2001).

La LDH est un marqueur relargué au cours de processus de lyse cellulaire ou d'altération tissulaire. Étant donné son caractère ubiquitaire, son augmentation est fréquemment retrouvée au cours de diverses situations (anémies hémolytiques, maladie pulmonaire, cytolyse hépatique, lymphopathies, atteintes myocardiques, leucémies, prise médicamenteuse, activité physique...). Malgré son manque de spécificité, chez les patients atteints de myélome multiple, des concentrations sériques élevées de LDH sont associées à un mauvais pronostic (Bouafia F et al 2004).

L'index de prolifération plasmocytaire (PCLI, Plasma Cell Labeling Index) est calculé à partir de la proportion de plasmocytes en phase S du cycle cellulaire, correspondant à la mitose cellulaire (cette proportion est déterminée après lecture par immunofluorescence des plasmocytes marqués). Le PCLI est un facteur prédictif de la survie dans les cas de myélomes multiples nouvellement diagnostiqués ; cependant, la signification clinique d'un PCLI élevé dans un petit nombre de plasmocytes monoclonaux de la moelle est inconnue. Les patients ayant un index élevé au diagnostic ont une survie globale plus courte que ceux avec un index faible. (Boccardo M et al 1984). Contrairement à la cytométrie de flux, il ne s'agit pas d'une technique capable de différencier les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux.

Etabli en 2005, l'index pronostique international (*ISS, International staging system for multiple myeloma*) reprend la classification historique des facteurs pronostiques par Durie et Salmon (Greipp et al 2005). Il a longtemps permis de classer les patients en trois stades de survie :

Stade 1	Stade 2	Stade 3
$\beta 2m < 3,5 \text{ mg/L}$ Et Albumine $\geq 35 \text{ g/L}$	$\beta 2m < 3,5 \text{ mg/L}$ Et albumine $< 35 \text{ g/L}$ Ou $3,5 \leq \beta 2m < 5,5 \text{ mg/L}$	$\beta 2m \geq 5,5 \text{ mg/L}$
Survie médiane 62 mois	Survie médiane 44 mois	Survie médiane 29 mois

Tableau 3 : Index pronostique international (ISS)

En 2015 ce score historique a été révisé par l'International Myeloma Working Group (Palumbo A et al 2015). Le dosage de la LDH sérique et les caractéristiques cytogénétiques des plasmocytes (anomalies cytogénétiques de haut risque) détectées par FISH, SNP-array ou NGS, viennent compléter cette précédente classification pour donner le R-ISS (Revised International Staging System for multiple Myeloma).

Ces anomalies chromosomiques sont au nombre de trois, intégrées au R-ISS : la délétion 17p (del(17p)) et les translocations t(4 ;14) et t(14 ;16).

En 2019, l'IFM propose un nouveau score, le score LP (Linear Predictor) (Perrot A et al 2019) qui tient compte des six anomalies cytogénétiques pronostiques indépendantes retrouvées dans le myélome multiple. Ces anomalies sont pondérées par des coefficients (plus le coefficient est élevé, plus l'impact pronostique est négatif) pour permettre d'établir le score. Ces anomalies sont la trisomie 5 (la seule protectrice), la trisomie 21, la translocation t(4 ;14), le gain 1q, la délétion 1p32 et enfin la délétion 17p.

Critères	Risque	Probabilité de survie a 5 ans (%)
$LP \leq 0$	Bas	> 75
$0 < LP \leq 1$	Intermédiaire	50 – 75
$LP > 1$	Haut	< 50

Tableau 4 : le score LP (Linear Predictor)

La classification mSMART, établie et utilisée par la Mayo Clinic (à Rochester, dans le Minnesota) depuis 2007 (revue en mars 2022) stratifie les patients en haut risque versus risque standard afin de leur proposer une stratégie thérapeutique idéale. Les traitements sont adaptés en fonction de l'éligibilité à l'autogreffe et des anomalies cytogénétiques.

Haut risque	Risque standard
Anomalies cytogénétiques de haut risque : <ul style="list-style-type: none"> - t(4;14) - t(14;16) - t(14;20) - del17p - mutation p53 - gain 1q 	Toutes les autres anomalies génétiques à l'exception de celles mentionnées en "haut risque" incluant : <ul style="list-style-type: none"> - les trisomies - t(11;14) - t(6;14)
R-ISS stade III	

PCLI (plasma cell labeling index) élevé Profil d'expression des gènes (GEP, gene expression profiling) : haut risque	
Double Hit Myeloma : 2 anomalies génétiques de haut risque Triple Hit Myeloma : au moins 3 anomalies génétiques de haut risque	

Tableau 5 : Classification rSMART de la Mayo Clinic

VI. Prise en charge thérapeutique

Un bilan pré-thérapeutique sera initialement nécessaire pour enclencher la mise en route du traitement et définir le pronostic (notamment par l'évaluation en radiographie de la gravité des lésions ostéolytiques et les bilans biologiques tels que cités précédemment). Ce bilan est constitué de plusieurs examens :

- ECG
- Échographie cardiaque avec mesure de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) pour les sujets éligibles à l'intensification avant autogreffe, en cas de traitement par carfilzomib ou encore en cas de comorbidités
- Exploration des fonctions respiratoires (EFR)
- Orthopantomogramme (OPT) et consultation dentaire avant l'administration de biphosphonates
- Évaluation du statut vaccinal (hépatite B, grippe, COVID, pneumocoque)
- Évaluation oncogériatrique des patients de plus de 80 ans, ou plus de 75 ans avec comorbidités

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour le myélome.

Le traitement du myélome est globalement initié uniquement chez les patients présentant un myélome multiple symptomatique. Les patients atteints de MGUS et de myélome indolent relèvent de l'abstention thérapeutique, ne dispensant pas un suivi régulier de l'évolution de la maladie.

Le protocole thérapeutique, s'il est initié, est le fruit d'un consentement éclairé du patient et l'avis rendu en réunion de concertation pluridisciplinaire.

La prise en charge du myélome est adaptée au patient et à la maladie. Elle doit permettre de préserver la qualité de vie en proposant par exemple des soins de support : formalisés par le Plan cancer, ils comprennent la prise en charge psychologique du patient et de ses proches, le suivi des effets iatrogènes des traitements, la prise en charge nutritionnelle, le traitement de la douleur, les soins palliatifs. Utiles à tous les stades de la maladie, ils sont coordonnés par le médecin traitant.

Le patient est informé du caractère chronique de son atteinte, de l'évolution, des types de traitements envisageables sans oublier leurs risques iatrogènes.

Les équipes médicales et acteurs de soin (hématologue, radiologue, radiothérapeute, chirurgien, médecin du travail, etc.) en charge accompagnent le patient et ses proches dans l'acquisition et le maintien de compétences qui vont permettre de gérer au mieux la maladie (Kyle RA et al 2009, HAS MM 2010, Gay F et al 2019).

1. Thérapies du myélome multiple

Parmi les traitements chimio thérapeutiques utilisables, on compte historiquement les **antinéoplasiques immunosuppresseurs** que sont le melphalan (ALKERAN®) et la cyclophosphamide (ENDOXAN®), en raison de leurs propriétés cytotoxiques.

Les **corticoïdes** utilisés sont typiquement la prednisone et la dexaméthasone, dont les effets indésirables nombreux (diabète cortico-induit, ostéoporose, atrophie cutanée, retard à la cicatrisation, cataracte, risque infectieux...) sont dose-dépendant. Une alimentation pauvre en sel et riche en protéide est conseillée pour pallier à l'iatrogénie métabolique de ces médicaments et une surveillance accrue est nécessaire en cas d'antécédent d'ulcère gastroduodéal. Des interactions médicamenteuses sont possibles s'il est prescrit au patient de manière concomitante des antidiabétiques ou des anticoagulants, ce qui nécessite de même, un suivi particulier.

Les traitements **immunomodulateurs (IMiDs)** utilisés dans le traitement du myélome (ils sont notamment un traitement de 1^{ère} ligne standard chez le sujet âgé) sont le thalidomide, le lenalidomide et le pomalidomide.

Le thalidomide (THALIDOMIDE CELGENE®) est un traitement antiangiogénique de 1^{ère} ligne de traitement chez le sujet de plus de 65 ans ou non éligible à la greffe. Parmi ces effets indésirables, on compte la survenue de neuropathies, le risque de thromboses artérielle et veineuse (prophylaxie antithrombotique nécessaire) et l'effet tératogène (contraception et suivi strict de la femme en âge de procréer).

Le lenalidomide (REVLIMID®) est un immunomodulateur. Il présente le même caractère iatrogène que le thalidomide. Certaines atteintes hépatiques graves ont pu être observées (effet dose-dépendant).

Le pomalidomide (IMNOVID®) est utilisé en association chez des patients en rechute ou réfractaires à au moins deux lignes de traitement préalables. Ses effets indésirables sont similaires à ceux du thalidomide, auxquels s'ajoutent le risque de cytopénie multi lignées (anémie, neutropénie, thrombopénie). Un risque hépatique subsiste (survenue d'hépatite aigüe et réactivation du virus de l'hépatite B).

Les **inhibiteurs du protéasome (IPs)** sont le bortezomib (VELCADE®), le carfilzomib (KYPROLIS®) et l'ixazomib (NINLARO®).

Cette classe pharmacologique inhibe l'activité chymotrypsine-like du protéasome 26S chargé de la dégradation de protéines qui fixent l'ubiquitine. Cette voie ubiquitine-protéasome participe à l'homéostasie intracellulaire. Cette inhibition entraîne l'apoptose de cellules malignes.

Les patients sous **bortezomib** en monothérapie présentent très peu d'effets indésirables (asthénie, anorexie modérée, troubles digestifs, cytopénies rares). Son potentiel tératogène contre-indique sa prescription au cours de la grossesse.

Le carfilzomib a une AMM dans le traitement des patients atteints myélome multiple et ayant reçu au moins un traitement antérieur en association, soit avec daratumumab + dexaméthasone, soit avec lenalidomide + dexaméthasone, soit avec la dexaméthasone seule. Selon l'HAS, dans le cas de patients ayant déjà reçu au moins une ligne de traitement, l'ajout de carfilzomib à l'association lenalidomide/dexaméthasone est un progrès thérapeutique modéré par rapport à la bithérapie lenalidomide + dexaméthasone, ce qui en fait par là même, une option thérapeutique à privilégier (synthèse d'avis de la Commission de la Transparence, HAS, février 2018).

L'**ixazomib** est un inhibiteur du protéasome, administré per os, hautement sélectif et réversible. Il se lie à la sous-unité $\beta 5$ du protéasome pour inhiber son activité protéolytique et induire l'apoptose des cellules myélomateuses. Il est administré chez des patients ayant connu une récurrence après plusieurs lignes de traitements, dont des lignes impliquant d'autres inhibiteurs du protéasome. En association, notamment avec le lenalidomide, on observe des effets cytotoxiques synergiques.

Les **anticorps monoclonaux** sont également une option thérapeutique d'intérêt au cours du traitement du myélome multiple.

Le **daratumumab** (DARZALEX®) est un anticorps monoclonal de type IgG1 κ qui se lie à la protéine CD38 à la surface des cellules plasmocytaires tumorales. C'est un puissant inhibiteur de croissance in vivo des cellules malignes exprimant le CD38. Le daratumumab induit une lyse des cellules tumorales par cytotoxicité dépendante du complément, cytotoxicité dépendante des anticorps et phagocytose cellulaire dépendante des anticorps. Ses effets indésirables les plus récurrents sont peu graves (asthénie, atteinte hématologique modérée, troubles digestifs, myalgies etc.).

Depuis 2020, l'**isatuximab** (SARCLISA®) a reçu l'AMM en association avec le pomalidomide et la dexaméthasone pour le traitement des patients adultes atteints de myélome multiple en rechute et réfractaire, avec moins de deux lignes de traitements antérieures incluant le lenalidomide et un inhibiteur du protéasome et dont la maladie a progressé lors du dernier traitement. L'isatuximab est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie à un épitope extracellulaire spécifique du récepteur CD38 et conduit à la mort des cellules tumorales exprimant CD38. L'isatuximab agit par des mécanismes dépendant du Fc de l'IgG, notamment la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps et la cytotoxicité dépendante du complément.

Le **panobinostat** (FARYDAK®) en association avec le bortezomib et la dexaméthasone, est un cytotoxique indiqué dans le traitement des patients adultes atteints de myélome multiple en rechute ou réfractaire ayant déjà reçu au moins deux lignes de traitement antérieur incluant du bortezomib et un agent immunomodulateur. C'est un inhibiteur de l'histone désacétylase (HDAC). Les HDAC catalysent l'élimination des groupements acétyle des résidus lysine des histones et de certaines autres protéines. L'inhibition de ces enzymes entraîne une accumulation d'histones acétylés, entre autres H3 et H4, induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose de cellules malignes. Selon l'HAS, il représente un traitement de dernier recours tant le rapport bénéfice/risque est faible (synthèse d'avis de la Commission de la Transparence, HAS, mai 2016).

Le **bélantamab mafodotin** peut être discuté en cas de dernier recours, lorsqu'au moins 4 lignes de traitement ont échoué, que la maladie est réfractaire à au moins un inhibiteur du

protéasome (bortezomib, carfilzomib), un agent immunomodulateur et un anticorps monoclonal anti-CD38 ou que le myélome a progressé malgré le dernier traitement. C'est un anticorps monoclonal humanisé IgG1 conjugué à un agent cytotoxique, le maléimidocaproyl mono méthyl auristatine F (mcMMAF). Le bécantamab mafodotine est rapidement internalisé dans le plasmocyte après fixation au BCMA. Dans la cellule maligne, le mcMMAF perturbe le réseau de microtubules, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et donc, l'apoptose. Une autorisation de mise sur le marché "conditionnelle" a été délivrée pour ce médicament.

L'idécabtagène vicleucel (ou ide-cel, ABECMA®) est une immunothérapie autologue à lymphocytes T. Ces lymphocytes T portent le récepteur antigénique chimérique (CAR, *chimeric antigenic receptor*) : ce sont des CAR-T cells qui constituent depuis leur avènement, une option thérapeutique innovante dans la lutte contre certaines hémopathies. Ces cellules sont élaborées à partir des lymphocytes T du patient. Ils sont sélectionnés, traités par leucaphérèse et, une fois modifiés génétiquement et réinjectés, sont capables de reconnaître et détruire les cellules malignes ciblées. La construction CAR cible notamment BCMA, antigène de maturation des lymphocytes B, présent à la surface des plasmocytes malins et normaux. La prolifération de ces lymphocytes T CAR+ induit une sécrétion cytokinique chargée de lyser les cellules exprimant BCMA. Une surveillance accrue pendant et post traitement est indispensable du fait des nombreux effets indésirables (syndromes de relargage cytokinique et atteintes neurologiques). Sur la base de l'essai KarMMa, Munshi NC et al ([Munshi NC et al 2021](#)) ont mené une étude de phase 2 pour prouver la sécurité et l'efficacité de cette thérapie chez des patients atteints de myélome multiple récidivant et réfractaire. Les patients recrutés avaient déjà connu au moins trois lignes de traitements antérieurs (parmi lesquels un inhibiteur du protéasome, un IMiD et un anticorps anti CD38). Parmi les 140 patients initialement présents, 128 ont reçu de l'ide-cel. L'ide-cel a induit des réponses probantes chez la plupart des patients : après un suivi médian de 13 mois, 73% d'entre eux ont eu une réponse et 33% ont eu une réponse complète ou mieux. Le statut négatif pour la MRD (seuil fixé à 10^{-5}) a été confirmé chez 26% des patients. La survie médiane sans progression était de 8,8 mois. Les effets indésirables décrits comprenaient la neutropénie (91%), l'anémie (70%) et la thrombopénie (63%). Un syndrome de libération des cytokines est observé chez 107 (84%). Des effets neurotoxiques sont apparus chez 23 patients (18%). Des cellules CAR-T ont été retrouvées chez 29 (59%) des 49 patients revus à 6 mois et chez 4 (36%) des 11 patients revus 12 mois après la perfusion.

Le **teclistamab** est un anticorps bispécifique dirigé à la fois contre le CD3 (à la surface des lymphocytes T) et contre l'antigène BCMA exprimé à la surface des plasmocytes tumoraux. Il redirige les cellules T vers ces cellules myélomateuses pour induire leur destruction. L'étude MajesTEC-1 de phase I/II a évalué l'innocuité et l'efficacité du teclistamab chez des patients atteints de myélome multiple en rechute. Au suivi médian de 14 mois, Moreau P et al ([Moreau P et al 2022](#)) ont observé un taux de réponse globale de 63% parmi 165 patients atteints de myélome multiple ayant reçu du teclistamab, avec au moins une réponse complète atteinte chez 39,4% des patients. Les réponses au teclistamab sont potentiellement durables et profondes : 46% des patients n'avaient pas de MRD détectable. La durée médiane de survie sans progression était de 11,3 mois. Tout comme pour l'idécabtagène, les événements indésirables les plus communs étaient des perturbations hématologiques : neutropénie (64%), anémie (37%), lymphopénie (32%) et thrombopénie (21%). Des infections ont été

observées chez plus de 75% des patients. Le syndrome de libération des cytokines était l'évènement immunologique le plus redondant (72%).

2. Patients de plus de 65 ans (ou non éligibles à une greffe)

Chez les sujets symptomatiques âgés (> 65 ans), l'autogreffe n'est pas envisageable et seule une association thérapeutique cyclique, sans intensification est applicable.

Parmi les associations recommandées en première intention, on compte :

- VMP (bortezomib, melphalan, prednisone) et daratumumab selon le schéma ALCYCLONE en 9 cycles
- VRd (bortezomib, lenalidomide, dexaméthasone faible dose) selon le protocole MAIA

3. Patients de moins de 65 ans (≤ 65 ans)

Chez les sujets symptomatiques jeunes (< 65 ans), la prise en charge thérapeutique dure environ 6 mois en fonction des réponses thérapeutiques.

La phase d'induction est composée de cycles de VTD-Dara (cycle de 28 jours) : bortezomib VELCADE®, thalidomide, dexaméthasone et daratumumab. S'en suit l'étape de recueil d'un à deux greffons de CSP (cellules souches pluripotentes) par cytophérèse.

L'administration de melphalan à haute dose constitue l'étape d'intensification et précède l'autogreffe de CSP. En cas de haut risque cytogénétique, une double intensification (hors protocole) est discutée au cas par cas.

La consolidation est mise en place après l'autogreffe avec 2 cycles de Dara-VTD supplémentaires. Dans le cas où le patient présente une neuropathie périphérique il est possible d'envisager le remplacement du thalidomide par du lenalidomide.

L'entretien ou phase de maintenance par lenalidomide dure deux ans (21 jours sur 28) ou plus selon la progression de la maladie.

4. Traitements en cas d'échec

Au cours des rechutes du myélome, d'autres associations de médicaments peuvent être mises en place, qui comprennent : thalidomide, lenalidomide, bortezomib, carfilzomib et ixazomib. Ces médicaments peuvent être associés aux molécules classiques, dont les alkylants et les corticoïdes.

En cas de première rechute non réfractaire au lenalidomide, le traitement est choisi en fonction de nombreux aspects cliniques et biologiques (comorbidités, traitements précédents, anomalies cytogénétiques...). D'autres associations sont possibles en cycles de 28 jours jusqu'à progression :

- KRd (carfilzomib, lenalidomide, dexaméthasone) selon le protocole ASPIRE
- DRd (daratumumab, lenalidomide, dexaméthasone) selon le protocole POLLUX
- IRd (ixazomib, lenalidomide, dexaméthasone) selon le protocole TOURMALINE

Si cette première rechute est réfractaire au lenalidomide, des alternatives thérapeutiques, toujours en association, sont permises, jusqu'à progression :

- DVd (daratumumab, bortezomib, dexaméthasone) selon le protocole CASTOR

- Kd (daratumumab, dexaméthasone) selon le protocole ENDEAVOR en cycles de 28 jours
- Pan-Vd (panobinostat, bortezomib, dexaméthasone) selon le protocole PANORAMA en cycles de 21 jours
- PVd (pomalidomide, bortezomib, dexaméthasone) selon le protocole OPTIMISMM en cycles de 21 jours
- DKd (daratumumab, carfilzomib, dexaméthasone) selon le protocole CANDOR en cycles de 28 jours

En cas de rechutes ultérieures, d'autres schémas sont mis en place :

- Pom-Ed (pomalidomide, cyclophosphamide, dexaméthasone) selon le schéma de Baz et al en cycle de 28 jours
- Isa-Pom-Dex (isatuximab, pomalidomide, dexaméthasone) selon le schéma ICARIA en cycles de 28 jours
- Belantamab madofotin selon le schéma DREAMM2 en cycles de 21 jours

5. Evaluation de la réponse au traitement

La réponse au traitement repose sur la réalisation périodique de myélogramme et le suivi du pic monoclonal dans le sérum et les urines.

La progression ou la rechute de la maladie chez le patient sont évaluées au regard de multiples bilans :

- L'hémogramme (incluant le nombre de réticulocytes et la réalisation d'un frottis sanguin)
- L'ionogramme complet (notamment l'urée, la créatinine, le bilan hépatique, le bilan phosphocalcique)
- L'électrophorèse et l'immunofixation des protéines sériques, le dosage des immunoglobulines et des chaînes légères libres sériques (sFLC : Serum Free Light Chain)
- Le suivi d'une IgD (cas du myélome à IgD)
- La protéinurie des 24H, l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines urinaires

Les critères de l'IMWG relatifs à la réponse aux traitements sont décrits comme suit ([Kyle RA, Rajkumar SV, 2009](#)) :

Nature de la réponse	Critères
Réponse Complète (RC)	Immunofixation négative du sérum et des urines Et disparition de tout plasmocytome des tissus mous Et plasmocytose médullaire < 5 %
Réponse Complète Stringente (ou Stricte)	Critères de RC Et ratio des CLL ^a sériques normal (0,26 -1,65) Et absence de plasmocytes clonaux en immunohistochimie ou en cytométrie de flux (2-4 couleurs)

Très Bonne Réponse Partielle (TBRP)	Détection du composant monoclonal dans le sérum et les urines par immunofixation mais non à l'électrophorèse Ou diminution $\geq 90\%$ du composant monoclonal sérique avec composant monoclonal dans les urines < 100 mg/24h
Réponse Partielle (RP)	Diminution $\geq 50\%$ du composant monoclonal dans le sérum et diminution $\geq 90\%$ du composant monoclonal dans les urines (ou diminution à moins de 200 mg/24h) Et diminution $\geq 50\%$ de la taille des plasmocytomes des tissus mous si présents initialement
Réponse Minimale (RM) pour les patients en rechute et/ou réfractaires	Diminution du composant monoclonal dans le sérum comprise entre 25 et 49 % et diminution du composant monoclonal dans les urines de 24h comprise entre 50 et 89 % (mais qui reste >200 mg/24h) Et diminution de la taille des plasmocytomes des tissus mous si présents initialement comprise entre 25 et 49 % Et absence d'augmentation de la taille des lésions osseuses existantes
Maladie Progressive (MP)	En prenant en compte la plus petite valeur de réponse obtenue, augmentation $\geq 25\%$ du composant monoclonal sérique (augmentation absolue requise d'au moins 5 g/l), et/ou du composant monoclonal urinaire (augmentation absolue requise d'au moins 200 mg/24 h) Et/ou apparition de nouvelles lésions osseuses ou de plasmocytomes des tissus mous ; ou augmentation significative de la taille des plasmocytomes des tissus mous ou des lésions osseuses existantes Et/ou apparition d'une hypercalcémie directement imputable à la maladie plasmocytaire (calcémie corrigée $>11,5$ mg/dl ou $> 2,75$ mmol/l)

^aCLL = chaînes légères libres sériques.

Tableau 6 : Critères de réponse au traitement établis par l'IMWG

Malgré l'établissement de ces critères de réponse thérapeutique, parmi les patients catégorisés RC, dans les 4 ans suivant la thérapie initiale, on observe près de 40% de rechute et 30% de mortalité. Ces critères demeurent donc insuffisants quant à la prédiction d'une réponse capable de se maintenir dans le temps (Kyle RA et al 2009, HAS MM 2010, Gay F et al 2019).

La rechute après rémission complète obéit à divers critères et notamment la réapparition du composant monoclonal dans le sang et les urines (ou une progression du pic de 25% en cas de réponse incomplète). Le reste des critères recense la présence de tout autre signe de progression clinique ou biologique (lésion osseuse, hypercalcémie, surtout si elle est

supérieure à 2,65mM, une chute du taux d'hémoglobine d'au moins 2g/dL non expliquée, une hypercréatininémie).

PARTIE II : La maladie résiduelle (*minimal/mesurable residual disease*, MRD)

I. Aspects généraux et intérêt pronostique dans le suivi du myélome

Le pronostic des patients atteints de myélome multiple s'est considérablement amélioré au cours de la dernière décennie grâce aux traitements et aux soins support de plus en plus efficaces. Une grande partie des patients répondent bien aux thérapies d'instauration avec des taux de RC dépassant 70 à 80% (Gay F et al 2019, Kazandjian D et al 2018). Cependant la RC reste un état temporaire, les patients rechutant au fil du temps, ce qui prouve la présence d'une maladie persistante chez la plupart des patients.

La maladie résiduelle (MRD) est définie par la persistance de cellules tumorales, post thérapie. L'objectif des mesures itératives de la MRD est de suivre la décroissance tumorale jusqu'à disparition du clone plasmocytaire sous le seuil de sensibilité des techniques. Elle permet d'évaluer individuellement l'efficacité de traitement pour l'adapter si besoin et *a priori* anticiper la rechute.

Actuellement, la MRD est étudiée quasi exclusivement au cours des essais cliniques ; cependant elle tend à jouer un rôle prépondérant dans le monitoring du myélome en post traitement et influencera à terme, de manière majeure, les décisions thérapeutiques.

A ce jour, le statut de MRD est considéré comme une alternative potentielle au critère de survie sans progression pour l'approbation réglementaire de nouvelles thérapeutiques (US Department of Health and Human Services 2020). La standardisation entre laboratoires est essentielle notamment à l'heure des collaborations internationales multicentriques.

Devant un nombre croissant de patients obtenant une réponse complète (RC), le groupe de travail international sur le myélome (International Myeloma Working Group, IMWG) a exprimé le besoin d'élargir les critères de réponse existants pour y inclure la MRD. L'IMWG a constaté que parmi les patients qui obtiennent une RC, les patients MRD+ ont une survie sans progression plus faible que les patients MRD -. En 2020, l'étude de Cedena et al. (Cedena MT et al 2020) suggère par ailleurs, via leurs travaux impliquant 193 patients, l'impact pronostique supérieur de la MRD par rapport à la rémission complète stricte. Dans l'ensemble il paraît évident que la négativité de la MRD est associée à une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale indépendamment du traitement.

Le seuil de négativité admis de la MRD est inférieur à 1 cellule tumorale pour 10^5 cellules dans la moelle osseuse, soit une sensibilité inférieure ou égale à 10^{-5} . Les recommandations actuelles pour l'évaluation de la réponse au cours du traitement du myélome multiple

comprennent l'examen des prélèvements de moelle par des tests standardisés de cytométrie de flux multiparamétrique (CMF) ou de séquençage nouvelle génération (Next Generation Sequencing), capables d'atteindre ce niveau minimum de sensibilité. Les directives de l'IMWG ont fixé la sensibilité minimale à 10^{-5} , mais plusieurs études ont démontré une discrimination supérieure de la survie sans progression au niveau de 10^{-6} par rapport à 10^{-4} ou 10^{-5} (Avet-L'Oiseau et al 2015, Perrot A et al 2018).

MRD négative prolongée	MRD négative dans la moelle osseuse (détectée par NGF et/ou NGS) et par imagerie, contrôlée au moins un an après. Des évaluations extérieures peuvent être utilisées pour préciser la durée de la négativité de la MRD (par exemple, MRD négative à 5 ans)
MRD négative en CMF	Absence de plasmocytes clonaux phénotypiquement aberrants (détectés par NGF) dans la ponction de moelle osseuse en utilisant la procédure standard EuroFlow pour la détection de la MRD (ou une méthode équivalente de CMF validée) avec une sensibilité minimale de 10^{-5}
MRD négative en NGS	Absence de plasmocytes clonaux détectés par NGS dans la ponction de moelle osseuse. La présence d'un clone est définie par le séquençage d'au moins deux reads identiques obtenus après séquençage de l'ADN (issu de ponction de moelle osseuse) en utilisant la plateforme LymphoSIGHT (ou une méthode équivalente validée) avec une sensibilité minimale de 10^{-5}
Imagerie et MRD négative	MRD négative détectée par NGF et/ou NGS + disparition des hyper-métabolismes au TEP scan ou diminution du SUV jusqu'à une valeur de captation inférieure à celle du médiastin ou des tissus mous avoisinants

SUV : Standardized Uptake Value, valeur de fixation normalisée

Tableau 7 : Tableau établi par l'IMWG répertoriant les différentes définitions d'une MRD négative selon la méthode de détection (Kumar et al. Lancet Oncol 2016)

Le moment optimal pour le test de MRD est dicté par la dynamique de la réponse tumorale au traitement. Les recommandations de l'IMWG suggèrent que le test de MRD soit effectué une fois que le patient a atteint une RC, logique dans le cas de thérapies entraînant une réduction constante des cellules tumorales sur une période de plusieurs mois. Cependant, la dynamique de la réponse peut être différente avec des thérapies plus puissantes ; pour exemple, les régimes d'induction à quatre molécules et le traitement par cellules CAR-T ont permis de voir une clairance rapide de la moelle, perturbant la relation étroite entre les protéines monoclonales et la charge plasmocytaire de la moelle (Landgren O et al 2019, Munshi NC et al 2018). Ces patients peuvent ne pas atteindre une RC conventionnelle pendant des mois après que la négativité de la MRD de la moelle osseuse soit démontrée, ce qui signifie à la fois que le test de MRD serait approprié dans le cas d'une très bonne réponse partielle au traitement et que le statut de MRD devrait être considéré séparément des critères de réponse traditionnels lors de l'examen des données de résultats (Landgren O et al 2019).

De nombreux essais pour les patients atteints de myélome multiple nouvellement diagnostiqués et éligibles à l'intensification thérapeutiques suivent une séquence d'induction,

d'autogreffe, de consolidation post-transplantation (dans de nombreux essais mais pas tous) et de traitement d'entretien. Il existe néanmoins une grande hétérogénéité dans la littérature en ce qui concerne le moment où les tests de MRD sont effectués.

L'évaluation de la MRD à la transition entre les phases de prise en charge permet de mieux évaluer la contribution de chaque étape dans l'approche thérapeutique globale. En 2021, Costa LJ et al ([Costa LJ et al 2021](#)) réunissent un groupe international d'investigateurs du myélome multiple pour établir des déclarations de consensus (treize au total) dans le but d'harmoniser l'utilisation de la MRD dans les essais cliniques du myélome multiple. Selon cette étude, l'évaluation de la MRD après la phase d'induction permettrait de discuter au cours de futurs essais du report de la greffe ou d'une prolongation de l'intensification dans des sous-ensembles définis par la MRD. L'évaluation de la MRD post-greffe permet d'évaluer l'impact de celle-ci sur la MRD (en ayant une évaluation avant et après) et peut soutenir les approches expérimentales guidées par la MRD pour le traitement post-greffe. Une approche itérative aux points-clés de la prise en charge thérapeutique permettra de comprendre et de comparer la cinétique de la MRD, y compris sa résurgence, avec différentes stratégies de maintenance.

La performance des tests de MRD peut être profondément affectée par des facteurs préanalytiques, tels que la qualité, la quantité et la stabilité de l'échantillon. L'hémodilution de l'échantillon d'aspiration de moelle osseuse est le souci préanalytique le plus récurrent et peut être soit opérateur-dépendant, soit lié à une moelle fibrotique ou fortement infiltrée. Les différents tests ont des exigences différentes pour atteindre la limite de détection optimale. Les essais cliniques utilisant la MRD doivent spécifier le volume de moelle à aspirer. Costa LJ et al ([Costa LJ et al 2021](#)) concernant la qualité de l'aspiration de moelle, insiste sur l'intérêt d'envoyer la première ponction de moelle osseuse pour la détection de la MRD. Leur déclaration de consensus à ce sujet stipule que l'évaluation de la MRD à partir d'un échantillon de moelle osseuse doit être effectué sur un échantillon obtenu à partir de la première ponction de l'aspirat. Cette première ponction précéderait les trois premiers échantillons conventionnels envoyés respectivement en hématologie cellulaire pour la lecture du myélogramme et en cytométrie de flux. Selon Torlakovic et al ([Torlakovic EE et al 2015](#)), le prélèvement d'échantillon de moelle pour l'évaluation de la MRD en dernier peut entraîner une hémodilution importante et conduire à une sous-estimation de la MRD.

Un symposium sur les tests de MRD dans le myélome multiple, qui a réuni des parties intéressées du monde universitaire, de l'industrie et de la FDA, a discuté de la meilleure façon de faire progresser la MRD en tant que mesure primaire des résultats dans les essais cliniques et les évaluations réglementaires du myélome multiple ([Landgren O et al 2019](#)). Le groupe a formulé trois recommandations majeures : premièrement, les tests de MRD devraient être effectués chez les patients qui obtiennent une très bonne réponse partielle en plus de ceux qui obtiennent une RC. Deuxièmement, la négativité de la MRD à la sensibilité de 10^{-6} devrait être considérée comme une catégorie de réponse en plus de la classification actuelle de 10^{-5} . Enfin, les rapports d'essais cliniques devraient préciser la sensibilité des tests de MRD ainsi que le seuil appliqué pour la négativité de la MRD (c'est-à-dire 10^{-5} ou 10^{-6}), et si possible rapporter les données de résultats pour les deux seuils de MRD.

Un dernier élément à prendre en compte pour les tests de MRD est le coût, qui varie selon les pays en ce qui concerne le remboursement aux hôpitaux traitants et aux laboratoires

d'analyse. Par conséquent, les tests sont principalement effectués dans des centres de référence tertiaires ayant une certaine capacité à absorber ces coûts (notamment en ce qui concerne le NGS et les techniques d'imagerie).

Pour exemple, l'évaluation de la MRD par CMF est cotée à 80€ car cotée B300 selon la nomenclature des actes de biologie médicale en France, sachant que le coût des réactifs est d'une quarantaine d'euros. L'évaluation de la MRD par NGS est cotée selon le référentiel des actes innovants hors nomenclature RIHN3270, soit environ 880€ par point avec un coût de réactif d'environ 770 euros. (Corre J Perrot A 2020).

En 2017, l'étude de Munshi NC et al (Munshi NC et al 2018) montre une corrélation puissante entre statut MRD et survie sans progression/survie globale. Il s'agit plus précisément d'une méta analyse de 21 essais randomisés : 14 études ont fourni des données sur l'impact de la MRD sur la survie sans progression, 12 sur la survie globale. Le statut MRD négatif des patients était associé à une survie sans progression significativement meilleure (hasard ratio 0,41, $p < 0,001$). La survie globale était également favorable chez les patients MRD négatifs (hasard ratio 0,57, $p < 0,001$).

Les patients qui présentent un profil de rémission complète (RC) avec une MRD négative ont une survie plus importante que les patients en RC avec MRD positive ; cette survie pouvant être jusqu'à deux fois plus longue.

Profil	Survie sans progression (en mois)	Survie globale (en mois)
MRD -	54	98
MDR +	26	82

Tableau 8 : Comparaison des survies sans progression et globale dans le cas de patients avec une MRD négative VS positive. La survie peut être jusqu'à deux fois plus longue (Munshi NC et al, 2018)

En 2018, Perrot et al (Perrot A et al 2018) démontrent le très fort impact pronostique de l'obtention d'une MRD indétectable à 10^{-6} en termes de survie sans progression ou globale (figure 1).

Les patients dont la MRD était négative avaient une probabilité plus élevée de survie sans progression prolongée par rapport aux patients dont la maladie résiduelle était détectable, quel que soit le groupe de traitement (VRd ou autogreffe), le profil de risque cytogénétique ou le stade de la maladie au diagnostic. Ces résultats étaient similaires post traitement d'entretien (résultats post-maintenance).

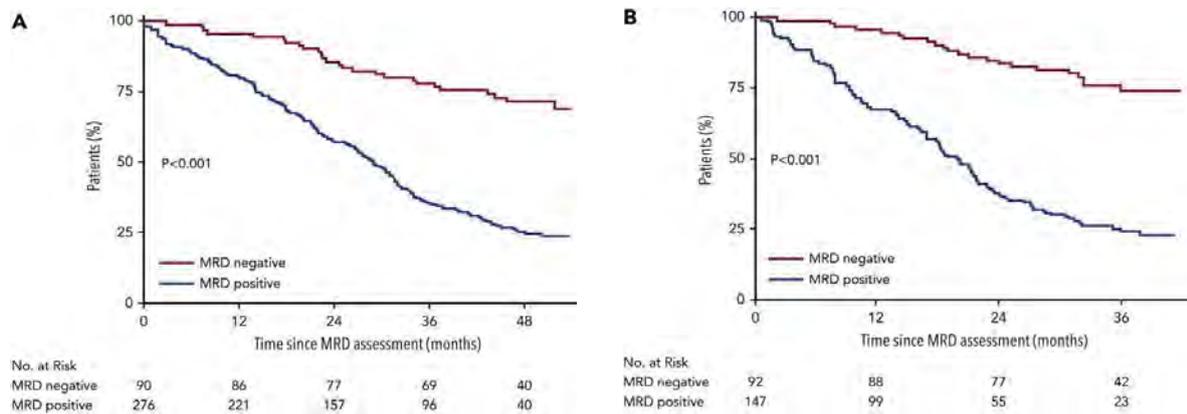


Figure 5 : **A** : courbe de survie sans progression selon le statut MRD à l'initiation du traitement d'entretien (Kaplan-Meier). **B** : après un an de traitement d'entretien. La durée médiane du suivi était de 55, 50 et 38 mois à partir de la randomisation, du début et de la fin du traitement d'entretien. Dans les deux cas (A et B), la médiane de survie sans progression n'a pas été atteinte chez les patients MRD-. Elle était de 29 mois dans les conditions A chez les patients MRD+, de 20 mois dans les conditions B. La survie sans progression est significativement plus longue chez les patients MRD- par rapport aux patients MRD+. **Perrot et al. Blood 2018**

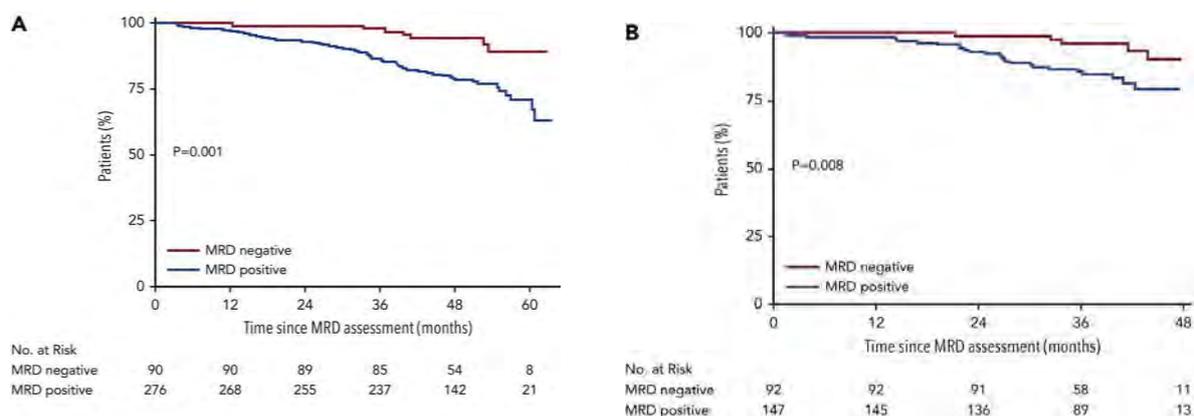


Figure 6 : **A** : courbe de survie globale selon le statut MRD à l'initiation du traitement d'entretien (Kaplan-Meier). **B** : après un an de traitement d'entretien. La MRD est un facteur pronostic fort pour la survie globale. Dans aucun des deux groupes (MRD- et MRD+) on ne constate que survie globale médiane est atteinte. Les analyses de survie de l'étude soulignent une survie sans progression et une survie globale similaires pour les patients ayant conservé une MRD- aux deux mesures ou ceux qui sont devenus MRD- après 12 mois d'entretien. **Perrot et al. Blood 2018**

Présentement, la recherche de marqueurs prédictifs précoces de survie s'impose comme un objectif primordial afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique et d'accélérer la mise à disposition de nouvelles drogues. La MRD semble être l'un des biomarqueurs les plus prometteurs à ce jour.

Bien que cette réduction du risque semble être importante d'un point de vue clinique, une proportion significative de patients classés MRD- rechutent tout de même et meurent de la maladie. Une explication à cette observation serait le niveau de sensibilité plus faible des techniques multiparamétriques (telles que la cytométrie de flux) utilisées dans les études incluses dans la méta-analyse. Avec le développement de technologies plus avancées et l'analyse d'un plus grand nombre de cellules (10 millions à 20 millions), une plus grande sensibilité est maintenant possible.

Selon Perrot et al (2018) ([Perrot A et al 2018](#)), la survie se voit prolongée chez les patients MRD- par rapport aux patients MRD+, quelle que soit la cytogénétique. Ce résultat suggère la possibilité que l'obtention d'une négativité de la MRD puisse surmonter certains facteurs de risque défavorables identifiés au moment du diagnostic.

II. Évaluation de la MRD : les outils techniques

La MRD peut être étudiée dans les échantillons de moelle par deux grands types de techniques, à savoir les approches moléculaires et l'immunophénotypage par cytométrie en flux multiparamétrique. Les techniques moléculaires actuellement disponibles comprennent la réaction en chaîne par polymérase dépendante des oligonucléotides spécifiques des allèles (ASO-PCR), le séquençage de nouvelle génération (NGS) et potentiellement, la PCR numérique (dPCR) ([Ladetto M et al 2000](#), [Ladetto M et al 2014](#), [Sarasquete et al 2005](#)).

L'évaluation et le suivi de la MRD dépendent du choix du marqueur et de la technique.

Dans l'idéal, la technique utilisée pour évaluer la MRD doit être :

- Sensible : $\leq 10^{-5}$ selon l'application clinique (détection d'1 cellule tumorale parmi 10 000 cellules)
- Spécifique
- Quantificative
- Rapide
- Reproductible
- Standardisée et encadrée par des contrôles qualités

1. La PCR-ASO

L'ASO RQ-PCR (*allele-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction*, ASO RQ-PCR) fut largement utilisée pour étudier la MRD dans le myélome multiple. Elle s'est avérée très sensible, jusqu'à 10^{-5} , et a été entièrement normalisée par le groupe EuroMRD (anciennement *European Study Group on MRD detection in acute lymphoblastic leukaemia*).

La clonalité, c'est-à-dire les réarrangements clonaux du gène Ig présents dans les plasmocytes tumoraux, à partir d'échantillons de moelle osseuse, est détectée par PCR qualitative à l'aide d'amorces consensuelles pour l'ADN génomique (ou l'ADNc dans certaines études) ([Ladetto M et al 2000](#), [Sarsquete et al 2005](#), [Rasmussen et al 2000](#), [Verhagen OJ et al 2000](#)). De multiples réarrangements du gène de l'immunoglobuline sont utilisés comme cibles de la MRD, notamment les réarrangements VDJ complet et DJ incomplet au niveau des chaînes lourdes de l'immunoglobuline, les réarrangements des chaînes légères VJ (Ig κ et λ) ([Gonzalez D et al 2003](#), [Puig N et al 2012](#), [Silvennoinen R et al 2014](#)).

S'en suit un séquençage Sanger, et les données générées sont identifiées au travers de bases de données afin d'identifier la séquence patient-spécifique de la région CDR3 du plasmocyte tumoral correspondant.

Puis la RQ-PCR est réalisée à l'aide d'amorces ou de sondes ASO, conçues pour se lier à la séquence de la région CDR3, en combinaison avec des amorces et/ou des sondes consensus

ou spécifiques au patient (Ladetto M et al 2000, Verhagen et al 2000, Gerard CJ et al 1998). Afin de quantifier avec précision les niveaux de MRD des échantillons de suivi, une courbe standard est construite (Ladetto M et al 2000, Sarasquete M et al 2005, Van der Welden et al 2007).

L'ASO-PCR est une méthode sensible et reproductible au regard de la détection et du monitoring de la MRD. Cependant elle demeure onéreuse et chronophage (le rendu des résultats nécessite quelques jours). C'est une technique actuellement abandonnée pour l'évaluation de la MRD car limitée par :

- le haut degré d'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines : les sondes Taqman consensuelles sont utilisables pour 50% des patients, le reste nécessite l'utilisation de sondes spécifiques
- la proportion parfois insuffisante de plasmocytes clonaux retrouvés dans la moelle osseuse

2. La cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux multiparamétrique multicolore est utilisée pour détecter et quantifier les plasmocytes tumoraux, qu'il est possible de distinguer des plasmocytes normaux grâce à la détection de l'expression aberrante des marqueurs de surface des cellules et à l'évaluation de leur clonalité.

A. Fonctionnement de la CMF

Son fonctionnement est basé sur la focalisation hydrodynamique des cellules, leur marquage par des anticorps couplés à des fluorochromes et la transformation d'un signal lumineux en signal numérique.

Les cellules issues de la ponction de moelle sont marquées par des anticorps fluorescents. Elles sont mises en suspension et défilent les unes à la suite des autres devant des faisceaux laser.

Les lasers, perpendiculaires au flux d'échantillon illuminent les cellules et excitent les fluorochromes : les cellules diffusent la lumière incidente et les fluorochromes émettent une fluorescence spécifique.

Dans une chambre de mesure, un système collecteur achemine cette fluorescence vers un système de détection constitué par des photomultiplicateurs. Le système collecteur lui-même est un assemblage de miroirs dichroïques et de filtres.

Les photomultiplicateurs analysent :

- La diffusion « aux petits angles » (Forward Scatter, FS) : elle représente la diffusion de la lumière dans l'axe du faisceau laser et renseigne sur la taille de la cellule ;
- La diffusion « aux grands angles » (Side Scatter, SS) : il s'agit de la diffusion de la lumière dans toutes les directions (mais uniquement collectée à 90°) qui renseigne sur la structure de la cellule et donc, la présence d'éléments intracellulaires diffractant la lumière telle que les granulations ou les vacuoles.

Les intensités de fluorescence sont converties par la suite en signaux électriques puis numériques.

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur

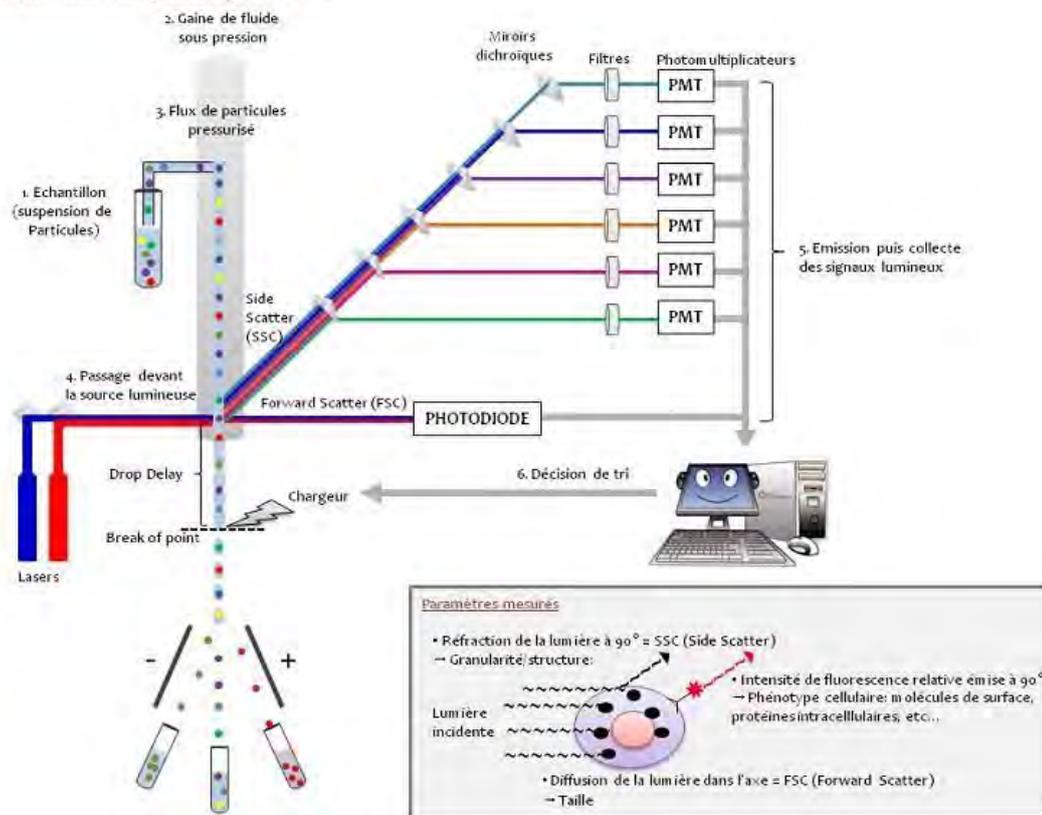


Figure 7 : Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire. BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative. CNRS UMR

Le signal numérique est retranscrit selon deux modèles : soit un histogramme monoparamétrique qui met en corrélation l'intensité de fluorescence et le nombre de cellules (ou nombres d'évènements acquis), soit un graphique biparamétrique représentant deux intensités de fluorescence en un nuage de point.

La CMF permet de réaliser l'immunophénotypage des plasmocytes au diagnostic du myélome multiple et à l'évaluation de la MRD en fonction de leurs marqueurs phénotypiques (qui varient peu au cours du myélome contrairement à d'autres hémopathies).

Les générations précédentes de cytomètre étaient composées de 4 à 5 détecteurs et recueillaient 500 000 évènements ou moins. Il en résultait des sensibilités de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} (détection d'un plasmocyte sur 1 000 à 10 000 cellules analysées). Les améliorations apportées aux cytomètres de flux se sont traduites par des vitesses d'acquisition plus rapides et la possibilité d'analyser simultanément un plus grand nombre de fluorophores. Cela a permis le développement de panels avec 8 à 10 couleurs et d'enregistrer un plus grand nombre d'évènements, améliorant ainsi la sensibilité jusqu'à 10^{-6} (un plasmocyte sur 1 000 000 d'évènements) (Soh KT et al 2019).

L'identification des plasmocytes repose sur deux marqueurs spécifiques : CD38 et CD138. Puis, à l'aide de plusieurs graphes biparamétriques, l'étude de l'expression des CD45, CD19, CD27, CD81, CD56, CD117 et Kappa/Lambda sur les évènements CD38+ CD138+ est réalisée.

B. Récepteurs des plasmocytes normaux

La différenciation plasmocytaire s'accompagne de la diminution puis de la perte d'expression de l'immunoglobuline de surface (Alaterre E 2017) ainsi que de la perte d'expression du complexe CD79a/b qui permet la transduction du signal du BCR.

Les plasmocytes, au cours de leur maturation, perdent également, de manière progressive, les récepteurs spécifiques de la lignée B mature que sont CD20, CD21, CD22, CD23 et le HLA de classe II (CMH II) (Jourdan M et al 2009).

Ils perdent entre autres au cours de leur maturation, le CD40, exprimé à la surface des plasmoblastes.

Le phénotype « normal » des plasmocytes est défini par :

- **CD38**

La protéine CD38 est une glycoprotéine membranaire de type 2 qui joue un rôle dans la régulation de la migration et de l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire et intervient dans des voies d'activation cellulaire. Elle a également des fonctions de signalisation. Cette molécule participe au catabolisme du NAD⁺ et NADP (nicotinamide adénine dinucléotide réduit/phosphate), contrôlant ainsi le niveau de NAD⁺ cytoplasmique : l'inhibition de CD38 est à l'origine d'une augmentation du niveau intracellulaire de NAD⁺ ⁶⁸. Plus récemment, un rôle de CD38 a été décrit dans la production d'adénosine, connue pour présenter des effets immunosuppresseurs (Moreaux J et al 2019).

Le CD38 n'est pas un marqueur spécifique de la lignée plasmocytaire. Les cellules plasmocytaires sont les cellules qui expriment le plus fortement CD38, suivies des cellules NK (natural killer) et des lymphocytes B (lymphocytes pro-B et cellules centro-germinatives) et T. Dans une moindre mesure, d'autres types de cellules peuvent exprimer CD38 : les hématies, les plaquettes et (plus rarement) des cellules non hématopoïétiques (Moreaux J et al 2019).

- **CD138**

Le CD138 est un protéoglycane transmembranaire de la famille des héparanes sulfates, aussi appelé syndecan-1 (SDC-1). CD138 est un marqueur très sensible et très spécifique des plasmocytes et de leur différenciation (Palaiologou M et al 2013).

Les plasmoblastes CD138⁻ se différencient en précurseurs plasmocytaires CD138⁺ : ils gardent une certaine capacité de prolifération, avant la maturation finale en plasmocytes CD138⁺⁺⁺, qui ne se divisent plus (Pellat-Deceunynck C et al 1994).

Son long domaine extra cellulaire lui permet de se lier aux molécules solubles (facteurs de croissance) et insolubles de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette (collagène, fibronectine) lui confère un rôle au cours de la croissance cellulaire, de la différenciation, du maintien de l'adhésion cellulaire et de la mobilité cellulaire. Il est exprimé par les plasmocytes et les précurseurs des lymphocytes B.

Diverses cellules épithéliales sont marquées par le CD138 : les kératinocytes montrent une forte positivité membranaire et un faible marquage cytoplasmique à l'exception des cellules

superficielles différenciées. Les cellules épithéliales, mésenchymateuses et carcinomateuses l'expriment également à leur surface ([Morlon L 2010](#)).

- **CD45**

Il s'agit d'une tyrosine phosphatase pan-leucocytaire (c'est-à-dire largement retrouvée à la surface des cellules hématopoïétiques), nécessaire à l'activation et au développement lymphocytaire.

Les plasmocytes normaux expriment globalement – néanmoins faiblement – le CD45 (CD45 faible). Son expression à la surface des plasmocytes demeure hétérogène : elle diminue au cours de la maturation, sans pour autant disparaître. De rares plasmocytes peuvent l'exprimer fortement (on parle alors de CD45 fort) : ce sont des cellules qui prolifèrent ([Bataille R et al 2006](#)).

- **CD81**

L'antigène CD81 est une glycoprotéine transmembranaire intervenant au cours de la signalisation intracellulaire des cellules B. Elle subsiste à la surface des plasmocytes tandis que le CD40 disparaît au cours de leur maturation ([Alaterre E 2017](#)). CD81 permet la médiation des interactions homotypiques entre cellules et jugule la croissance cellulaire.

- **CD27**

Le CD27, marqueur des cellules B mémoires, est présent à la surface des plasmocytes quel que soit le stade de maturation ([Alaterre E 2017](#)).

- **CD19**

Le CD19 est conservé (près de 30% des plasmocytes normaux ne l'expriment cependant plus), néanmoins beaucoup plus faiblement qu'à la surface d'un lymphocyte B.

Le CD19 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines. CD19 est exprimé tout au long de la différenciation des lymphocytes B jusqu'au stade plasmocyte. Il est impliqué dans la réplication des lymphocytes B (leur développement et leur persistance). Enfin, CD19 semble être impliqué dans le trafic des cellules B vers les aires riches en cellules T dans les ganglions lymphatiques renforçant ainsi l'implication du CD19 dans les interactions cellulaires T-B ([Morlon L 2010](#)).

- **CD28 et CD200**

Le phénotype plasmocytaire est marqué par l'expression intermédiaire de CD28 (marqueur des lymphocytes T, responsable de l'interaction B-T) et de CD200 (glycoprotéine transmembranaire, impliquée dans la régulation des lymphocytes T) ([Alaterre E 2017](#)).

C. Phénotypage des plasmocytes tumoraux

Les plasmocytes tumoraux présentent des particularités phénotypiques. Des immunophénotypes aberrants sont couramment observés, incluant la perte, la sous-expression ou la surexpression de marqueurs présents sur les plasmocytes normaux en alliance avec l'expression d'antigènes non spécifiques de lignées.

- **CD38 et CD138**

Tout comme les plasmocytes dits normaux, l'expression de certains marqueurs reste identique et notamment CD38 et CD138.

Identifié au début des années 1980 par les travaux pionniers de Reinherz et Schlossman, le CD38 a été référencé comme marqueur pronostique dans de nombreuses maladies leucémiques. L'expression du CD38 est largement distribuée dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Son expression très distincte sur les plasmocytes permet cependant de discriminer les plasmocytes clonaux des autres leucocytes (Ocqueteau M et al 1998).

Pour obtenir une identification plus spécifique, l'expression coïncidente de CD138 a été associée conjointement à la présence de CD38.

A noter que les plasmocytes myélomateux semblent afficher un niveau d'expression de CD38 plus faible que celui des plasmocytes normaux (San Miguel JF 2006).

L'étude de l'expression d'autres récepteurs sur les événements (ou cellules) CD38+CD138+ permet de les identifier.

- **CD45**

Un autre antigène couramment utilisé dans la pratique clinique pour affiner l'identification des plasmocytes clonaux est le CD45, dont l'expression modérée à claire se retrouve sur plus de 90% des plasmocytes normaux et reste cependant faible ou absente dans plus de 70% des plasmocytes tumoraux. Tout comme pour les plasmocytes normaux, le CD45 est exprimé faiblement, voire pas du tout. Le caractère aléatoire de son expression enjoint de ne pas être l'exclure du « gating » (fenêtrage) lors de l'analyse des données.

La reconnaissance et l'utilisation de CD38, CD138 et CD45 comme marqueurs de gating pour les plasmocytes ont transformé la caractérisation des atteintes plasmocytaires par cytométrie de flux.

- **CD19 et CD56**

Ils représentent les deux autres marqueurs cellulaires informatifs indispensables à l'identification d'un plasmocyte tumoral.

La perte de l'antigène CD19 est extrêmement courante : il demeure exprimé dans moins de 5% des cas de myélome multiple (Bataille R 2006).

Les plasmocytes tumoraux expriment de manière aberrante CD56 (NCAM). Il s'agit d'un récepteur retrouvé à la surface des cellules NK. C'est une molécule d'adhésion, de la superfamille des immunoglobulines décrite pour la première fois par Van Camp et al. en 1990. CD56 est exprimée à la surface des plasmocytes myélomateux dans 60 à 70%. Elle permet entre autres l'adhésion au microenvironnement médullaire et favorise le contact entre plasmocytes tumoraux et ostéoblastes (Pellat-Deceunynck C 1994).

L'association de ces deux marqueurs avec le CD38, CD138 et CD45 permet la caractérisation d'environ 90 % des myélomes multiples (Vergnolle I 2019).

- **CD27**

Retrouvée à la surface des lymphocytes B mémoires, l'antigène CD27 est essentiel à la différenciation plasmocytaire. Il est exprimé par les lymphocytes normaux et réactionnels. Les

plasmocytes malins présentent un phénotype CD27+ dans 50 à 60% des cas ([Moreau P 2005](#)). La perte d'expression de CD27 est un bon marqueur de malignité ([Ines Vergnolle, thèse 2017](#)).

- **Les antigènes « aberrants »**

CD33, marqueur de la lignée myélomonocytaire, peut être retrouvé à la surface des plasmocytes tumoraux dans près de 20% des cas ([Mateo G 2008](#)).

CD52 (campath-1) est un marqueur fortement exprimé à la surface des lymphocytes et des monocytes. Un faible contingent de plasmocytes malins l'exprime, moins de 15% des cas de myélome multiple ([Lin P 2004](#)).

CD117 (c-kit) est un récepteur à activité tyrosine kinase : il a pour ligand les facteurs de croissance hématopoïétiques). Jamais exprimé de manière physiologique par les plasmocytes, il est présent à la surface des plasmocytes tumoraux chez environ un tiers des patients atteints de myélome ([Mateo G 2008](#)).

Les plasmocytes tumoraux peuvent également exprimer des molécules impliquées dans la costimulation des lymphocytes B et T telles que

- CD40 (dans 2/3 des cas de myélome multiple selon [Pellat-Deceunynck et al, 1994](#) et [San Miguel et al, 2006](#)) ;
- CD28, marqueur lymphocytaire T, essentiel au cours des interactions B-T, est retrouvé 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](#)).

- **CD81**

La perte ou la diminution d'expression du CD81 est un bon marqueur de malignité. Son expression est absente ou diminuée dans environ 50 % des cas de myélome multiple et près de 15 % des plasmocytes normaux d'un échantillon peuvent perdre son expression ([Vergnolle I 2019](#)).

Il existe donc une hétérogénéité des profils d'expression des différents antigènes à la surface des plasmocytes normaux et tumoraux.

Le plasmocyte normal présente classiquement le phénotype suivant : CD38 fort, CD138 fort, CD45+, CD19+, CD27+, CD81+, CD56-, CD117-.

Des populations minoritaires de plasmocytes normaux représentant en général moins de 30 % des plasmocytes peuvent perdre l'expression de certains marqueurs (CD19, CD45, CD27) ou exprimer des marqueurs aberrants (CD56).

Le plasmocyte tumoral est plus souvent CD38 faible, CD138 fort, CD45-, CD19-, CD27- (ou faible), CD81- (ou faible), CD56+ (voire CD56 fort), CD117+.

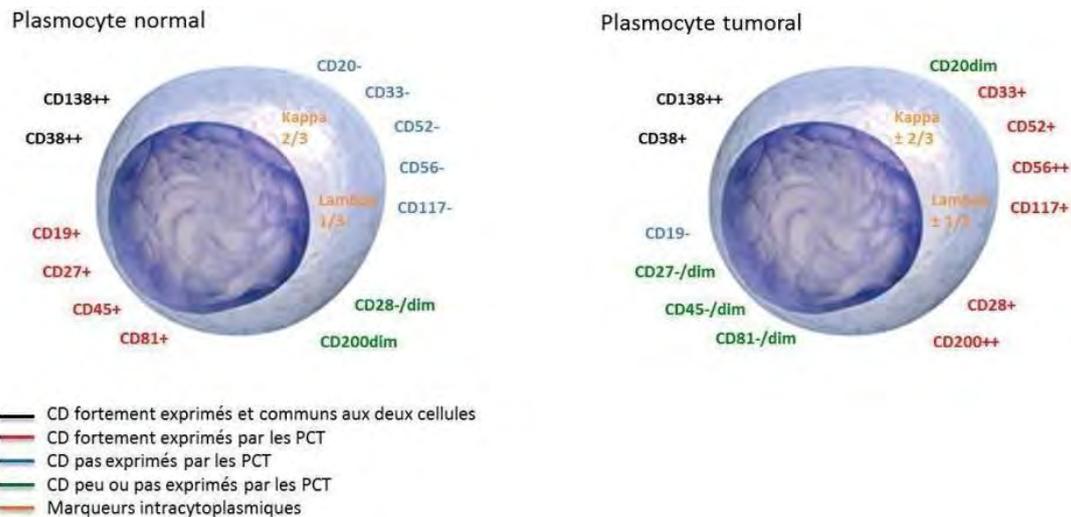


Figure 8 : Plasmocyte normal et plasmocytes tumoral - récepteurs de surface

Antigen	Aberrant pattern	% of abnormal expression cases
CD19	-	96%
CD20	dim+	17-30%
CD27	- or dim+	40-68%
CD28	+	15-45%
CD33	+	18%
CD38	dim+	80%
CD45	-	73%
CD54	dim+	60-80%
CD56	++	60-75%
CD81	- or dim+	55%
CD117	+	30-32%
CD200	+ / + +	>70%
CD307	++	NA

Tableau 9 : Récepteurs cellulaires utilisés couramment au cours de la détection de plasmocytes malins (Flores-Montero et al., 2016)

- Chaines légères kappa et lambda

Le plasmocyte normal produit et sécrète des immunoglobulines : l'expression intracytoplasmique des chaînes légères kappa et lambda est très forte. Le ratio normal est de 2/3 kappa pour 1/3 lambda.

A contrario, les plasmocytes tumoraux ne produisent qu'un seul type de chaîne légère, kappa ou lambda. Le ratio 2 :1 des chaînes kappa lambda est déséquilibré en faveur de l'une ou l'autre type de chaîne. L'identification par immunophénotypage de ces deux marqueurs permet non seulement d'affirmer le caractère monoclonal de l'immunoglobuline mais également de calculer le ratio kappa/lambda.

D. Intérêt de la CMF au cours de la prise en charge de la maladie résiduelle du myélome multiple

En ce qui concerne la MRD, la CMF repose sur la détection et la quantification des plasmocytes tumoraux d'un prélèvement de moelle osseuse.

La CMF a toujours offert une excellente applicabilité (utilisable chez plus de 95 % des patients), une sensibilité conséquente (10^{-5} à 10^{-6} pour la NGF), une grande disponibilité, un délai d'exécution court (<6 heures) et une bonne reproductibilité (Logan AC et al 2013, Ladetto M et al 2000).

En milieu clinique, la cytométrie de flux multiparamétrique est utilisée pour caractériser, diagnostiquer et surveiller les hémopathies malignes depuis les années 1990. Son adoption généralisée n'a commencé que récemment car l'un des principaux facteurs limitants demeurait le manque de marqueurs appropriés pouvant être utilisés pour identifier les cellules plasmocytaires tumorales (Puig N et al 2014, Soh KT et al 2019, Foon KA et al 1986, Ocqueteau M et al 1998). La conception d'un panel d'anticorps est une partie cruciale et compliquée de la cytométrie en flux pour la détermination de la MRD chez les patients atteints de myélome multiple. Le panel doit permettre d'identifier les antigènes appropriés et de déterminer les combinaisons optimales d'anticorps monoclonaux et de fluorochromes.

Les premières études menées pour explorer l'applicabilité et la sensibilité de la CMF ont été réalisées par Almeida et al en 1999 (Almeida J et al 1999).

Ce groupe espagnol a montré que la CMF était applicable à plus de 95% des patients avec une limite de détection de 10^{-4} à 10^{-5} . A l'aide 21 anticorps monoclonaux, le phénotype de 61 patients non traités a été examiné. Trois mois après l'allogreffe, un faible niveau de cellules myélomateuses ($0,28\% \pm 0,14\%$) pouvait encore être détecté chez plus de 60% des patients.

En termes d'études pionnières, celle rapportée par Rawstron et al en 2002 a également démontré que la corrélation entre la persistance de la MRD (MRD du myélome multiple détectée par CMF à 6 couleurs) et une survie sans progression et d'une survie globale plus courtes (Rawstron AC et al. 2002). La moelle osseuse a été ponctionnée 3 mois après une autogreffe de cellules souches chez 24 hommes et 21 femmes participant à l'essai *Medical Research Council Myeloma VII*. Des plasmocytes néoplasiques ont été détectés chez 42% des patients avec une SSP de 20 mois contre 35 mois ($p = 0,003$) chez les patients sans maladie détectable.

Ces études ont donc collégalement souligné la pertinence de l'utilisation de la CMF pour l'évaluation de la MRD au cours du myélome multiple et ont incité l'IMWG à intégrer la réponse immunophénotypique dans ses critères de réponse (Kumar S et al 2016).

Des panels à six et huit couleurs ont permis d'améliorer la sensibilité de la technique jusqu'à 10^{-5} soit une cellule tumorale pour 100 000 cellules, impliquant l'acquisition d'au moins 1 000 000 d'évènements. Bien que seuls 500 000 évènements de détection cellulaire aient été analysés dans certaines études, l'acquisition d'un nombre plus élevé d'évènements reste possible : 2×10^6 évènements est le minimum acceptable et 3 à 5×10^6 évènements constitue un ordre de valeur optimal (Vergnolle I 2019).

En 2014, une étude de phase II menée par l'Intergroupe Francophone du Myélome a intégré un panel de 7 couleurs analysant un minimum de 2 000 000 de cellules dans leurs critères de réponse pour une sensibilité de 1 cellule néoplasique sur 40 000 cellules (0,0025%). 21 des 31 patients sont rendus MRD-négatifs après traitement et aucun n'a rechuté après un suivi de 39 mois, en revanche 70% des patients MRD-positifs ont progressé. Par conséquent, on peut

déduire de ces études que le test MRD par CMF représente une méthode de substitution sensible pour prédire la survie sans progression et la survie globale dans les mois qui suivent le traitement (Roussel M et al 2014).

La CMF est donc un outil puissant et fiable qui peut être utilisé pour l'évaluation de la MRD chez les patients atteints de myélome multiple. Par rapport aux autres technologies, la CMF est relativement peu coûteuse, sa disponibilité est plus large, son applicabilité plus intéressante et son délai d'exécution rapide. Les études espagnoles (Paiva B et al 2008, Roussel M et al 2014) et britannique (Gormley NJ et al 2016) ont clairement établi que le statut MRD du myélome au 100^e jour post-transplantation est un outil pronostique pertinent corrélé avec la SSP et la SG. Ces résultats ont incité l'IMWG à intégrer la réponse immunophénotypique de la MRD dans les critères de réponse du myélome multiple.

La sensibilité de la cytométrie en flux pour la détection de la MRD dépend de la qualité de l'échantillon obtenu, du nombre de cellules analysées et de la capacité du panel d'anticorps à distinguer les plasmocytes anormaux des normaux. En effet les plasmocytes sont physiologiquement présents en faible nombre dans les aspirats de moelle osseuse. Par conséquent, un minimum de 20 à 30 cellules malignes est nécessaire pour identifier la MRD via la cytométrie de flux ; en effet la limite inférieure de détection de cette technique dépend du nombre total de cellules analysées (Vergnolle I 2019).

La CMF s'est imposée jusqu'à présent comme technique de choix en ce qui concerne le monitoring de la MRD au vu notamment de sa disponibilité et de sa rapidité.

Cependant quelques ombres au tableau persistent.

D'une part, malgré la volonté de standardisation, il existe des variabilités protocolaires inter-laboratoires, ce qui pourrait nécessiter un effort de formation du personnel et l'optimisation des logiciels de traitement et d'interprétation des résultats. Si l'on admet un certain degré d'hétérogénéité, il est nécessaire d'harmoniser la détermination de la MRD du myélome multiple par cytométrie en flux notamment par l'obtention d'un consensus sur l'identification des populations de cellules normales associées à la moelle osseuse, et la définition d'une qualité d'échantillon adéquate, en particulier pour les cas MRD négatifs.

D'autre part, l'aspiration de moelle osseuse doit être traitée dans les 24-48h qui suivent la ponction, compte-tenu de la fragilité des plasmocytes *in vitro*.

L'autre limite étant qu'une sensibilité de 10^{-6} (soit un plasmocyte tumoral parmi un million de cellules dans la moelle osseuse) nécessiterait l'analyse d'au moins 10 millions de cellules totales (du ressort de la NGF, *next generation flow*). Cela nécessiterait des temps d'acquisition et d'analyse beaucoup plus longs, peu compatibles avec une pratique de routine.

La technique NGF est un test à huit couleurs et deux tubes qui évalue l'expression différentielle de 10 antigènes pour identifier les plasmocytes clonaux. La NGF évalue 10 millions d'événements (10^7) et, lorsqu'elle est réalisée sur un échantillon approprié (volume recommandé et avec une hémodilution minimale), présente une limite de détection de 2×10^{-6} (c'est-à-dire 20 plasmocytes aberrants pour 10 millions d'événements).

Un défi latent concernant l'évaluation en CMF de la MRD dans le myélome multiple consiste à surmonter l'interférence causée (principalement) par les molécules anti-CD38, au cours de l'identification des clones plasmocytaires. D'autres marqueurs plasmocytaires pour les patients traités par anticorps monoclonal (daratumumab, isatuximab) semblent prometteurs : CD229, CD319, p63 intracellulaire (VS38c) et le « nanobody CD38 » à épitope unique (Oberle A 2017, Soh KT 2020). En particulier, CD229 et CD319 ont été largement validés face à un traitement anti-CD38 (Courville EL 2020). En l'absence de ces approches, les laboratoires doivent effectuer un travail d'identification très méticuleux lorsqu'ils mesurent la MRD résiduelle chez les patients qui ont reçu un traitement par anticorps monoclonal jusqu'à 6 mois après l'administration (Courville EL 2020).

3. Le NGS (next generation sequencing)

A. Principe du NGS : recombinaison génétique et hypermutation somatique

Le NGS est basée sur la détection et la quantification des réarrangements clonaux des gènes d'immunoglobulines IGK, IGL (chaînes légères) et IGH (chaînes lourdes). Ces réarrangements constituent la signature clonale de la maladie.

Les gènes des chaînes lourdes sont situés sur le chromosome 14 et se composent de 70 segments V, D et J et de neuf gènes codant pour des régions constantes (C)>

A contrario, les gènes des chaînes légères κ et λ ne comptent pas de segments D.

Sur le chromosome 2, les gènes des chaînes κ sont constitués par une trentaine de segments V pour 5 segments J et un gène C unique.

Sur le chromosome 22, les gènes des chaînes λ sont formés par 30 segments V, 4 segments J et 6 gènes C.

Initialement, dans les progéniteurs indifférenciés, les gènes des chaînes d'immunoglobulines sont non fonctionnels et sont constitués par une succession de segments géniques tous différents les uns par rapport aux autres. Ces segments sont divisés en trois grands groupes géniques : les gènes de variabilité (V, plus de 200), les gènes de diversité (D, une vingtaine) et les gènes de jonction (J, au nombre de 6).

Chaque gène V des chaînes lourdes d'immunoglobuline code pour un segment de 95 à 96 acides aminés, correspondant aux trois régions *framework* et à deux régions CDR.

Les gènes D et J codent pour le troisième CDR. Le gène J seul code pour la quatrième région *framework*.

Au cours de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse, des boucles de recombinaison au sein de ces gènes vont juxtaposer aléatoirement des fragments éloignés.

Les recombinaisons dans les régions variables des chaînes H ont lieu selon le schéma suivant : un segment D se rapproche d'un segment J au gré de la boucle, s'y lie et l'ensemble produit un segment DJ recombiné, excisant les autres segments D et J. Puis un segment V se rapproche du segment DJ recombiné, s'y lie et forme un segment VDJ recombiné tandis que les autres segments V sont excisés.

La formation de gènes κ et λ fonctionnels résultent quant à eux d'une recombinaison entre les segments V et J.

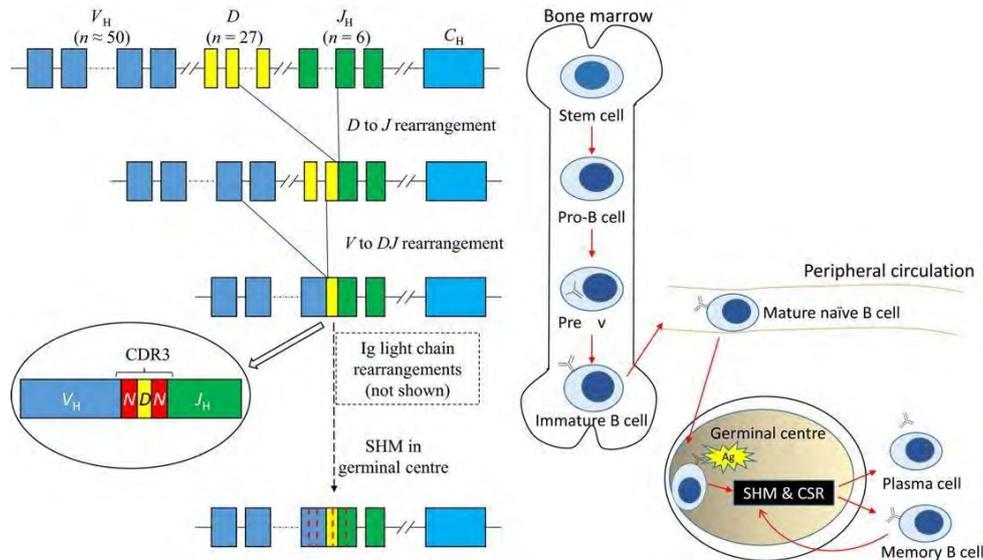


Figure 9 : Réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobuline et hypermutation somatique (SHM) au cours de l'ontogenèse des cellules B. Sur la droite, sont représentées les cellules pro-B, dans lesquelles se produit un réarrangement de la VDJ, les cellules pré-B, dans lesquelles se produit une expression cytoplasmique de l'IgH, et les cellules B immatures dans lesquelles le récepteur de surface des cellules B est exprimé. Les lignes en pointillés rouges sur la séquence VDJ indiquent les mutations introduites par SHM. (Bai Y et al, 2018)

Durant ce processus de recombinaison, une enzyme TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) vient participer à la diversité structurale et combinatoire en incluant, toujours de manière aléatoire, un ou plusieurs nucléotides entre les jonctions D et J, puis DJ et V. Des recombinases (RAG1 et RAG2) agissent en synergie pour participer à l'association au hasard des segments.

A l'issue de la lymphopoïèse B, des lymphocytes naïfs synthétisent une immunoglobuline IgM κ ou une IgM λ , différente d'un lymphocyte à l'autre selon un ratio de 2 κ pour 1 λ .

Les chaînes légères κ sont réarrangées en premier ; les chaînes légères sont générées par la jonction entre des segments V et J. La recombinaison génétique qui a lieu sur les chaînes lourdes et légères correspond à des modifications moléculaires majeures. Cette recombinaison a d'abord lieu sur le gène Mu d'un allèle : si elle est productive, la chaîne Mu est exprimée. Si non, la cellule est mise en apoptose.

Un mécanisme similaire implique le premier puis le second des gènes des chaînes légères κ . Si aucun gène κ n'est productif, ce sont les gènes λ qui seront réarrangés. Si ni l'un ni l'autre des deux gènes n'est productif, la cellule entre en apoptose.

A la surface des lymphocytes naïfs, la région Fab de l'immunoglobuline de surface incluse dans le complexe BCR peut être sujet à des stimulations antigéniques. Des mutations des gènes d'immunoglobulines peuvent survenir dès lors.

D'une part, des mutations ponctuelles peuvent modifier le génome codant pour la partie variable des gènes d'immunoglobulines. Il s'agit du phénomène d'hypermutation somatique qui permettra d'augmenter l'affinité des lymphocytes B pour l'antigène reconnu et au terme duquel est produit une immunoglobuline avec des acides aminés différents de l'Ig initiale.

La transition des IgM en IgG, A ou E résulte d'une nouvelle recombinaison. En effet, après la rencontre avec l'antigène, le lymphocyte B produit initialement des IgM. Un phénomène de commutation (ou switch) isotypique a alors lieu qui modifie de manière définitive la classe de l'immunoglobuline sans porter atteinte à sa spécificité vis-à-vis de l'antigène, puisque seule la région constante est substituée (la partie variable et la chaîne légère sont identiques à celles de l'IgM premièrement secrétée).

Les recombinaisons ont lieu dans le lymphocyte B mature après stimulation antigénique qui influence la classe de la chaîne lourde.

La commutation isotypique suit un mécanisme de recombinaison modulé par les cytokines libérées au cours de la réponse immunitaire. Une boucle permet de juxtaposer le segment VDJ et un segment C autre que C μ (C γ , C α ou C ϵ). Ce nouveau segment recombinaison entraîne la production d'une immunoglobuline qui porte une partie variable proche de celle de l'IgM stimulée par l'antigène et une partie constante G, A ou E.

Le phénomène d'hypermutation somatique est un des principaux freins à l'amplification PCR des réarrangements VDJ car il implique l'introduction de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes d'immunoglobulines.

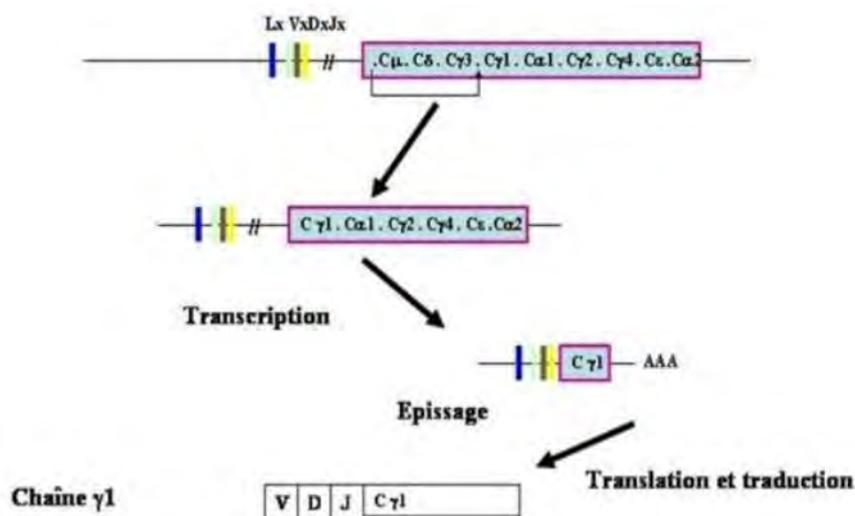


Figure 10 : Commutation isotypique des C μ en C γ (noté C γ). <https://www.hematocell.fr/>

B. Fonctionnement du NGS

Le principe du NGS est donc d'identifier les réarrangements VDJ des clones plasmocytaires. Le suivi de ces marqueurs se fait par le biais d'une technique PCR associée à du séquençage haut débit.

En premier lieu, une étape de pré-amplification en 3 cycles, correspondant à une PCR multiplex dure 60 à 75 minutes et permet d'amplifier toutes les séquences des gènes réarrangés.

Les lymphocytes B qui ont subi des réarrangements sont amplifiés à l'aide d'amorces hautement multiplexés V et J. Les séquences géniques IGH, IGK et IGL sont amplifiées. Cela permet d'analyser les génomes de cellules B recombinaison afin d'identifier et de surveiller les clonotypes du répertoire immunitaire.

Les amorces V ont une unique séquence random 15-mer qui permet d'étiqueter les molécules au cours de l'amplification. Cela permettra plus tard d'identifier et écarter les cadres de lecture comportant des erreurs de PCR et de séquençage pour une meilleure identification et quantification des clones.

Des contrôles positifs sont nécessaires pour chaque réaction pour évaluer la qualité des amorces et mesurer le biais d'amplification dans le test pour pouvoir le corriger par un calcul. Les cellules nucléées sont simultanément amplifiées pour être mesurées, à l'aide des gènes de ménage (house-keeping genes) afin de quantifier le nombre total de cellules.

Un biais de détection existe : si une molécule n'est pas étiquetée au cours de la pré amplification, elle ne sera pas détectée par séquençage

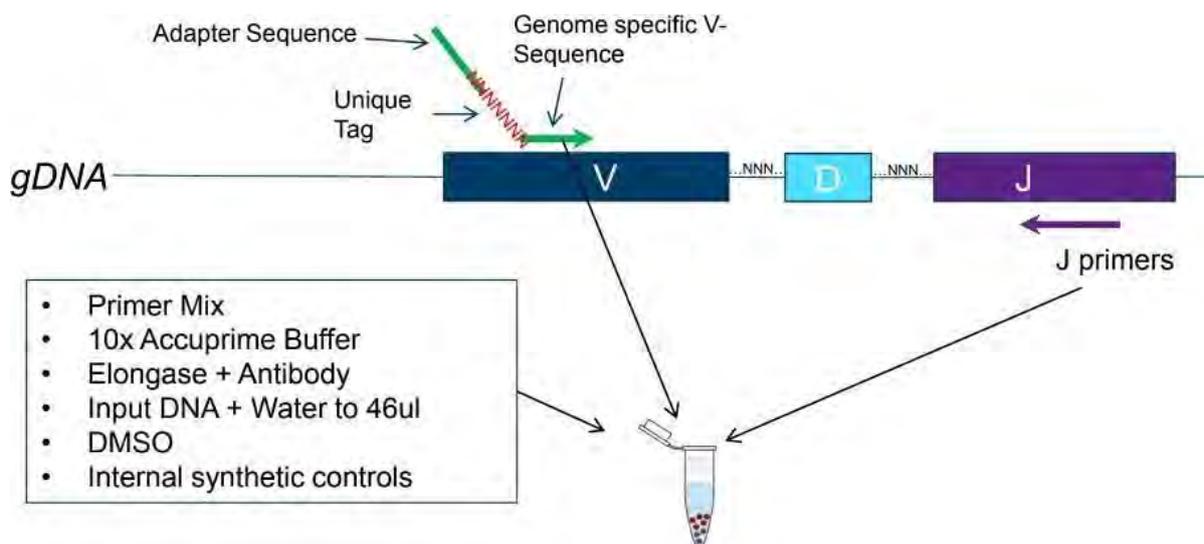


Figure 11: Etape de Préamp. 3 cycles d'amplification utilisant les gènes V et J pour capturer les amorces IGH, IGK, IGL, et des gènes de ménage. Un « tag » unique et une séquence adaptatrice (adapter sequence) sont ajoutés pour l'étape ultérieure de PCR. Adaptive™ biotechnologies Amplify Immunology.

S'en suit un traitement enzymatique d'une heure (exonuclase Exo I + MgSO₄) pour détacher les amorces initialement fixées au cours de la pré amplification.

Puis l'étape de PCR en 24 cycles (4 à 5 heures). Elle implique une amplification à partir des molécules déjà amplifiées, pour 24 cycles, à l'aide d'un mix d'amorce géniques V et J. Des code-barres spécifiques et des amorces de séquençage (« tags » de couleurs différentes, permettant d'identifier les séquences pour un patient donné) sont ajoutées aux molécules pré amplifiées.

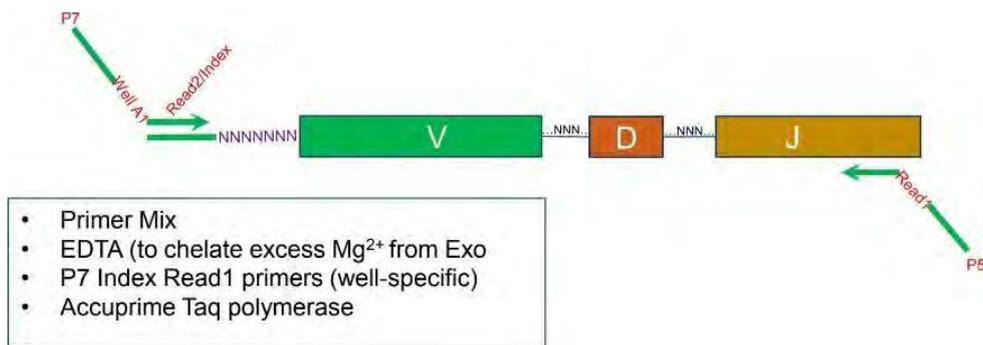


Figure 12 : PCR. Les amorces V incluent dans la séquence amplifiée un code barre unique, un primer P7 et un primer de séquençage pour l'Illumina NextSeq. De même pour les amorces J qui permettent l'ajout d'amorce P5 et d'amorces de séquençage. Adaptive™ biotechnologies Amplify Immunology.

A la fin des 5 heures de cycles de PCR, l'activité polymérase est arrêtée par l'ajout d'EDTA. Tous les puits réactionnels qui seront chargés sur une seule série de séquençage sont ensuite regroupés à volumes égaux. Les données générées sont traitées par un pipeline d'analyse bio-informatique pour en permettre l'interprétation, et séquencées.

C. Intérêt du NGS dans l'évaluation de la maladie résiduelle du myélome multiple

L'évaluation moléculaire actuelle de la MRD dans le myélome multiple cible les réarrangements spécifiques des cellules tumorales (aussi appelés clonotypes) dans la région des gènes des immunoglobulines (Ig) variable/diversité/jonction (VDJ), particulièrement le gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IGH).

La probabilité que deux régions variables identiques apparaissent dans des clones indépendants est extrêmement faible, ce qui signifie que ces séquences peuvent être considérées comme spécifiques des cellules tumorales d'un patient donné (Ho C 2018).

Les réarrangements clonaux sont caractérisés au diagnostic de la maladie et peuvent être quantifiés au moment de la rémission. La caractérisation du prélèvement de diagnostic est primordiale : elle constitue la phase de calibration (qui peut, au besoin, être réalisée à la rechute) et permet d'identifier les réarrangements clonaux du patient.

La technique de NGS permet d'extraire l'ADN à partir d'un aspirat de moelle osseuse. Les données obtenues après amplification sont explorées par un pipeline d'analyse bio-informatique.

L'analyse de 2 à 3 millions de cellules (soit environ 20 μ g d'ADN) est suffisante pour obtenir une sensibilité de 10^{-6} .

A partir d'un premier échantillon, les séquences dominantes sont considérées comme spécifiques de la tumeur et les critères de seuil de clonalité sont prédéfinis, pour ensuite surveiller la ou les mêmes séquences par séquençage d'échantillons post-traitement. La nécessité d'établir la ou les séquences spécifiques de la tumeur (calibration) est donc une limitation des tests moléculaires de MRD. Il est également possible que la calibration soit en échec. Il s'agit d'un problème particulier pour les échantillons de myélome multiple, car les phénomènes d'hypermutation somatique peuvent avoir affecté les régions où les amorces de

la PCR s'hybrident, et l'échec de l'amplification qui en résulte se traduit par la non-détection de la séquence spécifique de la tumeur parmi les séquences des cellules non néoplasiques de fond (Rustad EH 2019). Ce problème technique ne peut être entièrement éliminé, même dans les cas où la charge plasmocytaire est très élevée, car l'hypermutation somatique se produit de manière aléatoire. Cependant, cet impact est réduit par l'inclusion d'un plus grand nombre de jeux d'amorces dans le test (Ho C 2021).

Néanmoins, il convient de noter que pour la majorité des échantillons contenant $\geq 5\%$ de plasmocytes, la séquence spécifique à la tumeur peut être caractérisée avec succès sans enrichissement, en supposant que le clone de myélome ne présente pas le niveau d'hypermutation somatique qui empêche la liaison des amorces (Ho C 2021).

Le test le plus couramment utilisé pour l'évaluation de la MRD moléculaire du myélome multiple est ClonoSEQ (Adaptive Biotechnologies™, utilisant la plateforme LymphoSIGHT), le test LymphoTrack (Invivoscribe) étant une alternative, et le Consortium EuroClonality-NGS développant également des tests NGS et des outils bioinformatiques associés (Cedena MT 2020).

En utilisant ClonoSEQ, il est possible d'identifier des séquences potentielles spécifiques aux tumeurs dans chacun des gènes d'Ig (IGH, IGK et IGL) dans un seul tube. Toutes les lectures de séquençage hautement similaires sont identifiées comme des "clonotypes", tout clonotype ayant une fréquence $> 5\%$ au moment du diagnostic étant utilisé comme cible pour l'évaluation de la MRD dans les échantillons post-traitement.

Adaptive Biotechnologies™ n'a pas publié les spécifications exactes de ClonoSEQ ; ce test est proposé comme un service, nécessitant l'envoi d'échantillons pour traitement. ClonoSEQ a été utilisé dans les études initiales comparant le NGS à l'ASO-qPCR et aux tests de cytométrie de flux multiparamétriques, confirmant la signification pronostique de la négativité de la MRD par NGS (Ladetto M 2014) et a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) américaine en 2018 sur la base des données de survie des études de phase III (Avet-L'Oiseau 2015).

Invivoscribe fournit le test LymphoTrack sous la forme d'un kit pour un séquençage interne selon les protocoles du fabricant. Il s'agit d'un test pour le locus IGH, avec des jeux d'amorces ciblant quatre régions différentes, à savoir les régions framework 1, 2, 3 (FR1, FR2, FR3), et la région de la séquence leader IGH plus en amont de FR1. Des critères spécifiques pour le séquençage clonal ont également été établis, qui dépendent du nombre de lectures de la séquence totale, de la fréquence du clonotype et de la prééminence des séquences de fond provenant de cellules non néoplasiques (Arcila ME 2019). Un test distinct est nécessaire pour l'IGK, et un autre pour l'IGL est encore en cours de développement. Les données du MSKCC provenant des études de validation ont montré qu'une séquence clonale connue peut être détectée de manière fiable par le test LymphoTrack à un niveau de 1.10^{-5} dans presque 100 % des cas en utilisant la quantité d'ADN recommandée (Ho C 2021).

Des taux de détection de clonalité de base de 95 % peuvent être atteints par ClonoSEQ ou LymphoTrack, en supposant une qualité d'échantillon adéquate (Bruggemann 2019).

Comme autre alternative non commerciale, un nouvel ensemble de tests de MRD basés sur le NGS a récemment été publié par le consortium Euro-Clonality/BIOMED-2, un groupe

international de plus de 20 laboratoires universitaires. Bien que le consortium BIOMED-2 se concentre principalement sur la leucémie lymphoblastique aiguë, ses tests ont également été étendus au myélome multiple.

4. Quelques études comparant CMF vs NGS

Le NGS repose sur l'identification des réarrangements clonotypiques au moment du diagnostic, impliquant moins de 2% des cas de patients atteints de myélome ne peuvent être suivis au vu des phénomènes d'hypermutation somatique. D'autre part le délai d'exécution est beaucoup plus long (il faut compter environ 5 à 7 jours contre 24 à 48h pour la CMF et la NGF) d'où la nécessité de traiter ensemble plusieurs échantillons.

	Cytométrie de flux	<i>Next-Generation Sequencing</i>
Faisabilité	100%	>98%
Disponibilité	Cytomètre 8 couleurs et plus	Centres très spécialisés uniquement ; efforts de financement continus des centres universitaires
Nombre de cellules nécessaire	10.10 ⁶ cellules par tube	2 à 3 10 ⁶ cellules pour 20µg d'ADN
Calibration	Non nécessaire	Indispensable
Echantillon	Frais, envoyé dans un délai de 24h	Frais ou congelé
Standardisation	Consortium Euroflow	Compagnies commerciales pour la plupart (Adaptive Biotechnologie™)
Méthode quantitative ?	Oui	Oui
Seuil de sensibilité	10 ⁻⁵ à 10 ⁻⁶ (pour la NGF)	10 ⁻⁵ à 10 ⁻⁶
Délai d'obtention des résultats	3 à 4h	Une semaine
Complexité	Personnel qualifié. Logiciel d'automatisation.	Soutien bio-informatique nécessaire et actuellement indépendant des centres de recherche

Tableau 10 : Tableau comparatif et descriptif des deux méthodes de CMF et NGS dans l'évaluation de la MRD du myélome multiple

La CMF permet l'identification et la quantification des plasmocytes anormaux. Le consortium EuroFlow a développé un système à deux tubes et à huit couleurs, qui permet l'analyse simultanée de 10 millions de cellules (next generation flow, NGF). La NGF, développée par EuroFlow®, nécessite une procédure expérimentale immédiate contrairement au NGS dont les échantillons peuvent être congelés après extraction de l'ADN et analysés ultérieurement.

Comme Perrot et al l'ont récemment indiqué (Perrot A 2018), la NGF et le NGS peuvent toutes deux atteindre une sensibilité de 10^{-6} lorsque davantage de cellules sont traitées et, dans ce contexte, le facteur le plus important n'est pas la technique mais la capacité à détecter des niveaux plus profonds de MRD, en évitant les résultats faux négatifs dus à des limites de détection plus basses.

Le NGS est une technique qui offre une sensibilité au seuil de 10^{-6} : pour exemple, un niveau de MRD inférieur à 10^{-6} est prédictif d'une survie sans progression supérieure par rapport à 10^{-5} ou 10^{-4} . Avec une sensibilité de 10^{-6} , l'étude de Perrot et al (Perrot et al 2018) montre que la négativité de la MRD peut être un biomarqueur pronostique fort de la survie sans progression et de la survie globale. Cette approche met en exergue un niveau de discrimination plus important que celui obtenu précédemment pour la CMF multiparamétrique.

L'étude FORTE avait pour objectif en 2020 d'évaluer le taux de rémission chez des patients en RC en comparant les deux techniques à des cut-offs standard de respectivement 10^{-5} pour la CMF et 10^{-6} pour le NGS (Oliva S 2020). Les 474 patients de l'essai étaient séparés en trois bras selon le traitement reçu. Les résultats de l'étude ont mis en évidence d'une part une réponse complète avant entretien atteinte pour 233 des 474 patients. 184 échantillons sur les 233 ont été traités par les deux méthodes. Avant la phase d'entretien, 78% des patients en RC étaient MRD négatifs en CMF (seuil 10^{-5}) contre 72% en NGS au même seuil et, cependant, contre 27% MRD négatifs en NGS à un seuil de 10^{-6} .

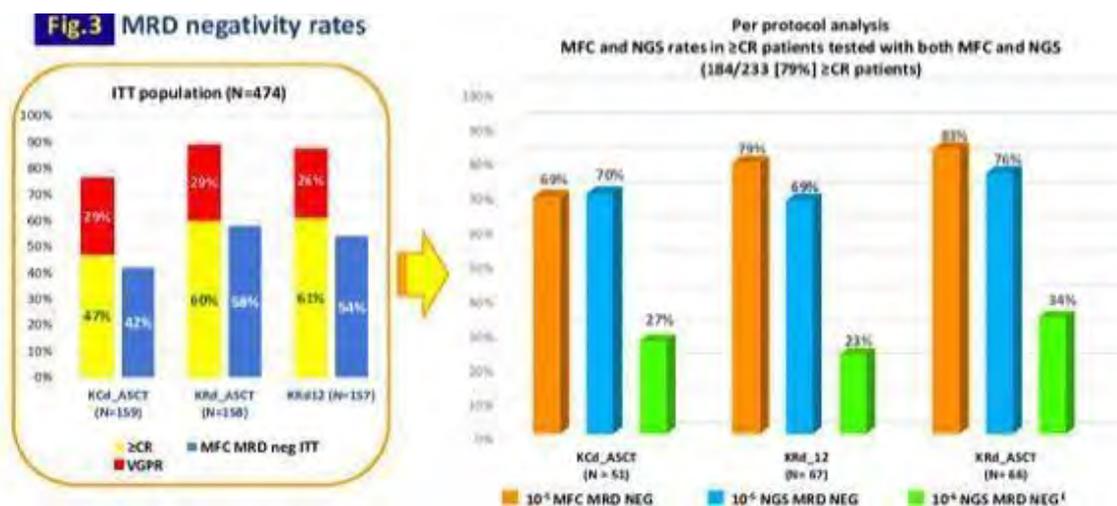


Figure 13 : Comparaison des niveaux de MRD par NGS et CMF de patients au moins en réponse complète. Entre les deux techniques avec une même sensibilité, une concordance de 86% a été observée à 10^{-5} ($n=335$, $r=0,61$) et de 78% à 10^{-6} ($n=56$, $r=0,77$). Oliva S et al 2020.

L'étude insiste donc sur l'excellente concordance entre CMF et NGS, particulièrement lorsque le seuil de sensibilité est le même, et la nécessité d'un suivi plus long pour des conclusions définitives.

Kriegsmann et al ([Kriegsmann et al 2020](#)) proposent en 2020 une étude comparative entre cytométrie en flux (Cytognos CMF MM MRD) et séquençage NGS (Adaptive Biotechnologies NGS MRD assay). Des paires d'échantillons de moelle osseuse provenant de 125 patients atteints de myélome multiple ont été analysées. La charge tumorale et les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été calculées.

Le seuil de MRD le mieux adapté selon eux a été choisi à 10^{-5} . Ce cut-off a été établi comme mieux adapté pour engendrer une proportion tolérable de cas non évaluables dans les deux méthodes. Le taux de concordance global entre NGS et CMF était de 68%.

Cette étude a démontré une bonne concordance entre NGS et CMF pour évaluer le statut MRD à un seuil de 10^{-5} et la charge tumorale, en insistant sur le fait que le nombre d'événements totaux analysés et donc les limites de détection et de quantification en résultants pourraient influencer de manière significative le choix du seuil de MRD le mieux adapté pour une étude avec une proportion tolérable de cas non évaluables.

PARTIE III : Comparaison des méthodes de CMF et de NGS pour analyser la MRD dans le myélome multiple

L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse consiste, comme précédemment spécifié dans les objectifs de travail, à comparer les méthodes de CMF et de NGS pour analyser la MRD chez des patients atteints de myélome multiple.

Ce travail de thèse intervient après le début de l'essai CASSIOPEIA mené par l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) qui évalue l'efficacité de la quadrithérapie daratumumab-bortezomib-thalidomide-dexaméthasone (D-VTD) en tant que première ligne de traitement pour des patients atteints de myélome multiple éligibles pour une greffe.

Fruit d'une collaboration entre l'IFM et le groupe HOVON, l'essai CASSIOPEIA est une étude visant à optimiser le traitement d'induction et de consolidation et évaluer la maladie résiduelle.

Les données de MRD de l'essai CASSIOPEIA, partiellement publiées, ont montré une bonne concordance entre NGS et CMF (83,5 % dans les échantillons appariés, sensibilité de 10^{-5}) ([Avet-Loiseau et al 2019](#)).

I. Matériel et méthode

Les recommandations de l'IMWG étant d'utiliser le même cut-off de positivité avec les 2 méthodes, le but était de réaliser les deux techniques de MRD sur le même prélèvement médullaire de départ (même tube). De plus, afin de déterminer si le délai entre le

prélèvement et l'analyse a le même impact sur les deux méthodes, la MRD par CMF et NGS a été réalisée à T0 et à T48H. Une MRD par CMF à T24H a également été réalisée.

Ces prélèvements ont été réalisés par les cliniciens du service d'hématologie du CHU de Toulouse (Institut Universitaire du Cancer) ou bien par des cliniciens de centres de l'IFM extérieurs au CHU de Toulouse.

Près d'un an de recueil (d'avril 2021 à février 2022) ont permis de réunir 31 patients pour lesquels les prélèvements médullaires étaient suffisamment riches pour réaliser sur le même tube les 2 techniques aux différents timepoints.

1. NGS : matériel et méthode

La préparation des librairies (c'est-à-dire de l'ADN prêt à être séquencé) est indispensable pour le séquençage des réarrangements des immunoglobulines. Un frottis coloré au MGG est fait simultanément pour évaluer l'hémodilution de la moelle.

Les prélèvements médullaires ont été énumérés avant l'étape de lyse pour permettre de travailler sur des prélèvements d'au moins 60 millions de leucocytes (afin notamment d'en réserver au moins 10 millions pour la CMF).

Ces prélèvements étaient reçus au laboratoire du lundi au mercredi afin de pouvoir réaliser les tests à T0 et T48.

La lyse à T0 était réalisée sur la moitié du volume du prélèvement (contenant 20M de leucocytes) pour obtenir sur culot sec au moins 6 millions de globules blancs. Le reste de la moelle osseuse était conservé à température ambiante sous PSM.

Deux jours plus tard, donc à T48, une deuxième lyse était réalisée sur le reste du prélèvement, avec à nouveau l'obligation de contenir au moins 20 millions de globules blancs. Sur culot sec, il est nécessaire d'obtenir à nouveau au moins 6 millions de globules blancs.

La PCR multiplex est constituée de plusieurs primers et permet de réaliser l'amplification de multiples combinaisons dans un même puit. Une plaque comporte 96 puits pour permettre le séquençage de 22 patients en "quadriplacat" (2 contrôles sont également ajoutés).

L'amplification des réarrangements est permise grâce à des mix de primers. Sont recherchées les réarrangements VDJ et DJ des locus IGH des immunoglobulines (80% des patients ont un réarrangement DJ incomplet qui ne s'exprime pas), ainsi que les réarrangements K et L (sur le principe que si K est non fonctionnel, L est exprimé). Les primers ciblent les zones Fr des régions variables.

Un kit permet de condenser toutes les amplifications de réarrangement en un seul puit (PCR VDJ Fr1, Fr2, deux PCR VDJ Fr3, PCR DJ, PCR K) + réarrangement L.

La première étape de pré amplification en 3 cycles et d'élongation (dans une pièce pré PCR dédiée pour éviter tout phénomène de contamination) permet d'amplifier les réarrangements des immunoglobulines des chaînes lourdes (IgH-DJ et VDJ) et légères (IgK et IgL). Grâce aux amorces V et J hautement multiplexées, la PCR permet de cibler les différents

segments. Les amorces V portent une étiquette (ou tag) unique et une « queue flottante » permettant la seconde amplification.

L'amplification des gènes de ménage sur toutes les cellules nucléées permet de quantifier le nombre de cellules analysées.

Une enzyme, l'exonucléase, élimine les amorces en excès.

Les produits de l'étape de pré amplification sont amplifiés dans une pièce thermocycleur.

L'échantillon est dénaturé par de la soude, puis incorporé dans un Flowcell. Les brins simple brins viennent se fixer puis débute la réaction de séquençage à l'aide des primers et des nucléotides marqués.

Les résultats de séquençage doivent par la suite être comparés aux réarrangements amplifiés lors de la calibration initiale (échantillons de diagnostic initial). Le numéro qui a servi à la calibration devient le numéro du patient.

Les manipulations techniques réalisées, calibrations et résultats de MRD sont tracées sous le logiciel MyelomaSpace. Les résultats des réarrangements (fichier de séquençage généré) comparés à la calibration initiale sont envoyés à Adaptive®, cette comparaison nécessitant une puissance d'analyse bio-informatique de l'ordre de leur expertise. Les résultats sont renvoyés sous forme de rapport comparatif qui va permettre d'évaluer la MRD.

Si le réarrangement initial est retrouvé la MRD est rendue positive et quantifiée en nombre de cellules tumorales par million de cellules (*per million count*).

Si le réarrangement n'est pas retrouvé la MRD est considérée négative ou positive *below LOD* (en dessous de la limite de détection de la technique). Quoi qu'il en soit, dans ce cas de figure, la MRD est rendue $<10^{-6}$ si le nombre de cellules analysées est insuffisant pour atteindre ce seuil de sensibilité.

2. CMF : matériel et méthode

Deux techniques de marquage sont mises en place : marquage de surface et marquage intracytoplasmique.

Le marquage de surface est réalisé dans un volume maximal de 50µl sur 5 à 10 millions de cellules par tube et identifie les antigènes CD38, CD138, CD19, CD45, CD56, CD27, CD117 et CD81.

La technique de marquage intracytoplasmique consiste à mettre en évidence les marqueurs intracellulaires par le biais d'un pool d'anticorps couplés à des fluorochromes : ce sont tous les antigènes retrouvés dans la technique de marquage de surface à la différence que les anticorps anti CD117 et CD81 sont remplacés par des anticorps anti-κ et anti-λ.

Ces anticorps entrent à l'intérieur de la cellule grâce à un kit de perforation cellulaire.

L'IntraPrep commercialisé par Beckman Coulter® est un ensemble de deux réactifs de perméabilisation prêts à l'emploi conçus pour la détection immunologique d'antigènes leucocytaires intracellulaires par cytométrie de flux.

Après identification des tubes « patient », le prélèvement médullaire est agité par retournements puis incorporé au pool d'anticorps membranaires marqués. Le mélange est passé au Vortex et incubé à température ambiante à l'abri de la lumière. Le premier réactif IntraPrep va permettre de fixer les cellules avant ajout d'un deuxième réactif qui va perméabiliser la membrane des globules blancs (et lyser les rouges). Suite à cela, le volume juste d'anticorps intracytoplasmiques est intégré à l'ensemble, incubé, rincé au Cellwash et centrifugé. Le tube est vidé par retournements lents et le culot cellulaire maintenu dans du Cellwash pour permettre l'acquisition sur le cytomètre (Navios®).

Une numération cellulaire est ensuite nécessaire sur la suspension de moelle osseuse avant la réalisation de l'étape de macrolyse, le marquage devant être fait sur 4 à 5 millions de cellules par tube.

Après énumération (le marquage doit être réalisé sur 4 à 5 millions de cellules par tube K/L), l'étape de macrolyse est réalisée sur 1 à 2ml de la suspension cellulaire de moelle : le volume de liquide de lyse (Versalyse) utilisé est 10 fois supérieur au volume de suspension cellulaire. Le culot est repris par un volume final de 200µl de milieu de culture cellulaire (RPMI SVF 20%).

En amont de la stratégie de fenêtrage des plasmocytes par cytométrie de flux, l'immunophénotypage doit être effectué sur deux tubes, tube 1 et tube 2 dont les résultats doivent être corrélés car ces deux tubes renferment chacun un panel d'anticorps membranaires et intracytoplasmiques uniques. D'une part pour phénotyper les populations plasmocytaires à partir des principaux récepteurs (notamment CD38/138, CD19/45, CD56/117, CD27/81), d'autre part pour évaluer la clonalité plasmocytaire (uniquement possible grâce au tube 2).

	FITC	PE	PerCP 5.5	PC7	APC	APCH7	V450	BV510
Tube 1	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD138	CD27
Tube 2	CD38	CD56	CD45	CD19	c kappa	c lambda	CD138	CD27

Tableau 11 : Panels d'anticorps retrouvés dans les tubes 1 et 2 pour phénotyper les plasmocytes et caractériser la clonalité

Les données acquises ont par la suite été traitées sur le logiciel d'analyse Kaluza (développé par Beckman Coulter®). Ce logiciel presque autonome est conçu pour fonctionner avec les fichiers *.fcs et *.lmd générés par les cytomètres de flux.

Le principe de fenêtrage du logiciel va permettre, à partir des fichiers importés depuis le cytomètre, l'identification des cellules d'intérêt en fonction de deux paramètres : FSC (forward angle scatter, taille de la cellule) et SSC (side angle scatter, granularité ou complexité interne). D'autres indicateurs sont pris en compte pour l'exclusion des débris de petites tailles

et des doublets qui parasitent les interprétations (FSH-H, Forward scatter height et FSA Forward scatter area).

Les images du cytomètre sont acquises une fois les réglages effectués et chaque échantillon est identifié par ses marqueurs.

Pour permettre d'identifier les populations plasmocytaires tumorales parmi les populations saines, le fenêtrage dédié à la MRD, élaboré par l'équipe du CytHem (Cytométrie Hématologique du Myélome) a permis de s'affranchir des plasmocytes normaux pour ne compter que les plasmocytes tumoraux selon la clonalité des cellules. Les compensations et les marquages sont vérifiées sur le logiciel Kaluza.

Dans Kaluza, les fichiers correspondants aux échantillons patients sont soumis à la matrice de compensation élaborée. Les réglages doivent être appliqués à tous les échantillons patients. Les compensations ont dû être manuellement ajustées pour chaque patient et les marquages vérifiés.

Les données « patient » sont analysées comme suit : la première étape consiste à encadrer les leucocytes sur les dots plots SSC/FSC. Puis les lymphocytes sont fenêtrés sur le dot plot CD45/SSC et les lymphocytes CD19+. Par la suite, il est nécessaire de vérifier et ajuster le marquage κ/λ des lymphocytes B. Par ailleurs sur le dot plot CD38/CD138 et CD38/SSC les plasmocytes sont sélectionnés sur une très large zone.

II. Résultats

Trente et un patients au total ont été inclus dans l'étude dont 14 femmes.

La médiane d'âge est de 62,5 ans : le patient le plus âgé avait, au moment de l'étude, 65 ans, le plus jeune 51 ans.

Parmi les patients inclus dans l'étude, 48% (15) étaient des patients prélevés au centre hospitalier universitaire de Toulouse, 52% (16) étaient envoyés par des centres hospitaliers (universitaires ou non) extérieurs.

Concernant la prise en charge thérapeutique, 58% (18) d'entre eux étaient des patients en première ligne de traitement, 42% (13) étaient en rechute.

Le pronostic est évalué par la cytogénétique : parmi les patients, 39% (12) ont une cytogénétique favorable (LP = 0), 32% (10) sont à haut risque (LP > 1), 26% (8) sont intermédiaires (0 < LP ≤ 1). Les données de cytogénétique sont manquantes pour un patient issu d'un centre hospitalier extérieur (3%).

Les différentes méthodes d'évaluation de la MRD ont des caractéristiques analytiques différentes : un test donné peut avoir une limite de détection inférieure à 10^{-6} (c'est le cas du NGS ici). Mais l'intérêt de choisir un seuil de sensibilité < 10^{-5} est de permettre de s'aligner sur les recommandations établies et comparer les deux méthodes entre elles.

Les recommandations de l'IMWG préconisent un seuil minimal de sensibilité à 10^{-5} : le cut-off pour les deux techniques a été établi à 10^{-5} pour permettre une comparaison du statut de la MRD chez les patients.

A partir du même prélèvement médullaire de départ (même tube), la comparaison des deux techniques NGS et CMF est réalisée en deux temps : les résultats ont été observés à T0 et T48 pour évaluer la concordance ou non entre les deux méthodes de mesures et l'impact du délai entre le prélèvement et l'analyse.

A T0 (tableau 11), parmi les 31 patients, 68% ont des MRD concordantes :

- 45% des patients ont un statut « MRD négative » pour les deux méthodes (NGS $< 10^{-5}$ /CMF $< 10^{-5}$)
- 23% des patients ont un statut « MRD positive » pour les deux méthodes (NGS $> 10^{-5}$ /CMF $> 10^{-5}$)

Pour 32% des patients, les 2 méthodes rendent des résultats discordants au seuil de 10^{-5} :

- 26% sont détectables en CMF, négative en NGS
- 6% sont détectables en NGS, indétectable en CMF

	CMF $< 10^{-5}$	CMF $> 10^{-5}$	
NGS $< 10^{-5}$	45% (14)	26% (8)	71% (22)
NGS $> 10^{-5}$	6% (2)	23% (7)	29% (9)
	52% (16)	48% (15)	31

Tableau 11 : Observation des discordances à T0. Près d'un tiers de l'échantillon ne rend pas le même résultat d'une méthode à l'autre

Il est indispensable de trouver une explication à ces discordances car elles pourraient impliquer une prise en charge thérapeutique différente en fonction de la méthode d'évaluation de la MRD pour le même patient.

Les données des patients à disposition ont permis une comparaison des cas discordants et non discordants dans cette cohorte (tableau 12).

		Cas concordants	Cas discordants
Provenance	Toulouse	38% (8)	70% (7)
	Extérieur	62% (13)	30% (3)
Traitement	1 ^{ère} ligne	52% (11)	70% (7)
	Rechute	48% (10)	30% (3)
Cytogénétique	Favorable	33% (7)	50% (5)
	Intermédiaire	28% (6)	20% (2)
	Haut risque	33% (7)	30% (3)
		n = 21 (68%)	n = 10 (32%)

Tableau 12 : Comparaison entre les cas concordants et discordants évalués par les deux méthodes à T0

A propos des cas concordants, une majeure partie proviennent de centres hospitaliers extérieurs. Par la suite, les proportions sont harmonieusement réparties en ce qui concerne la ligne de traitement et la cytogénétique.

26% des patients de la cohorte sont des patients discordants $NGS < 10^{-5} / CMF > 10^{-5}$

- 75% d'entre eux sont toulousains
- 75% sont en 1^{ère} ligne de traitement
- 75% ont une cytogénétique favorable, 12,5% intermédiaire, 12,5% à haut risque
- 63% d'entre eux ont une MRD détectable en NGS entre 10^{-5} et 10^{-6}

Parmi les 2 patients discordants (6%) $NGS > 10^{-5} / CMF < 10^{-5}$:

- 1 toulousain en rechute avec une cytogénétique favorable au diagnostic
- 1 extérieur en rechute avec une cytogénétique à haut risque au diagnostic

Finalement, à propos de l'ensemble des cas discordants, il s'agit majoritairement de patients toulousains, en première ligne de traitement, sans majorité notable concernant la cytogénétique.

Le délai de transport était une des hypothèses qui aurait pu expliquer les résultats discordants entre les deux méthodes. Cependant dans cette étude, le facteur temps ne semble pas discriminant puisque la majorité des patients discordants ont été prélevés à Toulouse.

Dans le contexte de l'essai CASSIOPEIA qui rassemble des prélèvements en provenance de plusieurs centres hospitaliers nationaux, la question de l'influence du délai de transport sur la stabilité du prélèvement de moelle osseuse et la viabilité des plasmocytes *ex vivo* s'est rapidement posée.

Pour essayer d'apporter des éléments de réponse, une cinétique de la MRD des patients a été établie à partir du même prélèvement médullaire initial dont on mesurait la MRD en deux points pour la technique NGS (à T0 et T48) et en trois points pour la CMF (à T0, T24 et T48).

En NGS, voici les résultats obtenus :

	T0	T48
Moyenne des cellules analysées	2 658 981	2 725 905
Ecart type	465 161	268 978

Tableau 13 : Moyenne et écart type du nombre total de cellules analysées par prélèvements en NGS à T0 et T48. Entre le nombre de cellules analysées entre les deux temps T0 et T48, il n'existe pas de différence significative (test de Student bilatéral, $t=0,44$, $n=30$ ddl au risque $\alpha = 0,05$).

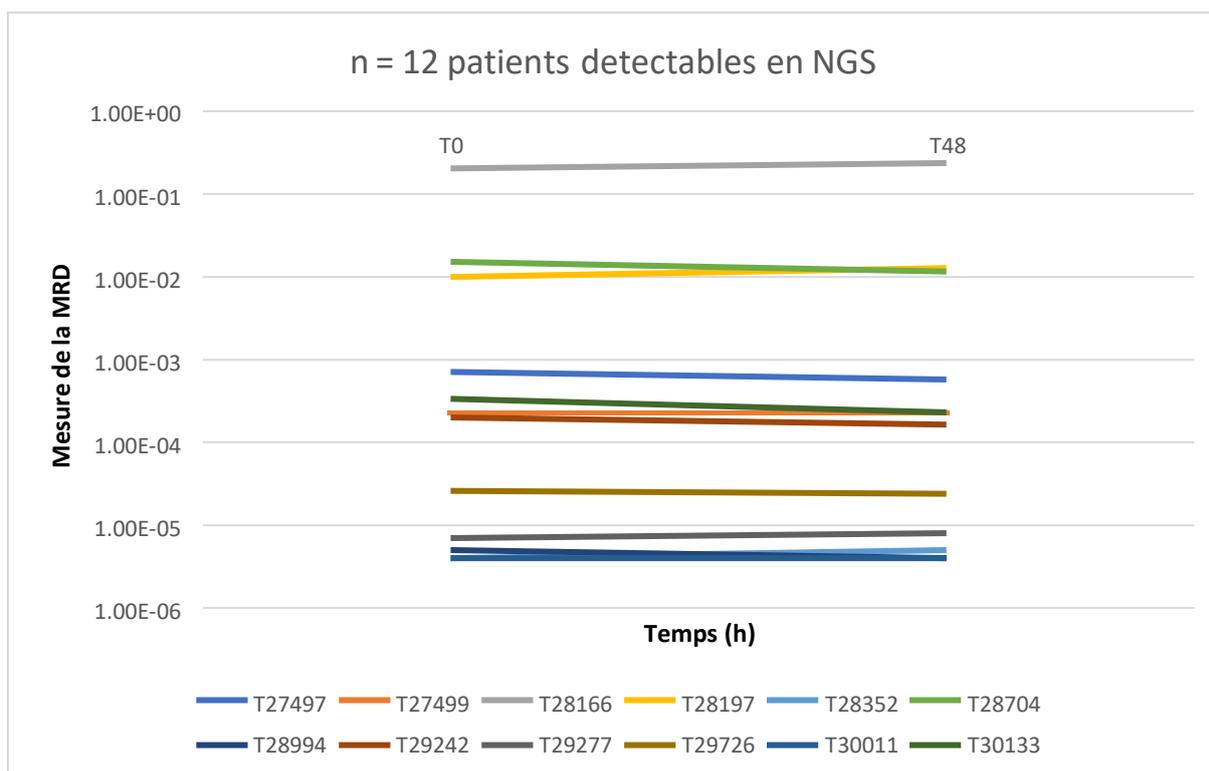


Figure 13 : Suivi de l'évaluation de la MRD à T0 et T48 en NGS à partir du même prélèvement de moelle osseuse. On observe une grande stabilité de la mesure à ces deux temps.

Concernant la technique de NGS, la cinétique en deux points (figure 13) permet de constater graphiquement la stabilité des MRD positives entre T0 et T48.

Parmi les 31 patients initialement évalués :

- 39% sont constamment détectables à T0 et T48
- 52% sont négatifs à T0 (les patients dont la MRD était indétectable à T0 n'ont pas été évalués à T48)
- 9% (3 patients) détectables à T0 pour lesquels la MRD à T48 n'a pas été évaluée

		Patients indétectables à T0	Patients détectables
Provenance	Toulouse	56% (9)	75% (9)
	Extérieur	44% (7)	25% (3)
Traitement	1 ^{ère} ligne	56% (9)	58% (7)
	Rechute	44% (7)	42% (5)
Cytogénétique	Favorable	38% (6)	33% (4)
	Intermédiaire	31% (5)	25% (3)
	Haut risque	25% (4)	42% (5)
		n = 16 (52%)	n = 12 (39%)

Tableau 14 : Comparaison entre les cas détectables et indétectables aux deux temps, évalués par NGS.

Une comparaison des patients de la cohorte (tableau 14) a été établie en fonction des données disponibles. En ce qui concerne la ligne de traitement et la cytogénétique, les proportions sont globalement respectées entre les patients dont la MRD était indétectable aux deux temps et ceux dont la MRD était détectable à T0 et T48. Les patients détectables proviennent en majeure partie du CHU de Toulouse.

En CMF, les résultats de la cinétique en trois points sont les suivants.

	T0	T24	T48
Moyenne de cellules analysées	1 017 385	820 567	787 329
Ecart type	309 501	258 986	174 680

Tableau 15 : Moyenne et écart type du nombre total de cellules analysées par prélèvements en CMF à T0, T24 et T48.

Deux graphiques ont été établis pour plus de clarté : le premier (figure 14) représente uniquement les patients dont la MRD était constamment détectable sur les trois temps, le second (figure 15) représente les trois patients pour lesquels, passé T0, la MRD est devenue indétectable en CMF.

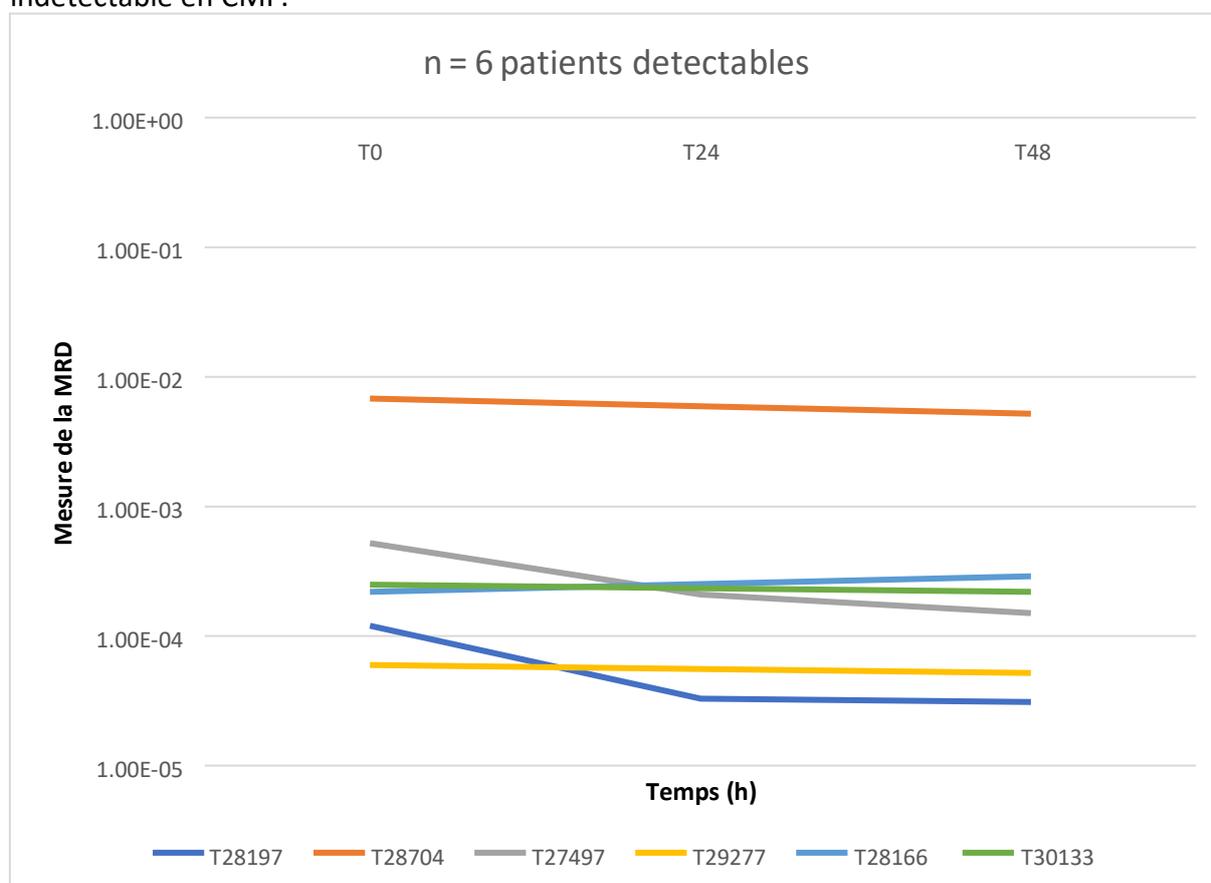


Figure 14 : Suivi de l'évaluation de la MRD à T0, T24 et T48 en CMF à partir du même prélèvement de moelle osseuse. Le graphique représente l'évaluation de la MRD parmi les 6 patients qui restent détectables sur les trois temps. La différence est significative entre la moyenne de cellules analysées à T0 et les valeurs disponibles à T24, ($p=0,027$, test apparié de Wilcoxon au risque $\alpha = 0,05$). De même, le nombre de cellules analysées en moyenne à T0 est significativement différent par rapport à T48 ($p=0,0038$, test apparié de Wilcoxon au risque $\alpha = 0,05$)

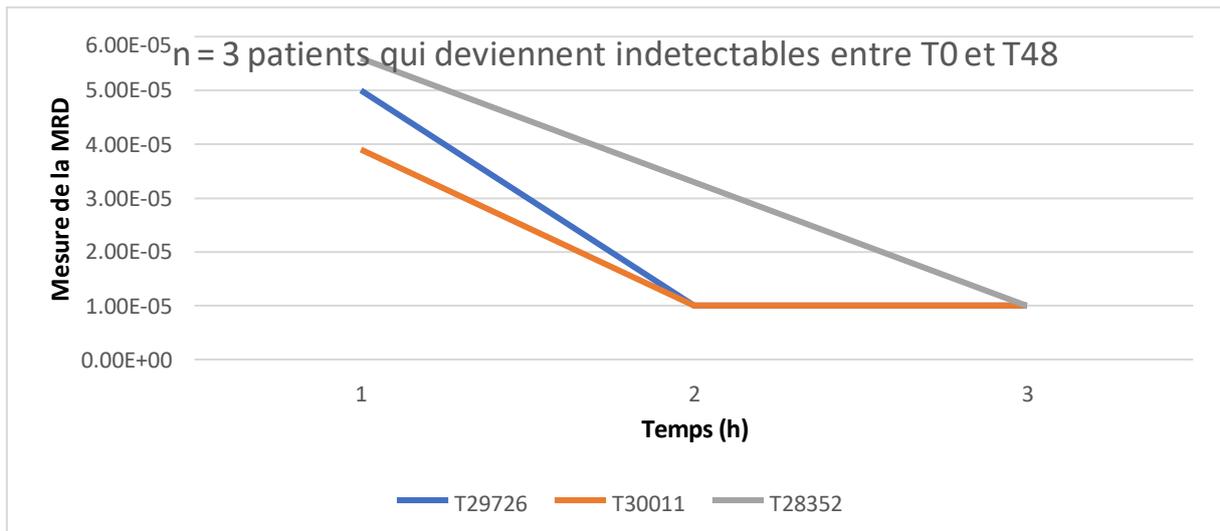


Figure 15 : Suivi de l'évaluation de la MRD à T0, T24 et T48 en CMF à partir du même prélèvement de moelle osseuse. Le graphique représente les 3 patients de la cohorte qui deviennent indétectables passé T0 dont un patient pour lequel la mesure à T24 n'a pas été réalisée (T28352)

Parmi les 31 patients :

- 19% sont détectables entre T0 et T48. Pour la moitié d'entre eux, la mesure n'a pas pu être réalisée à T24 (figure 14)
- 26% sont constamment indétectables
- 10% (3 patients) sont détectables à T0 et indétectables à T48 (figure 15)
- 45% (14 patients) ont été évalués uniquement à T0 (57% étaient indétectables à T0)

Voici les données disponibles pour décrire les profils de patients détectables et indétectables aux trois points, en CMF :

		Patients indétectables	Patients détectables
Provenance	Toulouse	12% (1)	33% (2)
	Extérieur	88% (7)	67% (4)
Traitement	1 ^{ere} ligne	75% (6)	67% (4)
	Rechute	25% (2)	33% (2)
Cytogénétique	Favorable	25% (2)	50% (3)
	Intermédiaire	25% (2)	50% (3)
	Haut risque	50% (4)	0
		n = 8 (26%)	n = 6 (19%)

Tableau 16 : Comparaison entre les cas détectables et indétectables aux trois temps, évalués par CMF.

En ce qui concerne les patients constamment indétectables en CMF, il s'agit majoritairement de patients issus de centres extérieurs, en première ligne de traitement.

Les patients détectables aux trois temps sont également, pour deux tiers d'entre eux, des patients prélevés en dehors du CHU de Toulouse, en première ligne de traitement. Ils ne comptent aucun patient à haut risque cytogénétique.

Parmi les trois patients détectables à T0 et indétectables à T48, un patient n'a pas pu être évalué à T24. Il s'agit d'un patient issu d'un centre hospitalier extérieur en première ligne, dont la cytogénétique est favorable. Les deux autres sont deux patients en rechute, dont la cytogénétique au diagnostic était rendue à « haut risque », l'un de Toulouse, l'autre d'un centre extérieur.

Finalement, concernant la variabilité des mesures de MRD au cours du temps, force est de constater que les valeurs évaluées sur 48h varient peu d'une technique à l'autre.

Concernant les patients dont la MRD est rendue indétectable après T0 en CMF, les 3 patients présentent un profil clinique différent.

A priori, les discordances constatées à T0 et T48 ne reposent pas sur le temps de transport. Cependant, en moyenne, 1 050 113 cellules ont été analysées à T0 pour ces 3 patients contre 593 887 à T48 soit une réduction de 44% du nombre de cellules disponibles pour l'analyse par CMF.

A T48 (tableau 17), parmi les 11 patients pour lesquels la MRD a été évaluée, 82% sont concordants :

- 27% des patients ont une MRD indétectable pour les deux méthodes (NGS < 10^{-5} /CMF < 10^{-5})
- 55% (6) des patients ont une MRD détectable pour les deux méthodes (NGS > 10^{-5} /CMF > 10^{-5})

A T48H, 18% (2) des patients présentent des résultats discordants au cut-off de 10^{-5} .

	CMF < 10^{-5}	CMF > 10^{-5}	
NGS < 10^{-5}	27% (3)	0	27% (3)
NGS > 10^{-5}	18% (2)	55% (6)	73% (8)
	45% (23)	55% (6)	11

Tableau 17 : Observation des discordances à T48. 18% des patients sont considérés NGS > 10^{-5} / CMF < 10^{-5} .

Les deux cas de figure, cas concordants et cas discordants sont répartis comme suit :

		Patients concordants	Patients discordants
Provenance	Toulouse	22% (2)	50% (1)
	Extérieur	78% (7)	50% (1)
Traitement	1ere ligne	67% (6)	50% (1)
	Rechute	33% (3)	50% (1)
Cytogénétique	Favorable	45% (4)	0
	Intermédiaire	33% (3)	0
	Haut risque	22% (2)	100% (2)
		n = 9 (82%)	n = 2 (18%)

Tableau 18 : Comparaison entre les cas concordants et discordants évalués par les deux méthodes a 48.

Concernant les deux cas discordants, ils sont tous deux détectables en NGS ($> 10^{-5}$, 2 809 083 cellules analysées en moyenne) et indétectables en CMF ($< 10^{-5}$, 675 289 cellules analysées en moyenne) :

- Un patient de Toulouse, en rechute, de cytogénétique à haut risque
- Un patient d'un centre extérieur, en première ligne de traitement, de cytogénétique à haut risque

Il demeure compliqué d'envisager une hypothèse discriminante sur 2 cas de patients discordants, si ce n'est le nombre de cellules analysées.

Malgré la présence de cas discordants, il existe une concordance entre les deux techniques : à T0 68% de cas concordants sont observés ($n = 31$) et 82% ($n = 10$) à T48.

Cela signifie que pour un nombre significatif de patients, une MRD $< 10^{-5}$ ne correspond pas à la même réalité biologique d'une méthode de détection à l'autre. A T0, au seuil de 10^{-5} il y a 32% de discordances entre les deux méthodes, soit près d'un tiers des patients dont la prise en charge peut différer selon que la MRD est mesurée par CMF ou NGS.

Des études antérieures (Avet-L'Oiseau et al 2015, Perrot A et al 2018) ont démontré un pouvoir discriminant du statut MRD à 10^{-6} supérieur à celui du statut MRD à 10^{-4} ou 10^{-5} sur la survie sans progression et la survie globale. Dans le cas de cette thèse, parmi les patients considérés négatifs en NGS au seuil de sensibilité de 10^{-5} :

- A T0, 20% des patients (6) considérés $< 10^{-5}$ sont en réalité $> 10^{-6}$ (tableau 19)
- A T48, 27% des patients (3) considérés $< 10^{-5}$ sont en réalité $> 10^{-6}$ (tableau 20)

T0	CMF $< 10^{-5}$	CMF $> 10^{-5}$		
NGS $< 10^{-5}$	45% (14)	26% (8)	71% (22)	n = 31
NGS $> 10^{-5}$	6% (2)	23% (7)	29% (9)	
NGS $< 10^{-6}$	39% (12)	13% (4)	52% (16)	n = 31
NGS $> 10^{-6}$	13% (4)	35% (11)	48% (15)	

Tableau 19 : Comparaison du rendu des résultats à T0 à deux seuils différents (10^{-5} et 10^{-6}).

	CMF $< 10^{-5}$	CMF $> 10^{-5}$		
NGS $< 10^{-5}$	27% (3)	0	27% (3)	n = 11
NGS $> 10^{-5}$	18% (2)	55% (6)	73% (8)	
NGS $< 10^{-6}$	0	0	0	n = 11
NGS $> 10^{-6}$	45% (5)	55% (6)	100%	

Tableau 19 : Comparaison du rendu des résultats à T48 à deux seuils différents (10^{-5} et 10^{-6}).

Le travail de cette thèse suggère donc que l'utilisation d'un seuil à 10^{-5} pour définir le statut MRD ne définit pas exclusivement les mêmes patients selon la méthode utilisée.

Par ailleurs, par CMF, la prise en charge de la MRD nécessite un nombre de cellules suffisant ($> 10^6$) au vu des patients pour lesquels la MRD est indétectable passé T0 (contrairement au NGS pour lequel ce phénomène n'est pas observé). La MRD semble peu impactée par le délai malgré la fragilité des plasmocytes ex vivo chez certains patients. Il n'a pas été possible d'établir un profil clinique type pour ces patients.

III. Discussion

La MRD est mesurée dans un nombre conséquent d'essais cliniques sur le myélome multiple.

Une grande hétérogénéité persiste dans ces essais quant à la façon dont elle est évaluée et rapportée, engendrant des défis supplémentaires pour l'interprétation des données.

De la méta-analyse déjà citée de Munshi et al ([Munshi NC et al 2017](#)), il a été retenu qu'une MRD négative conférait une diminution de 50 % du risque de progression et de mortalité. Malgré cette réduction cliniquement importante, une proportion significative de patients rechute et décède de la maladie probablement du fait d'une sensibilité plus faible des anciennes techniques de cytométrie en flux multiparamétrique utilisées dans les études incluses.

Le suivi de la MRD semble devenir incontournable dans la prise en charge d'un patient atteint de myélome multiple, même si à l'heure actuelle aucune recommandation ne préconise son utilisation en dehors des essais cliniques. En 2016, elle a été intégrée aux critères de réponse de l'IMWG pour deux raisons. D'une part, de nombreux articles et études s'accordent à affirmer que la présence et la persistance de la MRD chez les patients atteints de myélome est associée à une survie sans progression et une survie globale plus mauvaises, indépendamment des méthodes de détection utilisées. ([Hou J et al 2016](#), [Korde N et al 2014](#), [Martinez-Lopez J et al 2014](#), [Paiva B et al 2008](#)). D'autre part, parmi les patients qui obtiennent une RC, les résultats peuvent être encore stratifiés lorsque l'évaluation de la MRD est prise en considération ([Lahuerta J-J et al 2017](#), [Munshi NC et al. 2017](#), [Martinez-Lopez J et al 2014](#)).

Les méthodes les plus courantes pour l'évaluation de la MRD dans la moelle osseuse sont le séquençage de nouvelle génération (NGS) et la cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) avec des protocoles récents développés par EuroFlow visant une sensibilité plus élevée (cytométrie en flux de nouvelle génération, NGF).

Le NGS et le NGF sont des techniques toutes deux capables de couvrir l'intervalle logarithmique de 10^{-6} (c'est-à-dire d'identifier un plasmocyte aberrant parmi 1 000 000 de cellules nucléées) grâce à leurs LOD respectifs.

La CMF est largement disponible pour la détection de la MRD et un échantillon de diagnostic initial n'est pas nécessaire au suivi du patient, contrairement au NGS. Au départ, la plupart des laboratoires réalisaient cette détection en CMF avec une limite de détection d'au moins 10^{-4} . Le passage de ce seuil à 10^{-5} selon les recommandations de l'IMWG représente une amélioration majeure en termes de suivi de la maladie.

Le NGS repose sur l'identification et la quantification des réarrangements VDJ et DJ dans les gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH) et des chaînes légères kappa et lambda. Ces réarrangements sont uniques pour un patient donné et conservés par le clone malin au cours de la maladie

La MRD par NGS est actuellement disponible par le biais de la plateforme Adaptive Biotechnologies, Clono-Seq® qui a été cliniquement et analytiquement validée et autorisée par la FDA. L'identification du clonotype initial est possible chez plus de 98% des patients. Avec 20 µg d'ADN (soit 2 à 3 millions de cellules nucléées), le NGS a un seuil de sensibilité de $6,8 \times 10^{-7}$ (Martinez-Lopez J et al 2014).

Aux mêmes seuils de sensibilité, la CMF et la NGS sont hautement concordantes (Avet-Loiseau H et al 2019). Dans l'essai CASSIOPEIA, l'évaluation de la MRD après consolidation par CMF et NGS à un seuil de 10^{-5} a montré une concordance globale de 83,5 % entre les deux méthodes et une concordance de 94,4 % chez les patients en rémission complète (Moreau P et al 2019). Idem dans l'essai FORTE, l'évaluation de la MRD par NGF et NGS (clonoSEQ) a été comparée parmi les patients ayant obtenu une rémission complète. À des niveaux de 10^{-5} , la concordance observée était de 86 %.

Cependant la réduction logarithmique du seuil de sensibilité de la technique est associée à une amélioration du pouvoir discriminant de la MRD. Les études IFM2009 et PETHEMA/GEM2012MENOS65 ont montré qu'une MRD indétectable à 10^{-6} permettait de discriminer les patients présentant l'évolution clinique la plus favorable (Paiva B et al 2019, Perrot A et al 2018).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes demandés si un seuil de MRD à 10^{-5} identifie les mêmes populations de patients « MRD négative » et « MRD positive » entre les deux techniques, NGS et CMF.

Par exemple, dans une étude comme l'essai de phase 3 du sujet jeune (MIDAS, IFM, recrutement en cours), qui adapte le traitement des patients en fonction du statut MRD à 10^{-5} , certains patients pourraient-ils ne pas avoir le même traitement d'une méthode à l'autre ?

Les travaux de cette thèse montrent qu'au seuil de 10^{-5} , près d'un tiers des patients de l'étude à T0 sont rendus discordants entre les deux techniques. Ces discordances sont rattrapées en partie lorsque deux seuils différents sont appliqués (10^{-5} pour la cytométrie de flux, 10^{-6} pour le NGS). Donc, au même seuil de détection, il existe un réel impact biologique (et un potentiel impact clinique qui reste à étudier) car selon le résultat rendu en fonction de la technique utilisée, la prise en charge peut différer.

Ces discordances ne sont à priori pas liées au délai de transport du prélèvement au vu de la stabilité de mesure de la MRD pour les deux méthodes, particulièrement le NGS. : le « facteur temps » ne permet pas d'expliquer les discordances entre les deux techniques.

Les deux techniques NGS et CMF sont toutes deux des méthodes très sensibles et choisir entre les deux dépend finalement de questions de faisabilité et de logistique.

Le NGS nécessite un échantillon primaire qui sera l'échantillon de référence pour l'identification des clones : cet aspect peut ne pas être réalisable chez une partie des patients. Cependant, les échantillons peuvent être congelés, et donc conservés (intérêt pour des études ultérieures, notamment en cas de rechute)

Également le NGS nécessite moins de cellules à analyser pour obtenir la même sensibilité que la CMF.

Concernant la CMF, elle ne nécessite pas d'échantillon de référence, mais les échantillons doivent être analysés dans les 24-48 heures, avec 10 millions d'événements par tube, indispensable pour approcher une sensibilité de 10^{-6} . Pour autant, il est possible de faire face, comme dans cette étude, à des échantillons de moelle osseuse avec des quantités amoindries de plasmocytes viables *ex vivo*, contrairement au NGS qui quantifie directement l'ADN tumoral, qui subsiste dans le tube même si les cellules sont mortes.

Le seuil de 10^{-5} est le plus souvent utilisé et est intégré dans le consensus actuel de l'IMWG et de l'EMA. Des données plus récentes indiquent que des seuils plus bas (notamment 10^{-6}) devraient avoir un impact pronostique encore plus important ([Paiva B et al, 2019](#) ; [Perrot A et al, 2018](#)).

Ici, parmi les patients considérés indétectables en NGS au seuil de 10^{-5} , 20% sont en réalité détectable au seuil de 10^{-6} . Pour plus de transparence et de justesse, la MRD doit être annotée dans les rapports et essais scientifiques en citant la méthode et le seuil utilisé. Les seuils doivent être adaptés à la méthode utilisée et le suivi de la MRD du patient doit être constamment appréhendé par la même méthode de mesure.

Enfin, il faut garder à l'esprit que ces méthodes n'étant pas interchangeables, la comparaison des taux de MRD négatives à 10^{-5} entre tel ou tel essai clinique n'est pas souhaitable si les techniques utilisées diffèrent.

IV. Conclusion

La MRD a permis une évolution conséquente dans le suivi des patients atteints de myélome multiple vers une thérapie stratifiée dans le contexte d'essais cliniques randomisés. Les lignes directrices de l'IMWG recommandent le NGS ou les tests de CMF multiparamétriques pour l'évaluation de la MRD dans la moelle osseuse, chaque méthode présentant des avantages et des limites.

La NGF et la NGS peuvent toutes deux atteindre une sensibilité de 10^{-6} pour un plus grand nombre de cellules analysées : le facteur le plus important n'est pas la technique elle-même mais la capacité à détecter des niveaux profonds de MRD, en évitant les discordances liées à des limites de détection inadaptées. Le risque intrinsèque de faux négatif existera toujours pour les deux méthodologies en raison de la nature hétérogène de la maladie ([Medina et al, 2020](#)).

Globalement, cette thèse souligne l'assez bonne concordance entre NGS et CMF malgré un échantillon de patients réduit et de l'utilisation d'une technique de cytométrie en flux conventionnelle n'atteignant pas des taux de sensibilité de 10^{-6} du NGF. Il reste possible d'utiliser l'une ou l'autre méthode pour détecter et évaluer la MRD chez les patients atteints de myélome multiple.

Les recommandations de l'IMWG suggère un seuil de 10^{-5} comme seuil de sensibilité optimale pour la détection de la MRD dans le prélèvement médullaire. Cependant, les deux techniques ne considèrent pas la même cible : le NGS quantifie l'ADN présumé tumoral issu du prélèvement médullaire, la CMF les plasmocytes présumés tumoraux vivants *ex vivo*.

De fait, il est essentiel de considérer deux seuils différents en fonction de l'une ou l'autre technique au risque d'observer des discordances qui pourraient impacter la prise en charge thérapeutique du patient.

PARTIE IV : Bibliographie

1. Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma. *Experimental Hematology*. 2006;34(10):1289-95.
2. Alaterre E. Identification fine des cellules plasmocytaires normales et tumorales dans la moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple en cytométrie en flux. *Médecine humaine et pathologie*. Thèse de doctorat : Biologie Santé. Université Montpellier, 2017.
3. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007;120(12):40-61.
4. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Hernandez J, San Miguel JF et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999;107(1):121–31.
5. Arcila ME, Yu W, Syed M, Kim H, Dogan A, Nafa K et al. Establishment of immunoglobulin heavy (IGH) chain clonality testing by next-generation sequencing for routine characterization of B-cell and plasma cell neoplasms. *J Mol Diagn*. 2019;21(2):330-42.
6. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
7. Avet-Loiseau H, Corre J, Lauwers-Cances V, Chretien ML. Evaluation of minimal residual disease (MRD) by next generation sequencing (NGS) is highly predictive of progression free survival in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood*. 2015;126(23):191.
8. Avet-L’Oiseau H. Minimal Residual Disease by Next-Generation Sequencing: Pros and Cons. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B*. 2016;35:425–30.
9. Avet-L’Oiseau H, Bene MC, Wuilleme S, Corre J, Macro M, Stoppa AM, Delforge M et al. Concordance of Post-consolidation Minimal Residual Disease Rates by Multiparametric Flow Cytometry and Next-generation Sequencing in CASSIOPEIA. *Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia*. 2019;19(10):3-4.
10. Bai Y, Orfao A, Chim CS, Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2018;181(1):11-26.
11. Bansal R, Kimlinger T, Gyotoku KA, Smith M, Rajkumar V, Kumar S. Impact of CD138 Magnetic Bead-based Positive Selection on Bone Marrow Plasma Cell Surface Markers. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021;21(1):48-51.
12. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé, Harousseau JL, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of many and multiple myelomas and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006;91(9):1234-40.
13. Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Tricot G et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology, American Society of Hematology Education Program Book*. 2003:248-78.
14. Barlogie B. High-dose therapy and innovative approaches to treatment of multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2001;38(2):21-27.
15. Biran N, Ely S, Chari A. Controversies in the assessment of minimal residual disease in multiple myeloma: clinical significance of minimal residual disease negativity using highly sensitive techniques. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014;9(4):368–78.

16. Boccadoro M, Gavarotti P, Fossati G, Pileri A, Tribalto M, Testa MG, et al. Low plasma cell 3(H) thymidine incorporation in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smouldering myeloma and remission phase myeloma: a reliable indicator of patients not requiring therapy. *Br J Haematol.* 1984;58(4):689-96.
17. Bouafia F, Drai J, Bienvenu J, Thiblemont C, Espinouse D, Salles G, Coiffier B. Profiles and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bull Cancer.* 2004;91:229-40.
18. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram, Darzentas N, Langerak AW et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia.* 2019;33: 2241-53.
19. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, Moreau P, Durie BG, Lonial S et al. (2011) International Myeloma Working Group (IMWG) consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem-cell transplantation. *Blood.* 2011;117(23):6063– 73.
20. Cedena MT, Martin-Clavero E, Wong S, Shah N, Bahri N, Alonso R et al. The clinical significance of stringent complete response in multiple myeloma is surpassed by minimal residual disease measurements. *PLoS One.* 2020;15(8).
21. Cornet E. Classification OMS 2017 des tumeurs plasmocytaires. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2019;511:34-40.
22. Corre J Perrot A, au nom de la commission formation de l'Intergroupe francophone du myélome (IFM) Maladie résiduelle minime dans le myélome : ce qui est prouvé, ce qui reste à l'être. *Correspondances en Onco-Hématologie.* 2020;15(5);245-51.
23. Costa LJ, Derman BA, Bal S, Sidana S, Gay F, Paiva B et al. International harmonization in performing and reporting minimal residual disease assesment in multiple myeloma trials. *Leukemia.* 2021;35:18–30.
24. Courville EL, Yohe S, Shivers S, Linden MA. VS38 identifies myeloma cells with dim CD38 expression and plasma cells following daratumumab therapy, which interferes with CD38 detection for 4 to 6 months. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(2):221-28.
25. Dejoie T, Lakomy D, Caillon H, Pegourié B, Decaux O. Recommandations de l'Intergroupe francophone du myélome pour l'harmonisation de l'analyse des électrophorèses des protéines sériques et urinaires dans le diagnostic et le suivi du myélome multiple. *Hématologie.* 2017;23(5):312-24.
26. Delorme S, Baur-Melnyk A. Imaging in multiple myeloma. *Eur J Radiol.* 2009;70(3):401-8.
27. Dimopoulos M, Terpose E, Comenzo RL, Tosi P, Moulopoulos LA, Durie BGM et al. International Myeloma Working Group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monito ring of mul tiple myeloma. *Leukemia.* 2009;23(9):1545-56.
28. Dimopoulos M, Oriol A, Nahi H, San Miguel J, Ahmadi T, Moreau P et al. Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2016;375(14):1319-31.
29. Dominik D. Alexander, Pamela J. Mink, Hans-Olov Adami, Philip Cole, Jack S. Mandel, Martin M. Oken, Dimitrios Trichopoulos. Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *Epidemiology.* 2007. 120;(12):40-61.
30. Estimation nationale issue d'une modélisation des données d'incidence observées jusqu'en 2005 : « Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en

2010 ; fiche Myélome multiple et maladies immunoprolifératives INVS » :
http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/donnees_localisation/myelome_multiple.pdf.

31. Feuillard J, Raphaël M. Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie*. 2000;6:345-59.
32. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68(1):1-31.
33. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Stewart AK, Avet-Loiseau H et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. 2004. *Cancer Research*, 64(4):1546-1558.
34. Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Sonneveld P, Palumbo A et al. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood*. 2011;117(11):3025-31.
35. Gay F, Cerrato C, Petrucci MT, Zambello R, Cavo M, Boccadoro M et al. Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: results from the FORTE trial *J Clin Oncol*. 2019;37(15):8002-8002.
36. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time PCR and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Research*. 1998;58(17):3957-64.
37. Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, Gutierrez N, Gonzalez M, San Miguel JF et al. Incomplete JDH rearrangements as novel tumor target for minimal residual quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia*. 2003;17(7):1398-403.
38. Gormley NJ, Turley DM, Dickey JS, Farrell AT,, Carrington L, Marti GE et al. Regulatory perspective on minimal residual disease flow cytometry testing in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):73-80.
39. Greipp et al. Classification ISS (International Staging System) JCO 2005.
40. Harousseau JL, Shaughnessy J, Richardson P. Multiple myeloma. *Hematology, American Society of Hematology Education Program*. 2004:237-256.
41. Ho C, Arcila ME. Minimal residual disease detection of myeloma using sequencing of immunoglobulin heavy chain gene VDJ regions. *Semin Hematol*. 2018;55(1):13-18.
42. Ho C, Syed M, Roshal M, Petrova-Drus K, Landgren O, Arcila ME et al. Routine evaluation of minimal residual disease in myeloma using NGS clonality testing – feasibility, challenges and direct comparison with high sensitivity flow cytometry. *J Mol Diagn*. 2011;23(2):181-99.
43. Hou J, Chng WJ, Usmani SZ, Zamagni E, Shimizu K, Jagannath S, Avet-Loiseau H et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):328-46.
44. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Walseth TF, Lee HC et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993;262(5136):1056-9.
45. Hutchison CA, Cockwell P, Reid S, Chandler K, Storr M, Bradwell AR et al. 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*. 2007;18(3):886-95.
46. Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Reactive plasmocytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*. 1999. 94(2):701-12.
 47. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 2009;114(25):5173-81.
 48. Kazandjian D, Korde N, Mailankody S Hill H, Roschewski M, Landgren O et al. Remission and progression-free survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone: five-year follow-up of a phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol*.2018;4(12):1781-3.
 49. Karfo R, Kabré E, Safir N, Bouabdellah M, Sankande J, Chabraoui L et al. Interprétation délicate de l'immunofixation des protéines sériques. Difficult immunofixation electrophoresis interpretation of serum proteins. *Pan Afr Med J*. 2018;30:130.
 50. Kim JE, Yoo C, Lee DH, Kim SW, Lee SJ, Suh C. Serum albumin level is a significant prognostic factor reflecting disease severity in symptomatic multiple myeloma. *Ann. Hematol*. 2010;89(4):391-7
 51. Korde N, Mailankody S, Roschewski M, Faham M, Kotwaliwale, Landgren O et al. Minimal Residual Disease (MRD) Testing in Newly Diagnosed Multiple myeloma (MM) Patients: A Prospective Head-to- Head Assessment of Cell-Based, Molecular, and Molecular-Imaging Modalities. *Blood*. 2014;124(21):2105.
 52. Kriegsmann K, Hundemer M, Hofmeister-Mielke N, Reichert P, Goldschmidt H, Huhn S et al. Comparison of NGS and MFC methods: key metrics in multiple myeloma MRD assessment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2322.
 53. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. Best practice & research. *Clinical haematology*. 2010;23(3):433–51.
 54. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Avet-Loiseau H et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):328-46.
 55. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Therneau TM, Greipp PR et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*. 2003;78(1):21-33.
 56. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3-9.
 57. Ladetto M, Donovan J.W, Harig S, Trojan A, Anderson K.C, Gribben J.G et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2000;6(3):2441-253.
 58. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Boccadoro M, Palumbo A et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2077-84.

59. Ladetto M, Bruggeman M, Monitillo L, Ferrero S, Faham M, Pott C et al. Next generation sequencing and real time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014;28(6):1299-307.
60. Lahuerta J-J, Paiva B, Vidriales M-B, Cordón L, Cedena M-T, Puig N, et al. Depth of response in multiple myeloma: a pooled analysis of three PETHEMA/GEM Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2017;35:2900–10.
61. Landgren O, Rustad EH. Meeting report: advances in minimal residual disease testing in multiple myeloma 2018. *Adv Cell Gene Ther*. 2019;2(1):26.
62. Landgren O, Hultcrantz M, Lesokhin AM et al. Weekly carfilzomib, lenalidomide, dexamethasone and daratumumab (wKRd-D) combination therapy provides unprecedented MRD negativity rates in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical and correlative phase 2 study. *Blood*. 2019;134(1):862.
63. Lapalus E, Chevaller A. Diagnostic biologique d'une immunoglobuline monoclonale. *Rev Fr Lab*. 2000;327:67–74.
64. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;121(4):482-88.
65. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, Carlton V, Zheng J, Miklos DB et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(8):1659–65.
66. Lomas OC, Tahri, Ghobrial IM. The microenvironment in myeloma. *Curr. Opin. Oncol*. 2019.
67. Maclachlan KH, Came N, Diamond B, Roshal M, Landgren O, Harrison S et al.. Minimal residual disease in multiple myeloma: defining the role of next generation sequencing and flow cytometry in routine diagnostic use. *Pathology*. 2021;53(3):385-99.
68. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M, Landgren O. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nature Reviews: Clinical Oncology*. 2015;12(5):286-95.
69. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tajeja N, Landgren O, Stetler-Stevenson M et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *J Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1416-1424.
70. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial MI. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2017;14(2).
71. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R, Puig N, Garcia-Sanz R et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(20):3073–79.
72. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutierrez N et al. 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*. 2008;26(16):2737-44.
73. Medina A, Puig N, Flores-Montero J, Jimenez C, Gonzalez M, Garcia-Sanz R et al. Comparison of next-generation sequencing (NGS) and next-generation flow (NGF) for minimal residual disease (MRD) assessment in multiple myeloma. *Blood Cancer*. 2020;10(10):108.

74. Monzani Q., Felter A., Quelle imagerie au cours du myélome multiple ? *La Lettre du Rhumatologue*. 2010;360(1):1-5.
75. Moreaux J. Anticorps anti-CD38 dans le myélome multiple. Anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Med Sci (Paris)* . 2019;35(12):1001–4.
76. Moreau P, Robillard N, Jego G, Pellat C, Le Gouill S, Thoumi S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Bataille R. Lack of CD27 in myeloma delimitates different presentation and outcome. *British Journal of Haematology*. 2005;132(2):168-70.
77. Moreau P, San Miguel JF, Hudwig H, Schouten H, Mohty M, Dimopoulos M, Dreyling M and on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Multiple Myeloma : ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Ann Oncol*. 2013;34(6):133-7.
78. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394:29–38.
79. Moreau P et al. Teclistamab, a BCMAxCD3 antibody, in triple class exposed multiple myeloma. *N Eng J Med*. 2022.
80. Morlon L. Intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiple. University de Lorraine : Sciences pharmaceutiques. 2010.
81. Munoz P, Mittelbrunn M, de la Fuente H, Perez-Martinez, Sanchez-Madrid F, Sancho J et al. Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. *Blood*. 2008;111(7):3653–64.
82. Munshi NC, Avet-L'Oiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Georgieva A, Anderson KC et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(1):28–35.
83. Munshi NC, Berdeja JG, Lin Y, Kochenderfer JM, Petrocca F, Siegel D et al. Early MRD negativity to predict deepening myeloma response in relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM) patients treated with BB 2121 anti-BCMA CAR T cells. *J Clin Oncol*. 2018;36(15):8024.
84. Munshi NC, Anderson LD Jr, Shah N, Madduri D, Hege K, San Miguel J et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2021;384(8):705-16.
85. Myélome multiple, Guide ALD n° 30, INCa/HAS, décembre 2010. Guide ALD INCa/HAS 2010.
86. Oberle A, Brandt A, Alawi M, Langebrake, Bokemeyer C, Binder M et al. Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection. *Haematologica*. 2017;102(9):368-70.
87. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1655–1665.
88. Oliva S, Genuardi E, Belotti A, Frascione PMM, Zambello R, Auclair D et al. Minimal Residual Disease Evaluation By Multiparameter Flow Cytometry and Next Generation Sequencing in the Forte Trial for Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15):8533-8533.
89. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, San Miguel JF, Orfao A et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for

- multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017–23.
90. Paiva B, Puig N, Cedena MT, Rosinol L, Cordon L, Vidriales MB, et al. Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2019;38:784–92.
 91. Palaiologou M, Delladetsima I, Tiniakos D. CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol*. 2014;29(2):177-89.
 92. Palumbo A, Anderson, K. Multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364(11):1046– 60.
 93. Palumbo A, Avet-L’Oiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Rajkumar SV, Moreau P. Revised International Staging System for multiple Myeloma : A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015 ;33(26) :2863-9.
 94. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Spencer A, Sonneveld P et al: Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-66.
 95. Patel BG, Luo S, Wildes TM, Sanfilippo KM. Frailty in Older Adults With Multiple Myeloma: A Study of US Veterans. *JCO Clin. Cancer Inform*. 2020;4:117-27.
 96. Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*. 1994;84(8):2597-603.
 97. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Avet-L’Oiseau H, Munshi N et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(23):2456-64.
 98. Perrot A et al. Score cytogénétique LP Linear Predictor. *JCO* 2019.
 99. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Perez JJ, Orfao A et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):91-100.
 100. Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, Soiffer R, Ritz J, Gribben JG et al. Eradication of PCR detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;88(6):2228-35.
 101. Puig N, Sarasquete ME, Alcoceba M, Banlantzategui A, San Miguel JF, Garcia-Sanz R et al. Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by RT-PCR in patients with multiple myeloma. *European Journal of Haematology*. 2012;89(4):328-35.
 102. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martinez J, San Miguel JF, Garcia-Sanz R et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*. 2014;28(2):391–7.
 103. Quentin S, Fillatreau S. Les plasmocytes régulateurs naturels : identification et rôle en physiopathologie. *Med Sci (Paris)*. 2019;35(4):305-7.
 104. Rasmussen T, Poulsen TS, Honore L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Experimental Haematology*. 2000;28(9):1039-45.
 105. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M., Munshi NC., San Miguel J., on behalf of the International Myeloma Workshop Consensus. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117(18):4691–95.

106. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;36:418-23.
107. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Child JA, Morgan GJ et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002;100(9):3095–100.
108. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Morgan GJ, Owen RG et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol*. 2013;31(20):2540–7.
109. Robiou du Pont S and al. Genomics of Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol*. 2017;35(9)963-7.
110. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*. 2009;23(3):435-41.
111. Roshal M. Minimal residual disease detection by flow cytometry in multiple myeloma: why and how? *Semin Hematol*. 2018;55(1):4-12.
112. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, Benboubker L, Avet-Loiseau H, Attal M et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2712–2717.
113. Rustad EH, Misund K, Bernard E, Coward E, Arcila ME, Landgren O et al. Stability and uniqueness of clonal immunoglobulin CDR3 sequences for MRD tracking in multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2019;94(12):1364-73.
114. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *European Journal of Cancer*. 2006;42(11):1510-19.
115. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Gonzalez M, San Miguel J et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative PCR and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90(10):1365-72.
116. Scott SD, Fletcher N, Whitehouse H et al. Assessment of plasma cell myeloma minimal residual disease testing by flow cytometry in an international inter-laboratory study: is it ready for primetime use? *Cytometry Clin Cytom*. 2019;96(3):201-8.
117. Silvennoinen R, Lundan T, Kairisto V, Pelliniemi TT, Selander T, Remes K et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2014;4(10):250.
118. Soh KT, Tario JD Jr, Wallace PK. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med*. 2017;37(4):821–53.
119. Soh KT, Wallace PK. Monitoring of Measurable Residual Disease in Multiple Myeloma by Multiparametric Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2019;90(1):63.
120. Soh KT, Tario JD, Hahn T, Hillengass J, McCarthy PL, Wallace PK. CD319 (SLAMF7) an alternative marker for detecting plasma cells in the presence of daratumumab or elotuzumab. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(4):497-508.

121. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC.
122. Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Rème T, Goldschmidt H, Klein B et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor: IGF-1 is the major growth factor on myeloma. *Blood*. 2009;113:4614-26.
123. The International Myeloma Working Group (IMWG). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*. 2003;121(5):749-57.
124. Torlakovic EE, Brynes RK, Hyjek E, Lee SH, Kreipe H, Kremer M, et al. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. *Int J Lab Hematol*. 2015;37:431-49.
125. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Hematologic Malignancies: Regulatory Considerations for Use of Minimal Residual Disease in Development of Drug and Biological Products for Treatment. Guidance for Industry. Silver Spring: FDA (2020).
126. Valade S, Lemiale V, Mariotte E. Hyperviscosity Syndrome: an Update for Intensivists. *Méd. Intensive Réa*. 2018;27(4):317-23.
127. Van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Van der Schoot CE, Van Dongen JJ and al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-11.
128. Vergnolle I, Rieu JB, Avet-Loiseau H, Corre J, Vergez F. Immunophénotypage du myélome multiple : validation de la méthode. *Ann Biol Clin*. 2019;77(2):197-217.
129. Verhagen OJ, Willemsse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Van Fongen JJ, Van Der Schoot CE et al. Application of germiline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14(8):1426-35.
130. Voena C, Ladetto M, Astolfi M, Provan D, Gribben JG, Boccadoro M et al. A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia*. 1997;11(10):1793-8.
131. Wuilleme S, Robillard N, Lode L, Magrangeas F, Harousseau JL, Minvielle S, Avet-Loiseau H et al, for the Intergroupe Francophone du Myélome. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19(2):275-8.

RESUME en français

Introduction : La maladie résiduelle minimale ou mesurable (MRD) joue aujourd'hui un rôle majeur dans le suivi du myélome multiple. Elle permet d'évaluer la réponse aux traitements et d'adapter les thérapies au besoin pour anticiper la rechute. L'intérêt de cette thèse est de comparer, à partir d'un même prélèvement médullaire de départ, les deux méthodes de séquençage nouvelle génération (next generation sequencing, NGS) et de cytométrie de flux (CMF) dans la détection et l'évaluation de la MRD chez les patients atteints de myélome multiple.

Matériel et méthode : Sur un an de recueil, 31 échantillons médullaires ont été prélevés au centre hospitalier universitaire de Toulouse et dans des centres hospitaliers extérieurs. Conformément aux recommandations de l'International Myeloma Working Group (IMWG), un cut-off de 10^{-5} a été choisi pour comparer les deux méthodes. L'impact du délai de transport a été évalué à partir d'une cinétique en trois points pour la CMF (à T0, T24 et T48), en deux points pour la NGS.

Résultats : Les résultats montrent la concordance entre les deux méthodes : 68% de cas concordants à T0 et 82% à T48. D'une technique à l'autre, des discordances ont été mises en évidence à T0 : 32% de la cohorte soit près d'un tiers.

Concernant l'évaluation de la cinétique, les deux méthodes présentent une grande stabilité dans le temps. A propos de la CMF, passé T0, 10% des patients ont une MRD indétectable. Ils ne correspondent à aucun profil clinique type.

Discussion : L'utilisation d'un seuil à 10^{-5} pour établir le statut MRD ne définit pas exactement les mêmes patients selon la méthode utilisée. A T0, dans presque un tiers des cas de patients, les résultats semblent différer et pourraient impliquer une prise en charge thérapeutique différente. Cela confirmerait que la prise en charge de la MRD par CMF doit être rapide, probablement liée à la fragilité des plasmocytes ex vivo chez certains patients.

Conclusion : Le choix entre les deux méthodes, CMF et NGS, dépend finalement de questions de faisabilité et de logistique car elles sont hautement concordantes. Cependant, au vu des discordances observées, il est indispensable de considérer deux seuils de détection différents en fonction de l'une ou l'autre technique au risque d'impacter la décision thérapeutique.

Titre et résumé en Anglais : [Comparison of two methods NGS and FCM to evaluate MRD in patients with multiple myeloma](#)

Introduction: Today, minimal (or measurable) residual disease (MRD) plays a major role in multiple myeloma follow-up. MRD evaluates the treatments response and allows to adapt therapies to anticipate relapse. This thesis compares two methods from the same initial bone marrow sample : next generation sequencing (NGS) and flow cytometry (FCM) in the detection and evaluation of MRD in patients with multiple myeloma.

Material and method: Over a one-year period, 31 marrow samples were collected from the University Hospital of Toulouse and from external hospitals. In accordance with the recommendations of the International Myeloma Working Group (IMWG), a cut-off of 10^{-5} was chosen to compare the two methods. The impact of transport time was evaluated using three-point kinetics for FCM (at T0, T24 and T48), and two-point kinetics for NGS.

Results: The results show the concordance between the two methods: 68% of concordant cases at T0 and 82% at T48. Discordance between the two techniques was found at T0: 32% of the cohort, i.e. nearly one third. Concerning the kinetics, both methods showed a high stability over time. Regarding FCM, after T0, 10% of the patients had an undetectable MRD. They do not correspond to any clinical profile.

Discussion: The use of a 10^{-5} threshold to establish MRD status does not exactly define the same patients depending on the method used. At T0, in almost one third of patients, the results seem to differ and could imply a different therapeutic decision. This would confirm that evaluating MRD by FCM should be settled in a very short time, probably related to the fragility of ex vivo plasma cells in some patients.

Conclusion: The choice between the two methods, FCM and NGS, ultimately depends on issues of feasibility and logistics as they are highly concordant. However, discrepancies were observed: it is essential to consider two different detection thresholds depending on the method used because of the latent risk of impacting the therapeutic decision.