



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Intérêt et applications cliniques du séquençage de l'ADN circulant dans le
Myélome Multiple**

Présentée et soutenue publiquement le 24/3/2017 à 18h00
au Pôle Recherche
Par Salomon Manier

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Thierry Facon

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Quesnel Bruno

Monsieur le Professeur Franck Morschhauser

Madame le Docteur Valérie Coiteux

Monsieur le Docteur Louis Terriou

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Xavier Leleu

Travail du Laboratoire du Dr Irene Ghobrial

Avertissement

« La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs. »

Abréviations

ADN : acide désoxyribo-nucléique

CNA : copy number abnormality

GWAS : genome-wide association studies

HRD : hyperdiploïdie

Ig : immunoglobuline

ISS : international staging system

IMiDs : immunomodulatory drugs

IMWG : International Myeloma Work Group

MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance

MM : myélome multiple

MRD : minimal residual disease

RC : rémission complète

RP : réponse partielle

SMM : smoldering multiple myeloma

TBRP : très bonne réponse partielle

ULP-WGS : ultra low pass – whole genome sequencing

WES : whole exome sequencing

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| GENERALITES | 6 |
| I. Aspects cliniques du Myélome Multiple | 6 |
| Epidémiologie | 6 |
| Sémiologie du myélome multiple..... | 6 |
| Diagnostic positif | 11 |
| Pronostic..... | 13 |
| Prise en charge thérapeutique du MM | 17 |
| II. Complexité génomique dans le myélome multiple : hétérogénéité clonale et évolution clonale | 25 |
| Variants héréditaires..... | 26 |
| Translocations chromosomiques..... | 27 |
| Mutations somatiques nucléotidiques (SNVs)..... | 32 |
| Hétérogénéité clonale et évolution clonale..... | 35 |
| Application clinique de la génomique | 38 |
| III. L'ADN circulant | 39 |
| METHODES | 42 |
| RESULTATS | 45 |
| Séquençage de l'ADN circulant par Ultra Low Pass – Whole Genome Sequencing (ULP-WGS) | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Comparaison de l'ADN circulant avec l'ADN plasmocytaire par Whole Exome Sequencing (WES) | 47 |
| Evaluation de l'hétérogénéité clonale par WES..... | 51 |
| Evaluation de l'évolution clonale par séquençage ciblé..... | 54 |
| REFERENCES..... | 58 |

GENERALITES

I. Aspects cliniques du Myélome Multiple

Epidémiologie

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale de plasmocytes tumoraux envahissant la moelle osseuse hématopoïétique ². Il représente environ 10 % des cancers hématologiques, ce qui le situe au deuxième rang par ordre de fréquence après les lymphomes. En France, l'incidence annuelle est de 6 à 7/100 000 habitants, soit environ 3 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année ³. La survie médiane n'excède pas 5 à 7 ans, mais le pronostic varie selon les patients : certains décèdent en quelques mois, d'autres, au contraire, ont une survie se prolongeant au-delà de 10 ans ⁴. La médiane d'âge est de 72 ans, mais se réduit à 65 ans dans les séries hospitalières ⁵.

Sémiologie du myélome multiple

Les principales manifestations du myélome résultent de l'accumulation de plasmocytes tumoraux au niveau de la moelle osseuse, pouvant entraîner :

- la production et la sécrétion d'une protéine monoclonale dans le sang et/ou les urines;
- des lésions osseuses;
- une insuffisance médullaire avec anémie et/ou leucopénie et thrombopénie;

- une immunodépression avec inhibition de la production des immunoglobulines normales et sensibilité accrue aux infections

Certains patients n'ont aucune symptomatologie clinique au moment du diagnostic et la maladie est alors découverte de manière fortuite, à l'occasion, par exemple, de la détection d'un pic sur une électrophorèse des protéines sériques pratiquée lors du bilan d'une autre pathologie.

L'altération de l'état général représente un des signes les plus fréquents au diagnostic.

Les cytopénies sont avant tout marquées par un syndrome anémique. Il s'agit d'une anémie normochrome normocytaire arégénérative. Les causes en sont multiples, parmi lesquelles la prolifération plasmocytaire médullaire, une suppression de l'érythropoïèse induite par les cytokines, un phénomène d'hémodilution lié à l'hyperprotidémie et la diminution de sécrétion d'érythropoïétine (EPO) en cas d'insuffisance rénale. L'expression à la surface des cellules myélomateuses des récepteurs Fas-ligand et TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) intervient dans l'apoptose des progéniteurs érythroïdes. Il existe aussi, à un degré moindre, des thrombopénies et des neutropénies.

L'atteinte osseuse est liée à l'infiltration plasmocytaire qui s'accompagne d'une résorption ostéoclastique et d'une inhibition de la reconstruction osseuse par les ostéoblastes. Les douleurs osseuses sont présentes chez 70 % des patients au diagnostic et intéressent surtout le squelette axial. Les douleurs osseuses nécessitent souvent le recours aux antalgiques de palier III, et retentissent sur les capacités fonctionnelles des patients. L'atteinte osseuse peut se compliquer de fractures

pathologiques, compressions neurologiques, médullaires, radiculaires ou tronculaires, secondaires à un tassement vertébral, une épidurite ou un plasmocytome. L'IRM en urgence est nécessaire dans ces indications.

L'insuffisance rénale est présente chez environ 50% des patients au diagnostic. Le recours à l'hémodialyse est requis dans 5 à 10% des cas. La cause la plus fréquente reste la tubulopathie myélomateuse (environ 75% des atteintes rénales). Elle est caractérisée par la précipitation de cylindres, formés de chaînes légères d'immunoglobulines et de protéines de Tamm-Horsfall, dans les tubules distaux. L'atteinte pré-rénale est aussi fréquente et liée notamment à une hypercalcémie. Les atteintes glomérulaires sont plus rares et souvent liées à une complication du myélome comme le développement d'une Amylose AL ou d'une cryoglobulinémie. Les atteintes rénales des gammopathies monoclonales sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Atteinte rénale dans les gammopathies monoclonales.

| | |
|---|---|
| Pré-rénale (insuffisance rénale fonctionnelle) | <ul style="list-style-type: none"> - Par déshydratation extra cellulaire dans un contexte : <ul style="list-style-type: none"> - d'hypercalcémie - de pertes digestives (vomissements) |
| Rénale | <p style="text-align: center;">Tubulaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tubulopathie myélomateuse (tubes distaux) - Nécrose tubulaire aiguë (notamment après utilisation de produits de contraste iodés) - Syndrome de Fanconi : traduction clinique d'une atteinte tubulaire proximale (tubulopathie « microcristalline » proximale) |

| | | |
|--|---------------------|---|
| | Glomérulaire | <ul style="list-style-type: none"> - Amylose AL - Maladie à dépôts monotypiques (de chaînes légères et/ou de chaînes lourdes) non organisés = syndrome de Randall - Dépôts organisés non amyloïdes : ces dépôts glomérulaires ont une organisation microtubulaire (glomérulonéphrite immunotactôïde) - Atteintes glomérulaires au décours des cryoglobulinémies (de type I ou II) |
|--|---------------------|---|

L'hypercalcémie est retrouvée dans près de 20% des cas au diagnostic. Elle représente une urgence thérapeutique et se complique souvent d'insuffisance rénale aiguë. Plusieurs mécanismes en expliquent la survenue. L'activation ostéoclastique par les plasmocytes tumoraux induite localement par les cellules myélomateuses, provoquant une lyse osseuse. A moindre mesure, la baisse du débit de filtration glomérulaire et l'augmentation de la résorption tubulaire du calcium ainsi que la diminution de l'activité ostéoblastique participent aussi à la survenue d'une hypercalcémie.

Un syndrome infectieux peut être présent au diagnostic - dans environ 10% des cas. Le MM induit un déficit de l'immunité humorale en lien avec une hypogammaglobulinémie, dont la conséquence est l'augmentation du risque d'infections à germes encapsulés, telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. Les infections sont aussi favorisées par les différents traitements du MM, dont la Dexaméthasone et demeurent la première cause de décès chez les patients atteints de myélome, en cause dans 20% à 50% des cas. Les vaccinations anti-

pneumococcique et anti-haemophilus peuvent être recommandées car elles diminuent significativement l'incidence des événements infectieux. Dans les cas d'hypogammaglobulinémie profonde, certains recommandent une antibioprophylaxie par Oracilline orale ou une supplémentation par immunoglobulines polyvalentes après un premier épisode infectieux.

Le risque thrombo-embolique est élevé chez les patients atteints de MM et ce en raison de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de la présence d'un composant monoclonal élevé, de l'âge souvent avancé des patients, d'une mobilité réduite liée aux complications osseuses et neurologiques, voire de la présence d'un syndrome néphrotique chez certains patients. Une cause majeure de maladie thrombo-embolique veineuse ou artérielle dans le myélome reste l'utilisation de chimiothérapies telles que les anthracyclines, de la dexaméthasone à hautes doses et des IMiDs (thalidomide et lénalinomide). Une prévention du risque thrombo-embolique, par aspirine ou héparine de bas poids moléculaire selon le risque estimé de thrombose, est nécessaire en cas d'utilisation de ces agents thérapeutiques ⁶.

Le syndrome d'hyperviscosité est peu fréquent dans le MM à l'inverse de la maladie de Waldenström. Ceci s'explique par le fait que l'IgG (monomérique) et l'IgA (dimérique) ont un poids moléculaire plus faible que l'IgM (pentamérique). Un syndrome d'hyperviscosité peut s'observer lorsque le taux du composant monoclonal sérique (IgA ou IgG) est très élevé. Ses signes cliniques sont marqués par un syndrome confusionnel, des céphalées, des vertiges, voire des convulsions ou un coma. En cas de suspicion clinique, le diagnostic est facilement confirmé par la réalisation en urgence d'un fond d'œil, retrouvant des lésions telles que dilatations veineuses, hémorragie

rétinienne, micro-anévrysmes, exsudats et œdème papillaire. Un traitement par plasmaphérèse en urgence est indiqué en complément de la mise en place d'un traitement spécifique du MM.

Les atteintes neurologiques survenant dans le MM sont souvent liées à une atteinte médullaire par compression secondaire à une fracture vertébrale ou à une épidurite tumorale. Des localisations plasmocytaires de la voûte crânienne compliquées de syndrome de masse peuvent aussi se voir. L'IRM médullaire constitue l'examen de choix pour confirmer le diagnostic, établir l'étiologie et aider à la décision thérapeutique (radiothérapie ou neurochirurgie). Les atteintes périphériques à type de polyneuropathies sensitives sont fréquentes et invalidantes ⁷. Elles peuvent être iatrogènes, induites par le thalidomide ou le bortezomib et imposent des réductions de doses, voire l'arrêt du traitement incriminé. D'autres causes de neuropathies périphériques sont notamment liées à une amylose AL, une activité cryoglobulinémique ou anticorps anti-MAG de l'immunoglobuline monoclonale.

Diagnostic positif

Le diagnostic de MM repose sur la présence d'une plasmocytose médullaire > 10%, à la différence de la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS). Les critères diagnostiques distinguent les MM symptomatiques (présence d'au moins un des critères CRAB ou d'une plasmocytose >60% ou d'un rapport de chaînes légères libres sériques > 100) des MM asymptomatiques (smoldering MM - SMM) ⁸.

Tableau 2. Critères diagnostiques différenciant le MM symptomatique, le SMM et la MGUS.

| | |
|---|---|
| <p>Myélome multiple symptomatique</p> | <p>Plasmocytose médullaire $\geq 10\%$,</p> <p>ET présence d'au moins un critère CRAB.</p> <p>ET/OU un des critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plasmocytose médullaire $\geq 60\%$ - Rapport chaîne légère libre affectée/non affectée > 100 - Plus d'une lésion osseuse focale à l'IRM |
| <p>Myélome multiple asymptomatique</p> | <p>Prolifération plasmocytaire $\geq 10\%$ et $< 60\%$</p> <p>ET/OU Présence d'une protéine sérique monoclonale (IgG ou IgA) $\geq 30\text{ g/l}$</p> <p>ET/OU protéinurie de Bence Jonce $\geq 500\text{mg}/24\text{h}$</p> <p>ET absence de critère CRAB ou de signe d'amylose</p> |
| <p>MGUS</p> | <p>Plasmocytose médullaire $< 10\%$</p> <p>ET protéine monoclonale $< 30\text{ g/l}$</p> <p>ET absence de critères CRAB</p> |

Les critères CRAB définissent les atteintes organiques dues à la maladie.⁹

- C pour hyperCalcémie $> 0.25\text{ mmol/L}$ au-dessus de la limite supérieure ou $> 2.75\text{mmol/L}$;

- R pour insuffisance **R**énale avec créatininémie > 177 µmol/l ou > 20 mg/l) ou clairance de la créatinine < 40mL/min ;
- A pour **A**némie avec un taux d'hémoglobine < 10 g/dl ou plus de 2 g/dl en dessous de la limite inférieure de la normale;
- B pour lésions osseuses (**B**one lesions) caractérisées par une ou plusieurs lésions osseuses par radiographie, scanner ou TEP-scanner.

Pronostic

Selon ce consensus de l'International Myeloma Work Group ^{9,10}, l'évaluation pronostique du MM doit comporter la β 2m et le taux d'albuminémie pour définir l'International Staging System (ISS), (Tableau 3) et une analyse cytogénétique des plasmocytes par FISH à la recherche de translocation (4 ;14), délétion 17p et gain de 1q. Les autres marqueurs sont de l'ordre de la recherche. Le consensus précise que les critères ne sont évaluable qu'en cas de myélome symptomatique, et qu'ils ne doivent pas être pris en compte chez les patients atteints d'un myélome asymptomatique. La combinaison de ces marqueurs pronostiques permet de stratifier les patients en 3 groupes (Tableau 4).

Tableau 3. Définition des stades de l'ISS et impact sur la survie ⁵.

| Stade | Définition | Survie médiane |
|-------|--|----------------|
| I | β 2m < 3,5 mg/l et Albumine \geq 35 g/l | 62 mois |

| | | |
|-----|--------------------------|---------|
| II | Ni stade I, ni stade III | 44 mois |
| III | $\beta 2m \geq 5,5$ mg/l | 29 mois |

La $\beta 2$ microglobuline est exprimée à la surface des plasmocytes malins au cours du myélome. Elle est relarguée dans le sérum par clivage protéolytique puis éliminée par voie essentiellement rénale ¹¹. Son taux sérique reflète la masse tumorale (plus la masse tumorale est importante, plus le taux de $\beta 2m$ sera élevé), mais il est influencé par l'existence d'une insuffisance rénale (à masse tumorale égale, le taux sérique de $\beta 2m$ sera plus élevé chez un patient présentant une insuffisance rénale que chez un patient ayant une fonction rénale normale).

L'analyse cytogénétique est effectuée par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridation) ou SNP array (Single-Nucleotide Polymorphism). En effet, les plasmocytes sont des cellules en différenciation très avancée, dont l'index de prolifération est faible. Il est donc difficile de générer des métaphases au sein d'un clone plasmocytaire myélomateux pour réaliser un caryotype conventionnel. Ainsi des techniques alternent ont du être développées comme le FISH et le SNP array afin de détecter les translocations et les anomalies du nombre de copies récurrentes dans le MM. Les anomalies chromosomiques qui ont montré un impact pronostique défavorable sur la survie sans événements (SSE) et la survie globale (SG) au cours du myélome sont la délétion (17p) (si présente dans plus de 60% des plasmocytes), la translocation t(4;14) et le gain de 1q. Selon les recommandations de l'IMWG, c'est au minimum sur ces trois anomalies que doit porter l'analyse cytogénétique du myélome réalisée en FISH au moment du diagnostic initial.

Tableau 4. Stratification du risque pronostique en combinant ISS et cytogénétique ¹⁰.

| | Haut risque | Risque intermédiaire | Faible risque |
|-------------------|---------------------------------|----------------------|---|
| Paramètre | ISS II/III et t(4;14) ou del17p | autre | ISS I/II et absence de t(4;14), del17p ou gain 1q21 et age < 55 years |
| Médiane de survie | 2 ans | 7 ans | > 10 ans |
| % de patients | 20% | 60% | 20% |

Bilan recommandé par l'IMWG au diagnostic d'un myélome multiple ⁸ :

Évaluation de la plasmocytose médullaire pour confirmation du diagnostic :

- Myélogramme
- Biopsie médullaire en cas d'échec

Évaluation du composant monoclonal pour confirmation du diagnostic :

- Électrophorèse des protéines sériques : mise en évidence du pic d'allure monoclonale et quantification du pic. La technique d'intégration du pic permet une mesure séparée du pic monoclonal et du taux résiduel des gammaglobulines, mais est moins précise si le composant monoclonal est minime ou migre dans la zone des bêtaglobulines.

- Immunofixation des protéines sériques : confirmation du caractère monoclonal et caractérisation de l'isotype de l'immunoglobuline (anti-sérum pentavalent : G, A, M, κ , λ)
- Les chaînes légères libres sériques : le dosage des chaînes légères libres sériques (κ et λ), par néphélométrie, sont nécessaires au bilan initial d'un MM. Dans certains cas, seules les chaînes légères libres sériques sont détectables et permettent ainsi le suivi des patients. Le ratio de la chaîne légère altérée sur la chaîne légère normale est utilisé pour le suivi de la réponse au traitement et la stadification des patients.
- Protéinurie avec recherche de chaînes légères libres urinaires : électrophorèse et immunofixation des protéines à partir d'un recueil d'urine de 24 heures.

Évaluation des critères d'évolutivité pour confirmation du caractère symptomatique du myélome (CRAB et nouveaux critères) :

- Hémogramme avec frottis sanguin et évaluation du taux de réticulocytes.
- Calcémie : mesure de la calcémie corrigée en fonction de l'albuminémie.
- Créatininémie : mesure de la clairance de la créatinine par la formule MDRD.
- Bilan radiologique du squelette, comportant des clichés standards du crâne (face et profil), du rachis complet (face et profil), du bassin (face), du thorax (face et profil) et des grilles costaux, des fémurs et des humérus (droits et gauches).
- IRM du rachis et du bassin (sans et avec injection de gadolinium).
- Scanner sans injection de produit de contraste iodé si un bilan complémentaire est nécessaire sur une lésion osseuse.

- Le TEP-scanner est devenu un élément essentiel du bilan osseux initial.
- Le dosage des chaînes légères libres sériques : un rapport chaîne légère altérée sur la chaîne légère normale > 100 est un critère de traitement d'un MM.
- Myélogramme : un envahissement médullaire des plasmocytes tumoraux supérieur à 60% représente aussi un nouveau critère de traitement d'un MM, même en l'absence de critères CRAB.

Évaluation pronostique

- Albuminémie et β 2-microglobuline sérique pour déterminer le stade du score ISS.
- Analyse cytogénétique par FISH et/ou SNP array des plasmocytes tumoraux pour rechercher une t(4 ;14), une del(17p) et un gain 1q21.

Prise en charge thérapeutique du MM

Bien que le MM reste une maladie incurable, l'avènement des nouveaux agents thérapeutiques (inhibiteurs du protéasome, immunomodulateurs et anticorps-monoclonaux) depuis ces 10 dernières années ont significativement amélioré le pronostic des patients.

Myélome multiple asymptomatique

Pour l'heure, aucun traitement n'est recommandé pour les myélomes asymptomatiques et seule une surveillance est préconisée. Pour la surveillance des patients, les

recommandations en 2010 de l'IMWG préconisent de répéter le bilan 2 à 3 mois après le diagnostic puis tous les 4 à 6 mois pendant un an puis tous les 6 à 12 mois ¹². Cependant des essais cliniques ont montré le possible intérêt d'une intervention thérapeutique précoce pour les MM asymptomatiques ¹³, ce qui est encore à l'étude.

Myélome Multiple symptomatique

Deux groupes de patients sont distingués, ceux éligibles à un traitement intensif (moins de 65 ans, voire 70 ans pour certains et absence de comorbidité importante) de ceux non éligibles à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (de façon générale, les patients de plus de 65 à 70 ans et/ou présentant une comorbidité importante).

Chez les sujets éligibles à une intensification thérapeutique, le principe du traitement de première ligne repose sur la succession de phases d'induction, d'intensification, de consolidation et de maintenance. La phase d'induction est constituée par une combinaison d'une triplé thérapeutique associant un inhibiteur de protéasome, un immunomodulateur et de la dexaméthasone ¹. Quatre cycles sont habituellement réalisés, au cours desquels un recueil de cellules souches hématopoïétique est réalisé après mobilisation par endoxan. L'intensification thérapeutique est réalisée par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques après conditionnement par du melphalan à haute dose ^{14,15}. Un traitement de consolidation et de maintenance peut permettre d'améliorer la réponse et notamment la maladie résiduelle ¹⁶. Le traitement de consolidation comprend classiquement la combinaison utilisée dans la phase d'induction. Enfin, un traitement de maintenance est

administré pendant une période d'un an, souvent par un immunomodulateur. Le Lénalidomide a reçu l'AMM dans cette indication début Mars 2017. De nombreuses études ont montré une corrélation entre la qualité de la réponse au traitement et les taux de survie sans progression et survie globale dans le MM chez les sujets éligibles à un traitement intensif, d'où l'importance d'obtenir une réponse complète ¹⁷.

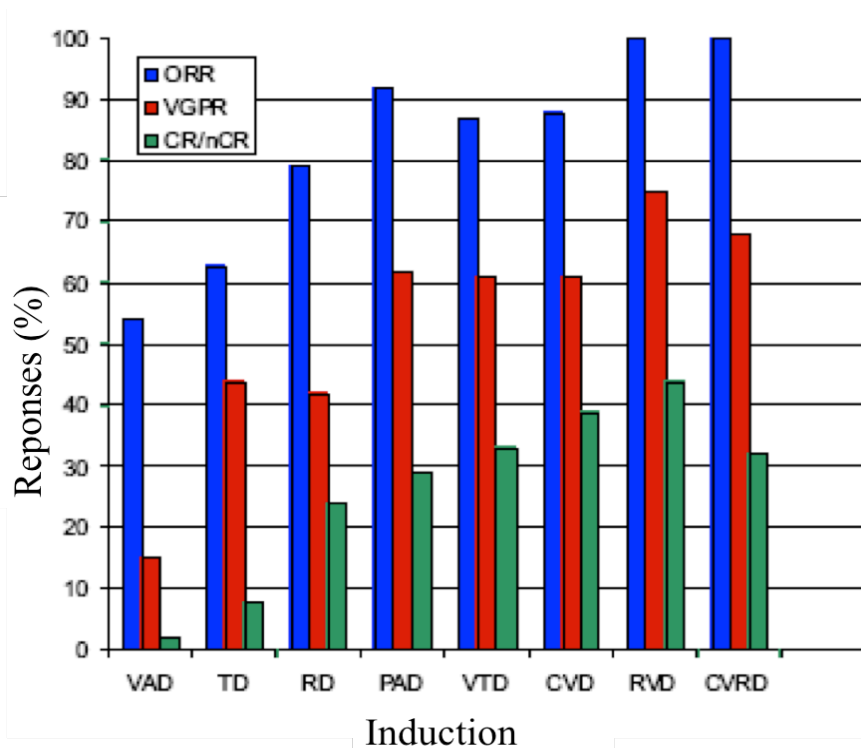


Figure 1. Taux de réponse en fonction du type de traitement d'induction (ORR = réponse globale, VGPR = très bonne réponse partielle et CR/nCR = réponse complète et réponse complète indéterminée). Adapté de Stewart et al. Blood 2009 ¹.

Traitement de première ligne des patients non éligibles à une intensification thérapeutique. Les patients âgés de plus de 65 ans représentent plus de 60% des nouveaux patients diagnostiqués avec un MM. L'intensification thérapeutique par autogreffe de cellules souches périphériques n'est pas accessible aux patients âgés en raison de morbidités associées trop importantes.

VMP (Bortezomib, Melphalan, Dexaméthasone) : la combinaison VMP s'est avérée supérieure au MP pour la survie sans progression, la survie globale, la survie sans traitement et les taux de RC dans l'essai international de phase 3 VISTA (Velcade as Initial Standard Therapy) ¹⁸.

RD (Revlimid et Dexaméthasone) : un récent essai de phase 3 a montré la supériorité d'une combinaison par RD pendant 18 mois ou jusqu'à la rechute en comparaison à un bras associant MPT (melphalan, prednisone, thalidomide) ¹⁹.

Perspectives

De nouvelles approches thérapeutiques sont à l'étude en première ligne ou à la rechute dans le MM. Il s'agit notamment d'immunothérapies et de thérapies ciblées. Concernant l'immunothérapie, deux anticorps monoclonaux, l'un anti-CD38 (daratumumab) ²⁰ et l'autre anti-SLAMF7 (elotuzumab) ²¹, ont été développés et on démontré une efficacité prometteuse. Ces anticorps monoclonaux ciblent des marqueurs de surface des plasmocytes (CD38 et SLAMF7) et induisent une réaction de type ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) permettant l'activation des cellules NK contre les cellules tumorales. Une nouvelle génération d'immunothérapies dans la prise en charge

des cancers est représentée par les inhibiteurs de checkpoint PD-1 et PD-L1. Ces approches sont actuellement à l'étude, ce qui permettra d'en définir la place dans l'arsenal thérapeutique du MM. D'autres thérapies ciblées tels que le Venetoclax (inhibiteur de Bcl-2) et S63845 (inhibiteur de Mcl-1) pourraient présenter un intérêt, notamment dans des sous-groupes moléculaires spécifiques de tumeurs. En effet, le Venetoclax semble avoir une efficacité notable dans les MM avec t(11;14) qui présentent un ratio Bcl-2/Bcl-X_L élevé et il sera intéressant d'étudier le nouvel inhibiteur de Mcl-1 dans les MM avec gain de 1q – siège du gène *MCL-1*. De plus, les nouvelles générations d'inhibiteurs du protéasome et d'immunomodulateurs pourront vraisemblablement améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de MM.

Evaluation de la réponse au traitement

L'évaluation de la réponse au traitement du myélome repose essentiellement sur le suivi du composant monoclonal. L'examen de la moelle osseuse est indiqué afin de définir la réponse complète stringente par cytométrie en flux et d'évaluer la maladie résiduelle (par technique de cytométrie en flux et de *next generation sequencing*). Le Tableau 5 reprend les recommandations de l'IMWG pour la caractérisation de la réponse et le Tableau 6 pour le statut des patients à la rechute.

Tableau 5. Critères de réponse au traitement de l'IMWG ⁹.

| Catégorie de réponse | Critère |
|------------------------------|--|
| Réponse complète | <ul style="list-style-type: none"> - Immunofixation sérique et urinaire négative - ET disparition des plasmocytomes des tissus mous - ET plasmocytose médullaire < 5 % - En cas de maladie uniquement mesurable par le taux de sFLC : ratio κ/λ normal (0,26-1,65) en complément des autres critères |
| Réponse complète stringente | <p>Réponse complète</p> <p>ET</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ratio κ/λ normal - Absence de cellules clonales dans la moelle osseuse en immunofluorescence (par cytométrie en flux) |
| Très bonne réponse partielle | <ul style="list-style-type: none"> - Protéine monoclonale détectable dans le sang et dans les urines en immunofixation mais pas à l'électrophorèse - OU réduction d'au moins 90 % de la protéine monoclonale sérique et protéine monoclonale urinaire < 100 mg/24 h - En cas de maladie uniquement mesurable par le taux sérique de sFLC : réduction de plus de 90 % de la différence entre la chaîne légère libre clonale et la chaîne légère libre non clonale (dCLL) |
| Réponse partielle | <ul style="list-style-type: none"> - Réduction d'au moins 50 % de la protéine monoclonale sérique et protéine urinaire réduite d'au moins 90 % ou < 200 mg/24 h - Si la protéine monoclonale n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines : réduction d'au moins 50 % de la différence entre le taux de la CLL monoclonale et celui de |

| | |
|---------------------|---|
| | <p>la CLL non monoclonale (dCLL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si la protéine monoclonale n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines et si les CLL ne sont pas non plus mesurables : diminution d'au moins 50 % de la plasmocytose médullaire (à condition d'un pourcentage initial de plasmocytes \geq 30 %) |
| Maladie stable | Absence des critères de réponse partielle et de maladie progressive |
| Maladie progressive | <p>Augmentation de 25 % par rapport à la valeur la plus basse d'un ou de plusieurs des marqueurs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - composant monoclonal sérique (en valeur absolue, l'augmentation doit être d'au moins 5 g/l) ; - composant monoclonal urinaire (en valeur absolue, l'augmentation doit être d'au moins 200 mg par 24 h) ; - chez les patients dont la protéine monoclonale n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines (et uniquement chez ces patients) : différence entre la concentration de la chaîne légère libre sérique monoclonale et de la chaîne légère libre sérique non monoclonale (en valeur absolue, l'augmentation doit être supérieure à 100 mg/l) ; - plasmocytose médullaire (en valeur absolue, le pourcentage doit être d'au moins 10 %). <p>Apparition de lésions osseuses ou de plasmocytomes des tissus mous ou augmentation de taille des lésions osseuses ou des plasmocytomes existants.</p> <p>Apparition d'une hypercalcémie (calcémie sérique corrigée > 115 mg/l) liée au myélome</p> |

Tableau 6. Recommandation de l'IMWG concernant la définition des statuts cliniques de progression ⁹.

| Statut de la maladie | | Définition |
|----------------------|----------------------|--|
| Rechute | | Nouvelle progression chez un patient qui était sans traitement depuis plus de 60 jours. |
| Réfractaire | Réfractaire primaire | Patient n'ayant jamais obtenu de réponse, même minime, au cours d'un traitement. |
| | Rechute réfractaire | Patient ayant obtenu une réponse au moins minime et qui présente une progression secondaire sous traitement. |

II. Complexité génomique dans le myélome multiple : hétérogénéité clonale et évolution clonale

Le myélome multiple est une maladie génétiquement complexe et hétérogène résultant d'événements génomiques multiples menant au développement et à la progression de la tumeur. Une des spécificités du MM réside dans le continuum qui existe entre les stades précurseurs, MGUS et SMM et le MM symptomatique. Théoriquement, tout MM est précédé d'une MGUS et d'un SMM. Ce modèle clinique de progression de la maladie entre MGUS, SMM et MM offre un cadre unique pour comprendre la séquence de survenue des anomalies génomiques et donc l'évolution clonale sous-jacente au MM.

Schématiquement, on distingue les anomalies génomiques primaires – survenant dès le stade de MGUS et intervenant dans l'oncogenèse de la maladie – et les événements secondaires survenant plus tardivement et responsables de la progression de la maladie. Les événements primaires sont habituellement divisés en sous-types hyperdiploïdes (HRD) et nonhyperdiploïdes. Les tumeurs HRD sont caractérisées par une trisomie des chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et / ou 21. Les tumeurs non-HRD comportent des translocations impliquant le locus IGH, principalement t(4; 14), t(6; 14), t(11; 14), t(14; 16) et t(14; 20). Les événements secondaires correspondent à des anomalies du nombre de copies (CNA), des translocations de *MYC* et des mutations somatiques dans les voies de MAPKinase, NF-kB et de réparation l'ADN.

Variants héréditaires

L'information génétique germinale participe à la probabilité de développer un cancer, avec des degrés divers entre les types de cancer. Dans le cas du MM, les enfants des individus atteints de MM présentent un risque deux à quatre fois plus élevé de développer eux-mêmes un MM ²². De récentes études dites *genome-wide association studies* (GWAS) portant sur 4 600 individus atteints de MM et 10 990 sujets témoins ^{23,24} ont permis de montrer une corrélation entre certains polymorphismes et le risque de survenue d'un MM. En particulier, sept locus représentent environ 13% du risque familial de développer un MM 3p22.1 (rs1052501, dans ULK4), 7p15.3 (rs4487645, entouré par ADNH11 et CDCA7L), 2p23.3 (rs6746082, entouré par DNMT3A et DTNB) 11, 3q26.2 (rs10936599, entouré par MYNN et TERC), 6p21,33 (rs2285803 dans PSORS1C2), 17p11.2 (rs4273077 dans TNFRSF13B) et 22q13.1 (rs877529 dans CBX7) 12 (Tableau 7). Le rôle fonctionnel complet de ces gènes candidats reste à élucider.

| Variant and risk allele involved | Chromosomal location | Genes involved | OR (range) | Associated risk |
|----------------------------------|----------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|
| rs4487645C ¹¹⁻¹³ | 7p15.3 | Surrounded by <i>DNAH11</i> and <i>CDCA7L</i> | 1.38 (95% CI 1.28–1.50) | Transition from MGUS to MM |
| rs1052501G ¹¹⁻¹³ | 3p22.1 | <i>ULK4</i> | 1.32 (95% CI 1.20–1.45) | Transition from MGUS to MM |
| rs6746082A ¹¹⁻¹³ | 2p23.3 | Surrounded by <i>DNMT3A</i> and <i>DTNB</i> | 1.29 (95% CI 1.17–1.42) | Transition from MGUS to MM |
| rs10936599G ¹¹⁻¹³ | 3q26.2 | Surrounded by <i>MYNN</i> and <i>TERC</i> | 1.26 (95% CI 1.18–1.33) | Transition from MGUS to MM |
| rs2285803A ¹¹⁻¹³ | 6p21.3 | <i>PSORS1C2</i> | 1.19 (95% CI 1.13–1.26) | Transition from MGUS to MM |
| rs4273077G ¹¹⁻¹³ | 17p11.2 | <i>TNFRSF13B</i> | 1.26 (95% CI 1.16–1.36) | Transition from MGUS to MM |
| rs877529A ¹¹⁻¹³ | 22q13.1 | <i>CBX7</i> | 1.23 (95% CI 1.17–1.29) | Transition from MGUS to MM |
| rs603965A ¹⁴ | 11q13.3 | <i>CCND1</i> | 1.82 (95% CI 1.52–2.19) | t(11;14) in MM |
| rs4407910 (REF. 15) | 8q24.12 | <i>OPG</i> | 1.38 (95% CI 1.24–1.54) | MM bone disease (osteolytic lesions) |
| rs56219066T ¹⁶ | 5q15 | <i>ELL2</i> | 1.23 (95% CI 1.14–1.33) | MM |
| rs72773978T ¹⁷ | 16p13.11 | <i>FOPNL</i> | 2.65 (95% CI 1.94–3.58) | MM prognosis |

Tableau 7. Listes des variants alléliques associés à un risque de survenue de MM.

(D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016)

Translocations chromosomiques

Les plasmocytes tumoraux partagent une caractéristique commune au développement des cellules lymphoïdes B: elles subissent une hypermutation somatique et une commutation isotypique qui servent de mécanisme physiologique à la maturation de l'immunoglobuline dans le centre germinatif ²⁵. Les deux procédés nécessitent l'activation de désaminases de cytidines (AID), agissant au niveau de motifs préférentiels – dits WRCY – majoritairement situés dans les locus des immunoglobulines. Une recombinaison aberrante peut se produire lors de ce mécanisme, ce qui entraîne des translocations chromosomiques qui constituent une des caractéristiques du MM (Figure 2).

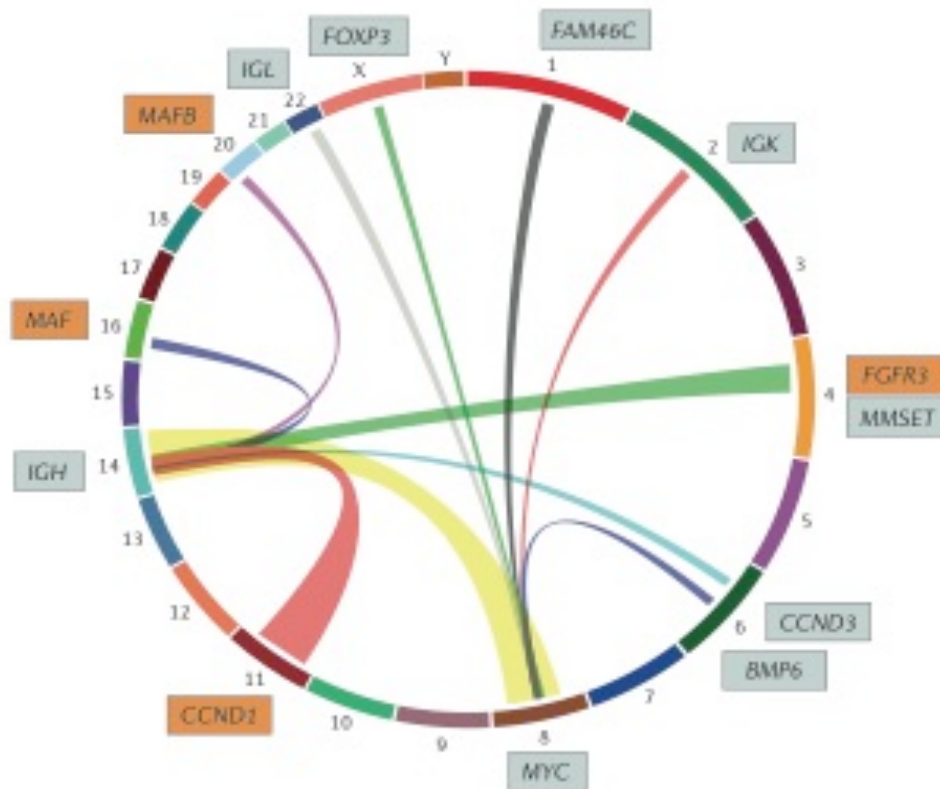


Figure 2. Principales translocations chromosomiques impliquées dans le MM. (D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

La majorité des translocations chromosomiques implique le chromosome 14, en particulier le locus IGH en 14q32.33, qui est l'un des gènes les plus fortement exprimés dans les cellules plasmocytaires. Les gènes partenaires sont alors sous contrôle du promoteur de l'IGH. Les cinq principaux partenaires chromosomiques - t(4; 14), t(6; 14), t(11; 14), t(14; 16) et t(14; 20) – induisent une surexpression d'oncogènes spécifiques - *MMSET* et *FGFR3*, *CCND3*, *CCND1*, *MAF* et *MAFB*, respectivement. Toutes ces translocations ont été rapportées à une dérégulation, *in fine*, de la cycline D responsable de la transition G1/S du cycle cellulaire. Cette régulation du cycle cellulaire est une anomalie centrale dans le MM ²⁶. Il est intéressant de noter que les translocations d'IGH sont plus fréquentes chez les patients les plus jeunes, alors que l'hyperdiploïdie est plus fréquente chez les patients plus âgés ²⁷. Les translocations impliquant le locus IGH sont également détectables dans les MGUS, suggérant leur rôle précoce dans les mécanismes d'oncogenèse MM ²⁸⁻³⁰.

La translocation (11; 14) est la translocation la plus fréquente dans le MM, présente dans 15 à 20% des patients ^{31,32}. Elle induit une surexpression de *CCND1*. Normalement, les lymphocytes B expriment les cyclines D2 et D3 mais pas D1. Des données récentes indiquent que la t(11; 14) est associée à une mutation activatrice de *CCND1* dans 10% des cas ³¹. Bien que l'impact pronostique de cette translocation soit considéré comme neutre, elle est associée à un mauvais pronostic en cas d'association à une mutation de *CCND1* ³¹.

La translocation (4; 14) est observée dans environ 15% des cas de MM et a été associée à un pronostic défavorable ³³⁻³⁶. La translocation induit une surexpression de *FGFR3* et *MMSET*. De plus, *FGFR3* est muté dans 17% des t(4; 14).

La translocation (14; 16) est présente chez environ 5% des patients au diagnostic et induit une surexpression de l'oncogène MAF - un facteur de transcription qui augmente l'expression de *CCND2* en se liant directement à son promoteur^{37,38}. La valeur pronostique de la t(14; 16) reste controversée selon les séries³⁴.

La translocation (6; 14) est présente dans seulement environ 1 à 2% des cas. Elle conduit à une surexpression de la *CCND3*. L'impact pronostique de cette translocation est neutre³⁹.

La translocation (14; 20) est présente chez environ 1% des patients. Il en résulte une surexpression du gène *MAFB*, dont la cible serait aussi le gène *CCND2*. *MAFB* est muté dans 25% de t(14, 20) cas. L'impact pronostique de cette translocation est neutre⁴⁰.

Les translocations de *MYC* représentent un événement génomique secondaire par opposition aux cinq principales translocations d'IGH, qui sont considérées comme des événements génomiques primaires. Elles ne sont présentes que dans 3 à 4% des cas aux stades MGUS ou SMM, alors qu'elles représentent 15 à 20% des cas de nouveau diagnostic⁴¹. Les locus partenaires de *MYC* les plus courants sont IGH (16,5%), IGL (16,5%) et IGK (6%), mais aussi *FAM46C* (9,5%), *FOXO3* (6%) et *BMP6* (3,5%). Ces translocations conduisent à une surexpression significative de *MYC*.

Anomalies du nombre de copies

Les anomalies du nombre de copies (CNA) dans le MM peuvent être focales - intéressant une région génomique étroite ne concernant que quelques gènes - ou larges, concernant des bras chromosomiques entiers. Les CNA sont aussi représentées dans le MM par les génomes hyperdiploïdes (Figure 3).

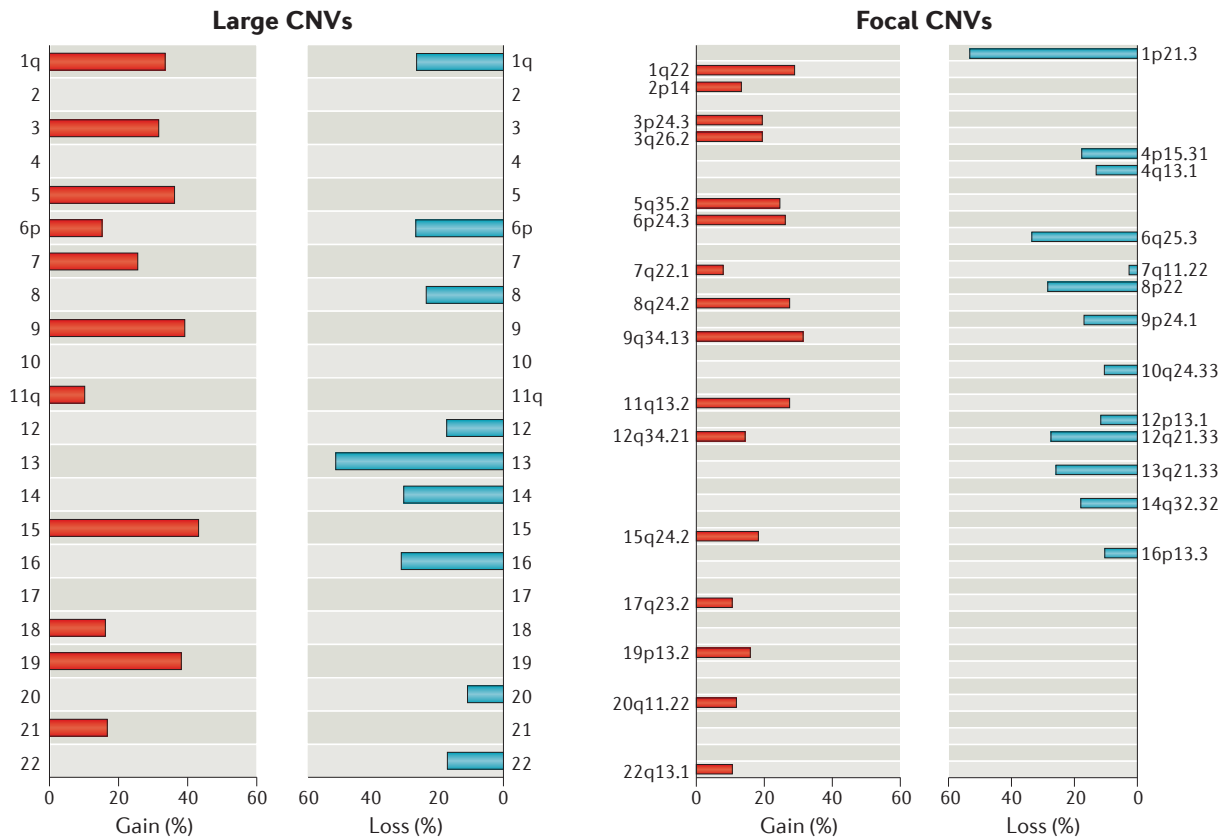


Figure 3. Principales anomalies chromosomiques focales et de larges régions génomiques impliquées dans le MM. (D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

L'hyperdiploïdie (HRD) est définie comme un nombre de chromosomes entre 48 et 74 au sein d'une cellule. L'HRD est présente dans environ 50% de MGUS, SMM et MM au diagnostic et caractérisé par des gains chromosomiques multiples, de

préférence les trisomies des chromosomes impairs 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21⁴²⁻⁴⁴. Le mécanisme sous-jacent à l'HRD n'est pas bien connu, mais il est suggéré que le gain de multiples chromosomes se produise au cours d'une seule anomalie mitotique catastrophique plutôt que par le gain successif de différents chromosomes⁴⁵. Dans la plupart des cas, l'HRD et les translocations impliquant le locus IGH sont mutuellement exclusives. L'HRD a été associée à un pronostic favorable⁴⁶, sauf dans le cas d'association à des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic tels que del 17p, t(4; 14) et gain de 1q⁴⁷.

Le gain 1q est présent chez 35-40% des patients au diagnostic⁴⁸ et est associé à un mauvais pronostic⁴⁹. Plusieurs oncogènes candidats présents dans la région 1q21 peuvent expliquer le caractère agressif des plasmocytes tumoraux avec gain de 1q, tels que *CKS1B*, *ANP32E*, *BCL9* et *PDZK1*. De plus, il est intéressant de noter que le nombre de copies de 1q semble corrélérer au pronostic clinique : les patients ayant quatre copies de 1q ou plus ont un pronostic plus défavorable que les patients ayant trois copies⁵⁰.

La délétion 1p est observée chez environ 30% des patients atteints de MM et est associée à un mauvais pronostic⁵¹⁻⁵³. Deux régions du bras 1p sont concernées : 1p12 et 1p32.3. La région 1p12 contient le gène suppresseur de tumeur *FAM46C*, par ailleurs fréquemment muté dans le MM. La région 1p32.3 peut être délétée de façon hétéro- et homozygote et contient le gène cible *CDKN2C*.

La délétion 13q est présente chez environ 45-50% des patients au diagnostic. Elle est souvent associée aux tumeurs non hyperdiploïdes⁵⁴⁻⁵⁶. La délétion 13q est également présente au stade MGUS, suggérant son rôle précoce dans l'oncogenèse de

la maladie ²⁸. La région minimale de délétion est comprise entre 13q14.11-13q14.3 et contient 68 gènes, dont *RB1* et les microARN 16-1 et 15a ⁴⁸. Le pronostic de la délétion 13q est neutre.

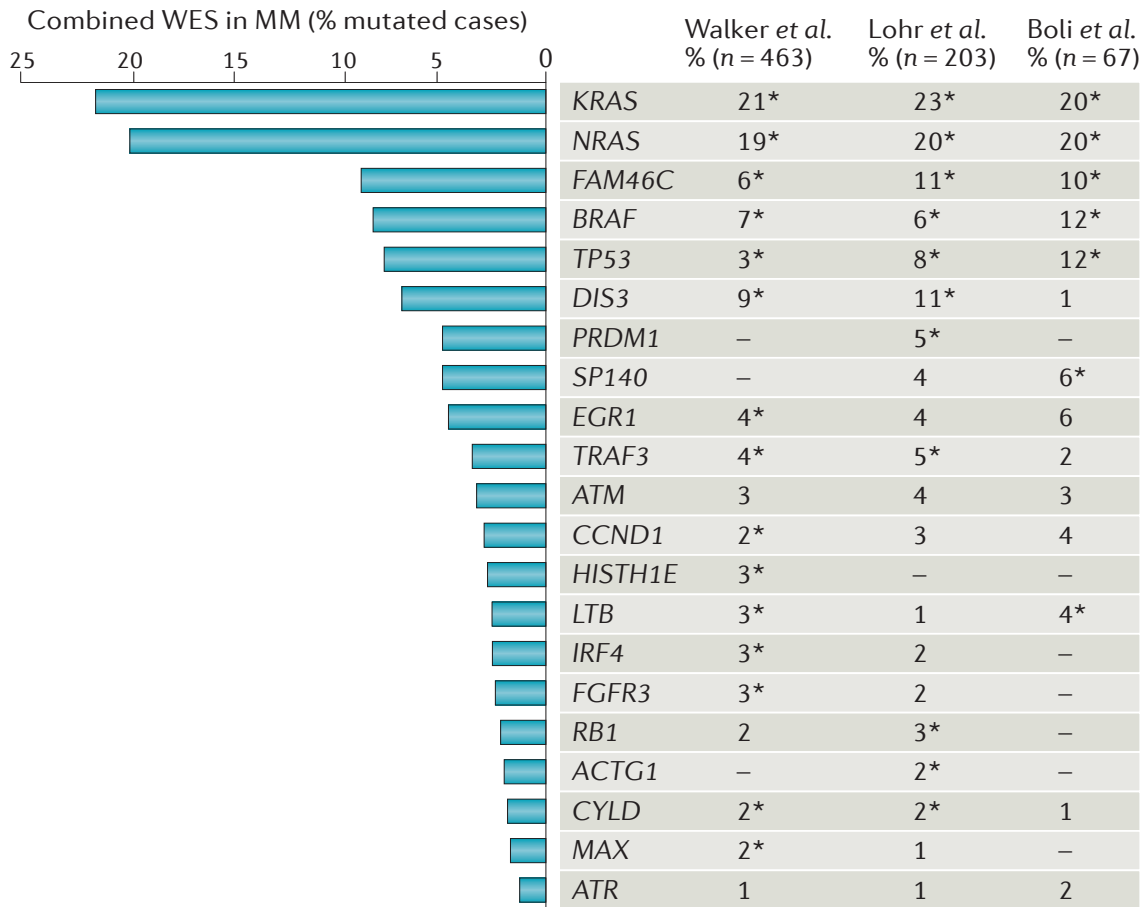
La délétion 17p est observée dans environ 10% des cas au diagnostic et de façon croissante avec l'évolution de la maladie ^{34,57}. La région minimale délétée comprend le gène suppresseur de tumeur *TP53* et est significativement associée aux mutations de *TP53*. Son pronostic est défavorable.

Les CNA focales comprennent par exemple les gains de 8q24.21 impliquant *MYC*, et présents dans 14% des patients. Le gain focal de 11q13.2 se retrouve dans environ 15% des cas et contient le gène. La délétion de 14q32.32 est présente chez 10% des patients et inclut le gène *TRAF3*, impliqué dans la voie non-canonique NF-κB.

Mutations somatiques nucléotidiques (SNVs)

L'application du séquençage exomique complet a permis d'identifier de façon exhaustive les mutations somatiques nucléotidiques impliquées dans la pathogénie du MM ^{50,58-60}. Le taux moyen de mutations somatiques est de 1,6 mutation par Mb dans le MM, comparativement à moins de 0,5/Mb pour les cancers pédiatriques et environ 10/Mb dans le cas du mélanome ou des cancers du poumon ^{61,62}. Deux signatures mutationnelles ont été retrouvées de façon prédominante dans le MM. L'une, non spécifique, est caractérisée par des mutations C>T dans un contexte CpG. La seconde signature est appelée signature APOBEC et se compose de mutations C>T et C>G au niveau de trinuécléotides TpCpN, associées à une suractivité désaminase de cytidines de la famille APOBEC.

Plusieurs gènes sont mutés de façon récurrente et sont donc considérés comme des événements majeurs de l'oncogenèse du MM. Seize de ces gènes étaient mutés de façon significative dans au moins une des trois cohortes étudiées: *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *DIS3*, *FAM46C*, *BRAF*, *TRAF3*, *PRDM1*, *CYLD*, *RB1*, *ACTG1*, *LTB*, *IRF4*, *MAX*, *HISTH1E* et *SP140* (Figure 4).

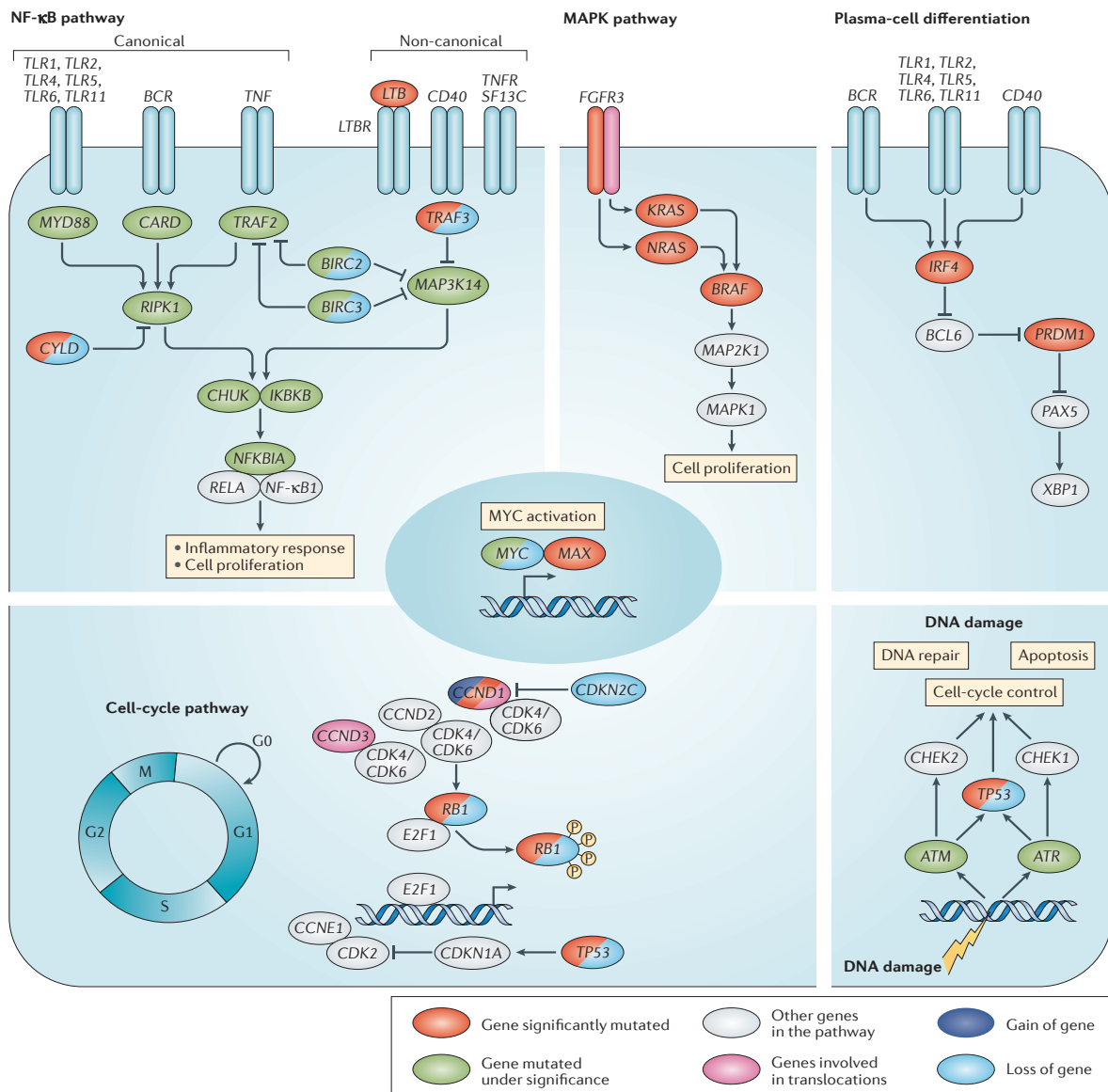


*Mutations reaching significance

Figure 4. Mutations nucléotidiques somatiques récurrentes dans le MM. (D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

Voies de signalisation impliquées

La voie de MAPK est la voie la plus fréquemment mutée dans le MM (comprenant les gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*), représentant environ 40% des cas. Les mutations de la voie MAPK ont, semble-t-il, un impact neutre sur la survie sans progression et globale des patients (Figure 5).



Figures 5. Principales voies de signalisation altérées dans le MM. (D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

Les gènes de la voie NF-kB sont également fréquemment mutés, tels que *TRAF3*, *CYLD* et *LTB* et représentent environ 20% des cas. Semblable à la voie MAPK, la voie NF-kB n'a pas d'impact sur la survie des patients nouvellement diagnostiqués⁵⁰.

Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*TP53*, *ATM* et *ATR*) sont mutés dans environ 15% des cas de MM. Ces mutations sont significativement associées à un mauvais pronostic dans le MM⁵⁰.

DIS3 et *FAM46C* sont deux gènes parmi les plus fréquemment mutés dans le MM, cependant leur mécanisme d'action n'est pas connu. On pense qu'ils agissent tous deux comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

D'autres gènes significativement mutés sont impliqués dans la différenciation de lignées de cellules B, telles que *PRDM1* et *IRF4*. Les mutations du gène *IRF4* sont associées à une survie globale favorable dans le MM⁵⁰.

Hétérogénéité clonale et évolution clonale.

La capacité des cellules tumorales à s'adapter aux traitements et à évoluer est provoquée par la coexistence de sous-clones multiples et génétiquement hétérogènes, au sein d'une même tumeur (Figures 6).

Les résultats de séquençage exomique complet ont permis d'estimer qu'en moyenne, un myélome est composé de 5 sous-clones. Dans une cohorte de 203 patients atteints de MM, les gènes de la voie MAPK, à savoir *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*, étaient mutés de façon clonale chez environ 70% des patients et sous-clonale dans les 30% restants. Cependant, cette étude comprenait un mélange de patients au diagnostic

et à la rechute. Dans cette étude, les gènes mutés de façon récurrente étaient plus souvent sous-clonaux chez des patients nouvellement diagnostiqués et clonaux chez des patients précédemment traités, ce qui suggère une sélection clonale liée au traitement⁵⁹.

L'étude de la co-occurrence d'évènements génomiques permet de définir des combinaisons de mutations fréquemment associées et ainsi d'améliorer la compréhension de la maladie. Par exemple, les translocations impliquant le locus IGH et l'hyperdiploïdie (HRD) sont mutuellement exclusives dans la grande majorité des cas^{50,63,64}. L'HRD est fortement corrélée aux mutations de *NRAS* et aux translocations impliquant *MYC*. La t(11; 14) est associée aux mutations des gènes *KRAS*, *IRF4* et *CCND1*. La t(4; 14) est associée aux mutations des gènes *FGFR3*, *DIS3* et *PRKD2* et aux CNA del12p, del13q et gain de 1q. Ces données sont la source de projet d'analyse fonctionnelle afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'association de ces mutations au cours de la progression tumorale.

L'évolution clonale représente les variations de l'hétérogénéité clonale à travers le temps. Bien que les MGUS et SMM soient moins complexes génétiquement que le MM, l'hétérogénéité clonale est déjà présente à ces stades. Une étude portant sur le séquençage séquentiel de 3 cas de SMM ayant progressé en MM a révélé que les sous-clones prédominants au moment de la progression étaient déjà présents au stade précoce⁶⁵ (Figure 6).

L'évolution clonale en MM avant et après traitement peut suivre plusieurs schémas: une évolution clonale linéaire, une évolution en ramification ou une absence d'évolution clonale. Dans ce dernier cas (se produisant dans 35% des MM), on retrouve

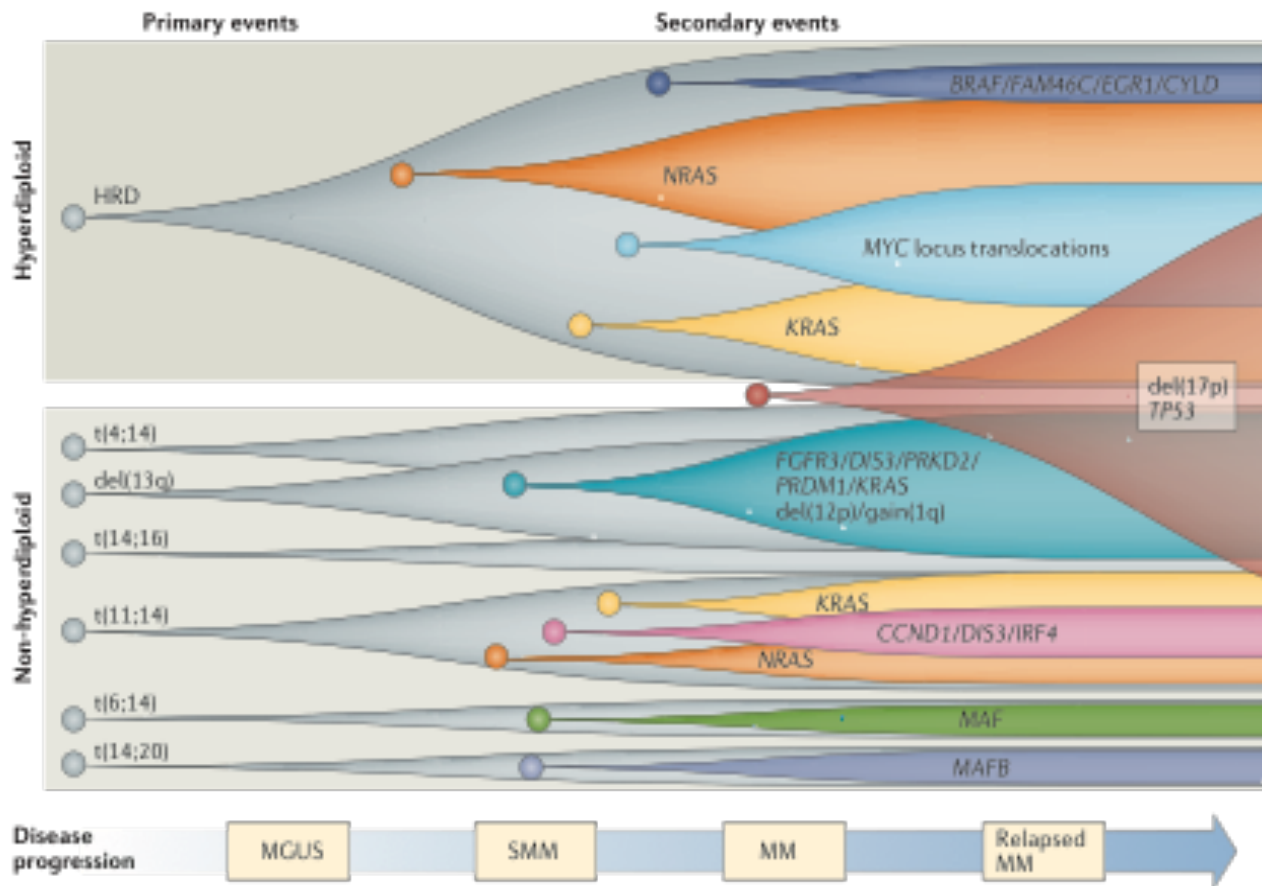


Figure 6. Proposition de schéma caractérisant l'évolution clonale dans le MM. (D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

la même composition d'hétérogénéité clonale avant et après traitement ; ce qui suggère que tous les sous-clones sont affectés par le traitement de façon similaire et repeuplent la tumeur de manière équivalente. Dans le cas de l'évolution clonale linéaire (40% des cas), il n'y a pas de modification de répartition des sous-clones mais de nouvelles mutations sont acquises en leur sein. L'évolution clonale par ramification (25% des cas) signifie qu'un ou plusieurs sous-clones émergent alors que d'autres diminuent en proportion au moment de la rechute. La compréhension de l'évolution clonale permet

d'identifier les mécanismes de progression des stades précurseurs et de résistance au traitement dans le cas du MM.

Application clinique de la génomique

Certaines anomalies génomiques ont un rôle pronostique permettant de définir de nouveaux marqueurs de progression. C'est le cas des anomalies de *TP53*, de la t(4; 14) et de l'amplification 1q, mais aussi des mutations des gènes *ATM*, *ATR*, *ZFH4* et des translocations de *MYC*.

Une autre application concerne la découverte de mutations de résistance et de mutations pour lesquelles une thérapie ciblée existe. Dans le MM, plusieurs de ces mutations sont présentes de façon récurrente, comme indiqué dans le Tableau 8.

| Alteration | Frequency | Targeted therapy | Drug development in oncology (clinical trial ref. number) |
|---|------------------|---|---|
| Mutations in <i>KRAS</i> | 21% ⁶ | Selumetinib ^{123,124} | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II in MM (NCT01085214) • Phase III (NCT01933932) |
| Mutations in <i>NRAS</i> | 20% ⁶ | Cobimetinib ¹²⁵ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase III (NCT01689519) |
| Translocations involving <i>MYC</i> | 18% ⁸ | BET inhibitors ¹²⁶ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase I in MM (NCT02157636) |
| Mutations in <i>FGFR3</i> , t(4;14) | 13% ⁸ | <ul style="list-style-type: none"> • BGJ398 (REF. 127) • AZD4547 (REF. 128) | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II (NCT02160041) • Phase III (NCT02154490) |
| Mutations in <i>BRAF</i> | 8% ⁶ | Vemurafenib ¹²⁹ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II in MM (NCT01524978) • Phase III (NCT01689519) |
| del(1p) resulting in loss of <i>CDKN2C</i> | 30% ⁶ | Palbociclib ¹³⁰ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II in MM (NCT00555906) • Phase III (NCT01942135) |
| t(11;14) resulting in <i>CCND1</i> overexpression and mutations | 19% ⁸ | Palbociclib ¹³⁰ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II in MM (NCT00555906) • Phase III (NCT01942135) |
| t(6;14) resulting in <i>CCND3</i> overexpression | 1% ⁸ | Palbociclib ¹³⁰ | <ul style="list-style-type: none"> • Phase II in MM (NCT00555906) • Phase III (NCT01942135) |

Tableau 8. Mutations récurrentes dans le MM faisant l'objet d'une thérapie ciblée à l'étude.

(D'après Manier et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016).

III. L'ADN circulant

Il est donc nécessaire de développer des outils permettant l'évaluation de l'évolution clonale dans le MM de façon longitudinale au cours de la maladie. L'ADN circulant libre représente une approche intéressante, car son séquençage ne nécessite qu'une simple prise de sang, permettant des prélèvements séquentiels au cours des périodes de traitements ou de rémission et de surveillance. L'ADN circulant tumoral est dérivé de cellules tumorales apoptotiques et nécrotiques qui libèrent leur ADN fragmenté dans la circulation sanguine (Figure 7). La taille des fragments d'ADN circulant est d'environ 140 à 170 paires de bases, correspondant à la taille du chromatosome (nucléosome plus histone de liaison). La taille courte des fragments d'ADN circulant représente une difficulté technique pour son séquençage et impose l'utilisation de technologies spécifiques.

Les premières descriptions de l'ADN circulant tumoral datent des années 1990, alors que deux groupes rapportent la présence de mutations tumorales de *NRAS* dans l'ADN circulant de patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique et d'une leucémie myéloïde aiguë, respectivement ^{66,67}. La première analyse prospective de l'ADN circulant a été réalisée en 2013 avec pour objectif de détecter des mutations liées à des métastases chez 30 patientes atteintes de cancer du sein. Une technique de séquençage ciblé allèle-spécifique permettait la détection de mutations des gènes *PIK3CA* et de *TP53*. Les auteurs mettaient en évidence une corrélation entre la réponse et les variations de fraction allélique des mutations de ces deux gènes ⁶⁸.

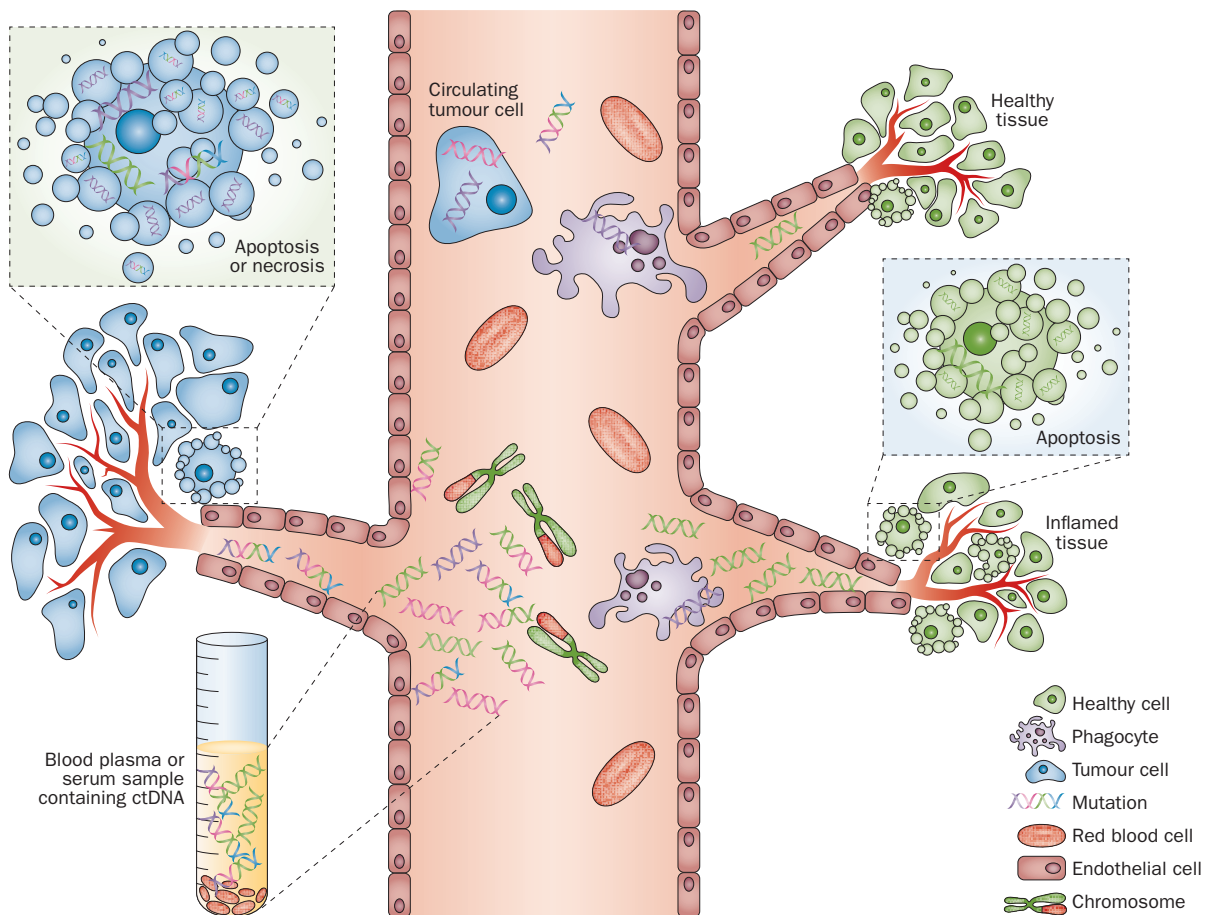


Figure 7. Mécanisme de génération de l'ADN circulant par apoptose et nécrose des cellules tumorales et inflammatoires. D'après Crowley et al. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013

Le séquençage de l'ADN circulant représente un outil déterminant pour l'étude de l'évolution clonale. Plusieurs applications cliniques potentielles pourraient en découler concernant le MM, telles que la détection précoce de patients atteints de MGUS ou SMM et à risque de progression, l'évaluation pronostique au moment du diagnostic, l'évaluation de la réponse au cours des traitements, la recherche de mutations de résistance et la surveillance de patients en rémission afin de surveiller le

risque de rechute. Cependant, l'application de l'ADN circulant dans la pratique clinique dépend de son évaluation complète en comparaison de l'ADN des plasmocytes tumoraux, afin de déterminer si les anomalies génomiques détectées dans l'ADN des cellules tumorales sont présentes au niveau de l'ADN circulant.

Dans cette étude, nous avons effectué un séquençage du génome complet à faible profondeur de l'ADN circulant de 88 patients atteints de MM afin de déterminer la proportion de patients chez lesquels l'ADN circulant peut être détecté. Nous avons ensuite comparé les anomalies génomiques de l'ADN circulant et de l'ADN des plasmocytes tumoraux de façon systématique par séquençage exomique complet chez 10 patients atteints de MM, afin de déterminer la représentativité de l'ADN circulant dans le MM. Enfin, nous avons utilisé une technique de séquençage ciblé de l'ADN circulant pour déterminer l'évolution clonale à partir d'échantillons séquentiels de MM.

METHODES

Cohorte de patients : au total, 88 échantillons de patients ont été utilisés pour le séquençage génomique complet de l'ADN circulant. Tous les patients présentaient un MM actif selon les critères IMWG, à l'exception de 5 patients atteints de gammopathies monoclonales de signification indéterminée et de 10 patients atteints de myélome multiple asymptomatique. Dix de ces échantillons ont été sélectionnés pour réaliser un séquençage exomique complet en parallèle de l'ADN des plasmocytes tumoraux. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé écrit permettant la collection et l'analyse de leurs échantillons et de leurs données cliniques à des fins de recherche.

Extraction de l'ADN : des échantillons de plasma ont été isolés à partir de tubes EDTA de sang total par réalisation de deux étapes de centrifugation: 300 g pendant 10 min et 3000 g pendant 10 min. L'ADN a été extrait en utilisant des kits Qiagen d'extraction des acides nucléiques circulants à partir de 2 à 6 ml de plasma. Les plasmocytes tumoraux ont été isolés à partir de prélèvement de moelle osseuse par Ficoll et sélection des cellules CD138+ par billes magnétiques. Les cellules mononuclées circulantes ont été utilisées pour l'ADN constitutionnel. L'ADN génomique a été extrait en utilisant un kit d'extraction d'ADN Qiagen.

Séquençage de l'ADN circulant : Trois techniques de séquençage ont été appliquées aux échantillons d'ADN circulant. Pour le séquençage génomique complet, les bibliothèques d'ADN ont été préparées à l'aide de kits Kapa Hyper Prep avec des

adaptateurs customisés (IDT et Broad Institute) à partir de 5 ng d'ADN. Jusqu'à 48 librairies ont été combinées et séquencées en utilisant sur un séquenceur HiSeq2500 (Illumina), avec un objectif de profondeur de séquençage de 0,1x. Pour le séquençage exomique complet, les librairies ont été préparées en utilisant le kit Kapa Hyper Prep avec des adaptateurs personnalisés (IDT et Broad Institute) à partir de 20ng d'ADN. Les librairies ont été quantifiées par PicoGreen (Life Technologies) et combinées par 3 échantillons. La capture hybride des librairies d'ADN circulant a été réalisée en utilisant le kit Nextera Rapid Capture Exome (Illumina) avec des oligos de blocage personnalisés (IDT et Broad Institute). Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina HiSeq2500 pour un objectif de profondeur de séquençage de 200x.

Séquençage d'ADN génomique : les librairies ont été préparées et soumises à une capture hybride en utilisant le kit Nextera Rapid Capture Exome (Illumina) à partir de 25 ng d'ADN. Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina HiSeq2500 avec une profondeur de séquençage de 200x pour les tumeurs et 50x pour l'ADN constitutionnel.

Séquençage ciblé : le séquençage ciblé s'est fait par utilisation de kit HaloPlex HS. La procédure comprend une digestion enzymatique de l'ADN puis la confection de librairies incluant un code bar moléculaire unique pour chaque fragment d'ADN. Un panel de 109 gènes mutés de façon récurrente était étudié. Après hybridation et enrichissement, les librairies étaient séquencées sur un HiSeq2500 pour une profondeur de séquençage de 500x. L'analyse des données de séquençage s'est fait à

partir du logiciel Agilent SureCall[®]. Des filtres étaient appliqués selon le processus suivant : les mutations étaient exclues si elles correspondaient à un variant allélique connu dans la population et sélectionnées si elles étaient référencées dans COSMIC.

Analyses informatiques des séquençages complets : les données de séquençage ont été analysées à l'aide des pipelines du Broad Institute de Harvard et du MIT (Firehose, www.broadinstitute.org/cancer/cga). Pour le séquençage du génome complet, nous avons déterminé la profondeur de séquençage afin d'évaluer les altérations du nombre de copies (> 1Mb). Nous avons par la suite implémenté un algorithme pour en déduire la fraction tumorale. Pour le séquençage exomique complet, les analyses incluent les logiciels MuTect (permettant l'étude des mutations nucléotidiques), GISTIC (pour les CNAs focales), ReCapSeg (pour les CNAs larges), ABSOLUTE (pour déterminer les fractions alléliques).

RESULTATS

Séquençage de l'ADN circulant par Ultra Low Pass – Whole Genome Sequencing (ULP-WGS)

Pour évaluer la proportion d'échantillons d'ADN circulant pour lesquels l'ADN tumoral pouvait être détecté, nous avons réalisé un séquençage génomique complet de faible profondeur (ULP-WGS) de l'ADN circulant provenant de 88 patients, dont 73 avaient un MM, 10 un SMM et 5 une MGUS.

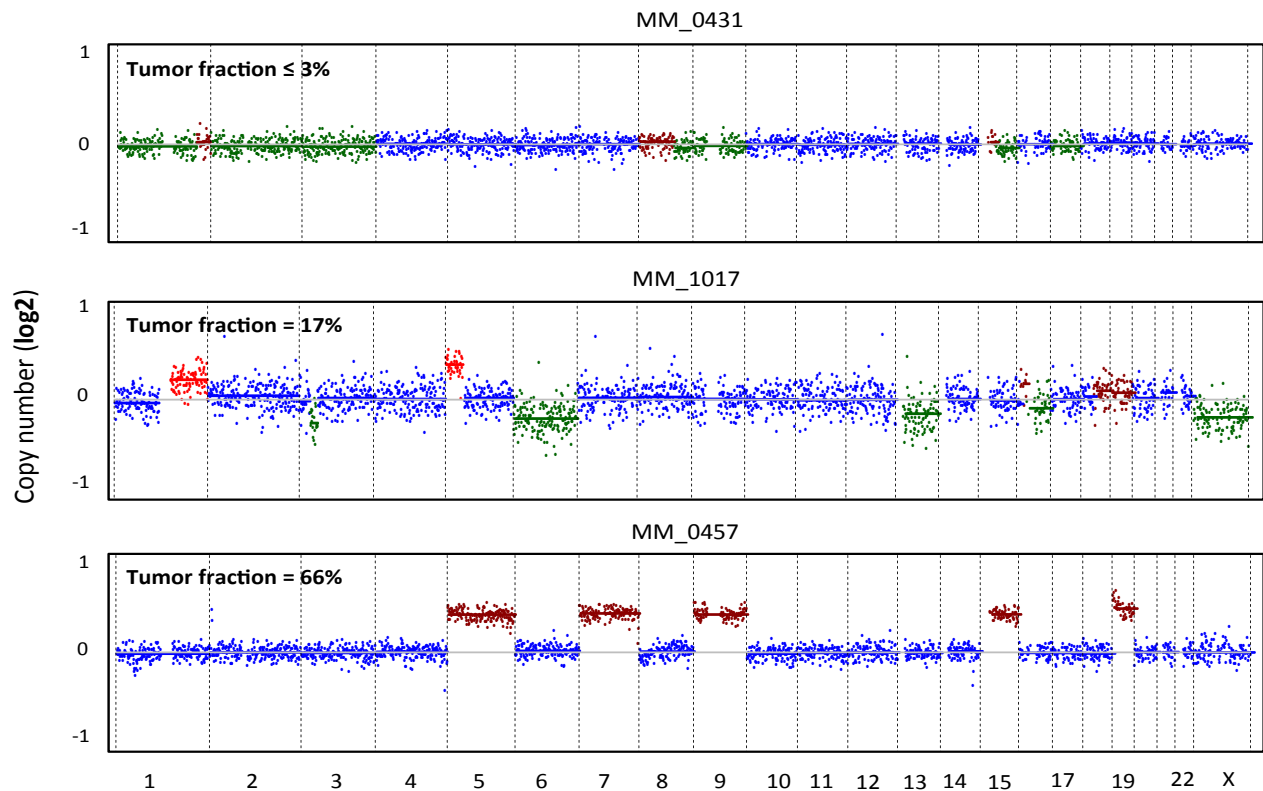


Figure 8. Ultra low pass- Whole genome sequencing pour 3 échantillons d'ADN circulant dans le MM.

La technique de ULP-WGS permet d'analyser la profondeur de séquençage pour chaque fragment d'ADN à l'échelle du génome et ainsi de déterminer les anomalies du nombre de copies. Assumant que les anomalies du nombre de copies sont exclusivement présentes au niveau de l'ADN tumoral et que les cellules sont, par définition, diploïdes, il est possible de déduire la fraction tumorale au sein de l'ADN circulant. Cette technique rend possible la détection d'ADN tumoral au sein de l'ADN circulant lorsque la fraction tumorale est supérieure à 3%. En deçà de 3%, le bruit de fond ne permet pas de détecter les anomalies du nombre de copie et donc la fraction tumorale au sein de l'ADN circulant (Figure 8).

La fraction tumorale des échantillons étudiés allait de 0 à 91% avec une moyenne de 12,4%. Plus de 75% des échantillons présentaient une fraction tumorale supérieure à 3%. Il est intéressant de noter que la fraction tumorale dans l'ADN

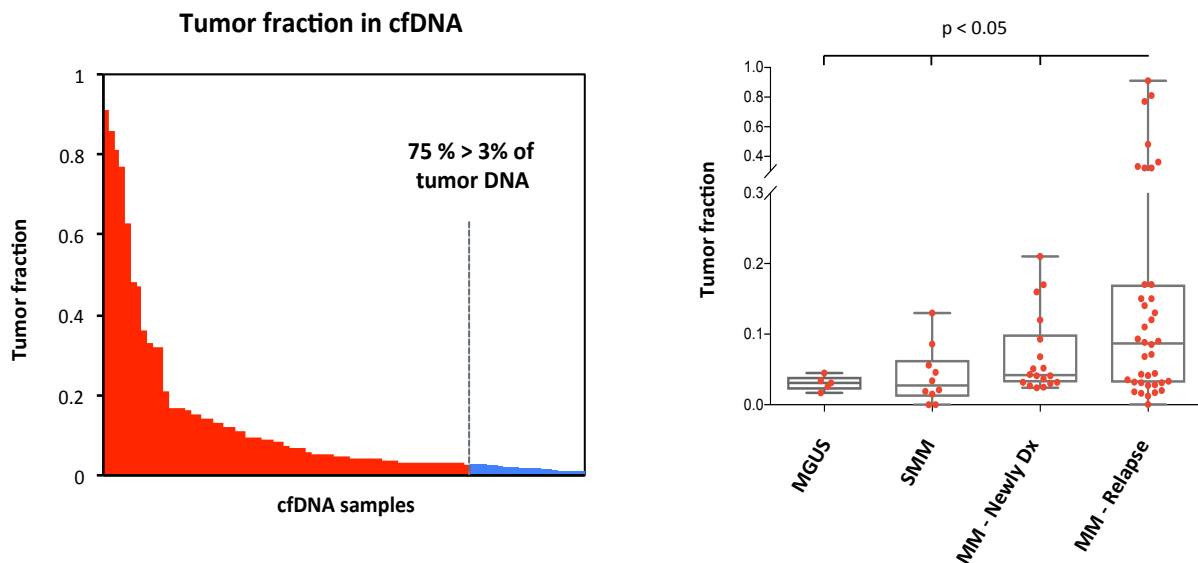


Figure 9. Corrélation entre le stade clinique et la fraction tumorale au sein de l'ADN circulant chez 88 patients atteints de MM. Corrélation entre la fraction tumorale et le stade clinique.

circulant était significativement associée au stade clinique de la maladie (Figure 9).

Nous avons ensuite évalué les anomalies du nombre de copies au sein des 88 échantillons à partir des données de séquençage génomique complet. Parmi les 88 échantillons de patients atteints de MM, 10% une délétion 1p, 57% un gain de 1q, 25% une délétion de 12p, 68% une délétion de 13q, 11% une délétion 17p et 42% avaient une hyperdiploïdie, (Figure 10).

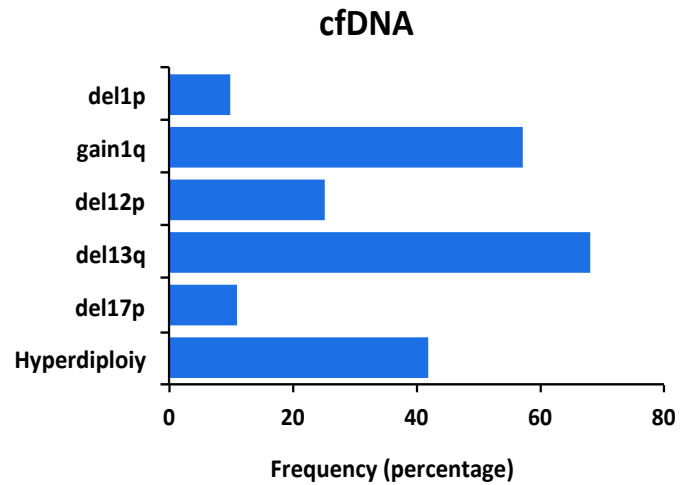


Figure 10. Evaluations des anomalies du nombre de copies par ULP-WGS de l'ADN circulant.

Au total, les données du séquençage génomique complet de faible profondeur de l'ADN circulant fournissent des informations sur la fraction tumorale (potentiellement pronostique) et sur les anomalies du nombre de copies.

Comparaison de l'ADN circulant avec l'ADN plasmocytaire par Whole Exome Sequencing (WES)

Pour évaluer si les anomalies génomiques détectées dans les plasmocytes tumoraux peuvent l'être aussi dans l'ADN circulant, nous avons réalisé un séquençage exomique complet de paires d'échantillons comportant ADN circulant et ADN des plasmocytes

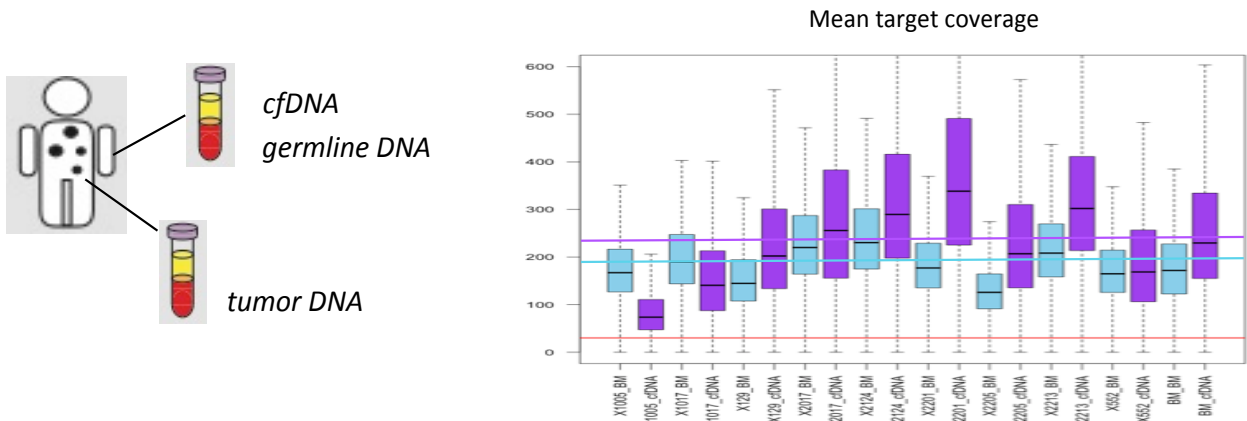


Figure 11. Profondeur de séquençage des échantillons d'ADN circulant et d'ADN des cellules tumorales.

tumoraux avec l'ADN constitutionnel pour contrôle, prélevés au même moment, pour 10 patients. La profondeur de séquençage était similaire pour les échantillons d'ADN circulant et d'ADN tumoral, avec une couverture moyenne de 213x et 194x, respectivement (Figure 11).

Conformément aux précédentes études de MM WES, nous avons détecté une moyenne de 112 et 94 mutations nucléotidiques par exome, dans l'ADN circulant et l'ADN tumoral, respectivement ($p > 0.05$). Les signatures mutationnelles étaient similaires dans les 2

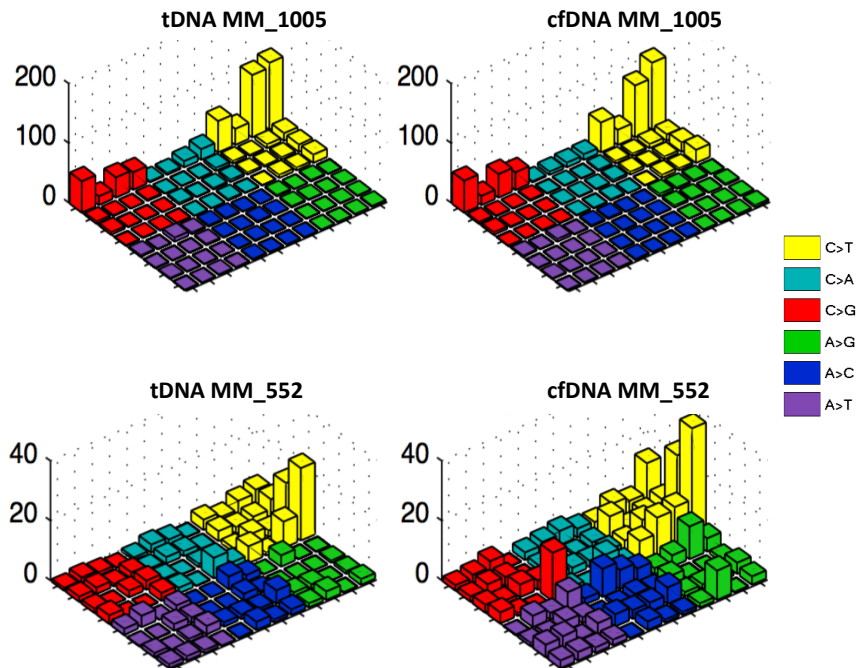


Figure 12. Comparaison des signatures mutationnelles dans l'ADN circulant et dans l'ADN des cellules tumorales.

compartiments avec prédominance des deux signatures mutationnelles caractéristiques du myélome multiple ⁶⁹ : l'une principalement constituée de transition C>T dans les régions riches en CpG méthylés et l'autre, appelée APOBEC, consistant en des transitions C>T et C>G au niveau de répétitions de trinuécléotides TCN (Figure 12). Ces résultats indiquent que l'ADN circulant permet de définir la signature mutationnelle du MM de façon consistante, permettant d'apporter des informations sur les mécanismes mutationnels sous-jacents à l'oncogénèse du MM.

Nous avons ensuite caractérisé les anomalies du nombre de copies à partir des données de séquençage exomique. Les principales anomalies du nombre de copies retrouvées de façon récurrente dans le MM telles que délétion 1p, gain de 1q, gain de

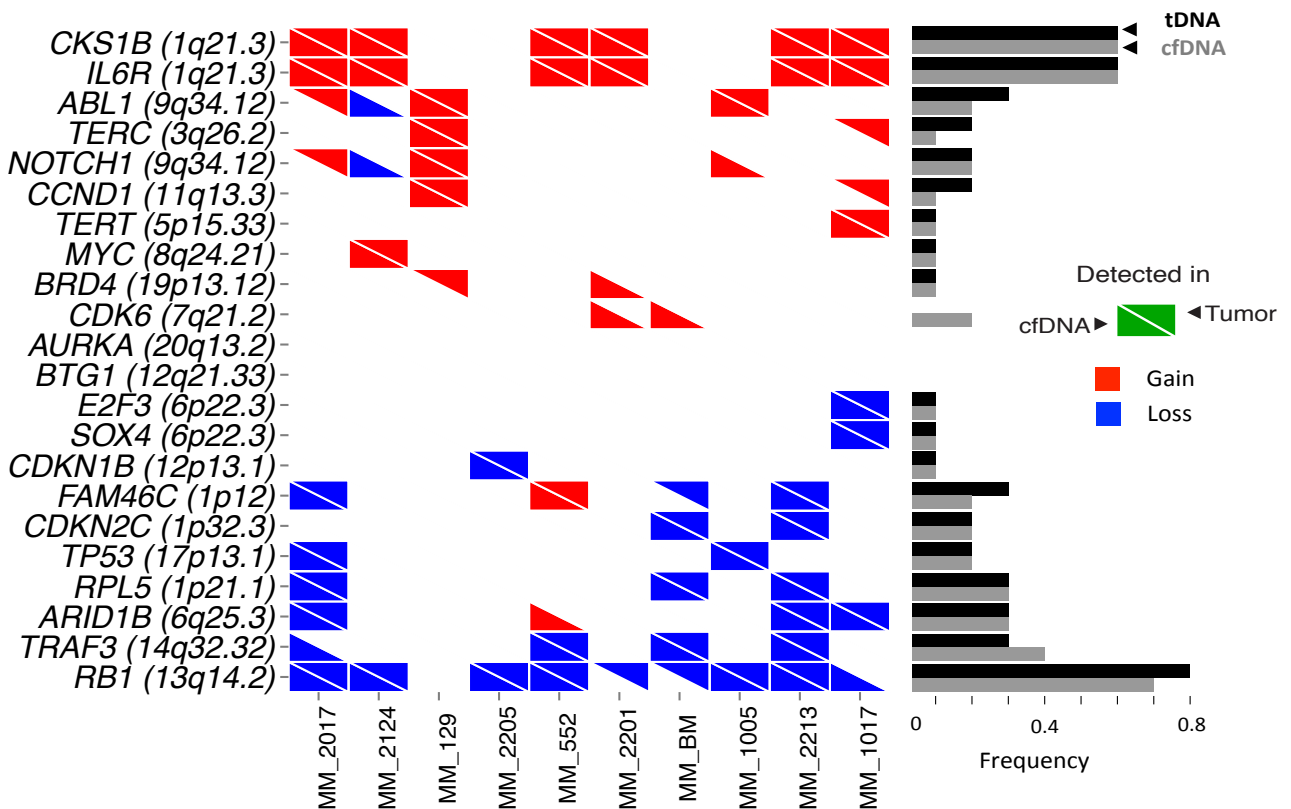


Figure 13. Anomalies du nombre de copies évaluées par WES au sein de paires d'échantillons comportant l'ADN circulant et l'ADN des cellules tumorales.

8p, gain de 11q, délétion 13q et délétion 17p étaient identifiées similairement dans les deux compartiments (Figure 13).

Nous avons ensuite comparé les mutations nucléotidiques retrouvées dans l'ADN circulant et l'ADN tumoral. En moyenne, 86 % des mutations non-silencieuses identifiées dans l'ADN tumoral étaient retrouvées dans l'ADN circulant. Réciproquement, 84% des mutations non-silencieuses identifiées dans l'ADN circulant étaient retrouvées dans l'ADN tumorale. Parmi les gènes mutés de façon récurrente dans le MM, tels que *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* et *TP53*, 92% étaient retrouvés similairement dans les 2 compartiments (Figure 14).

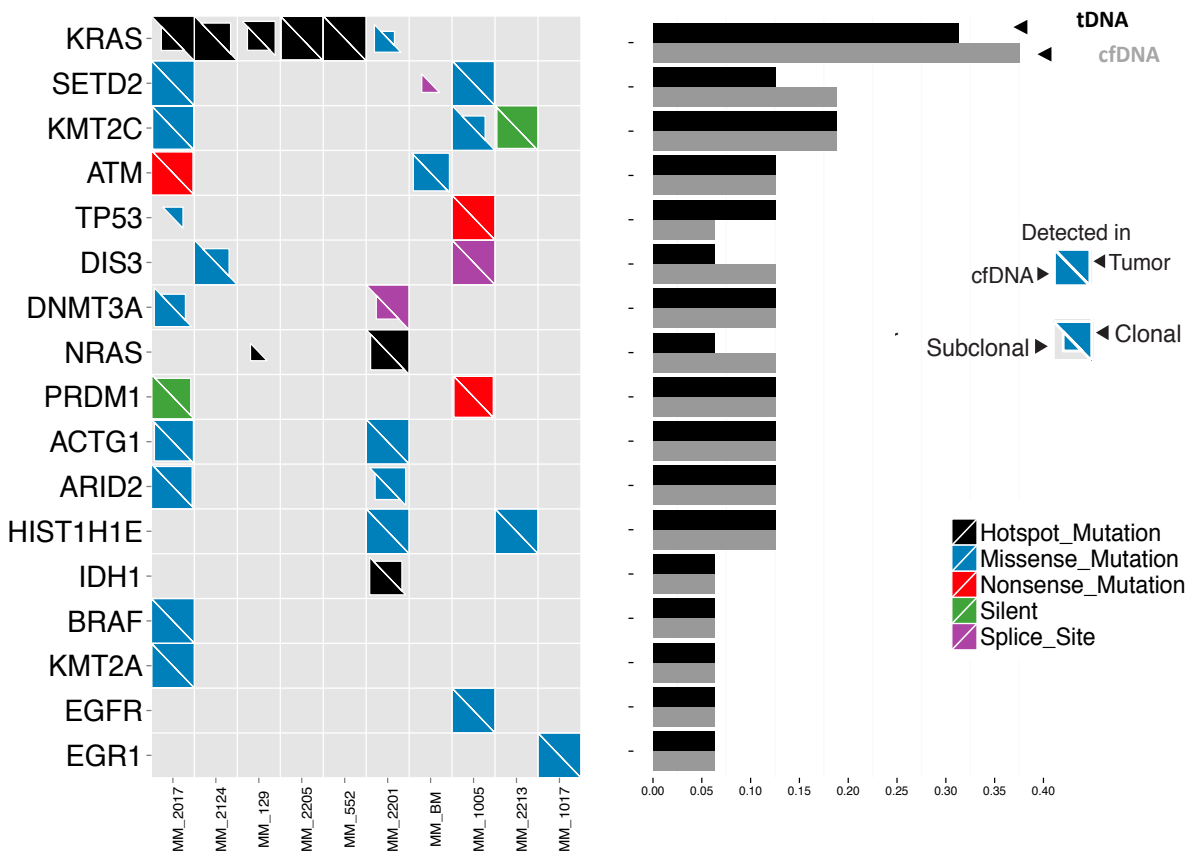


Figure 14. Mutations nucléotidiques somatiques évaluées par WES au sein de paires d'échantillons comportant l'ADN circulant et l'ADN des cellules tumorales.

Ces résultats indiquent qu'à la fois, l'ADN circulant est représentatif de l'ADN tumoral mais peut aussi potentiellement améliorer la définition de l'hétérogénéité clonale, permettant d'identifier des mutations non présentes au site de ponction médullaire.

Evaluation de l'hétérogénéité clonale par WES

Nous avons ensuite étudié l'hétérogénéité clonale par détermination des mutations clonales et sous-clonales. Comme décrit précédemment les tumeurs de MM sont composées de plusieurs clones. Les mutations présentes dans théoriquement l'ensemble des clones sont dites clonales et les mutations présentes dans seulement une partie des clones sont dites sous-clonales. L'application d'un logiciel nommé ABSOLUTE permet de déterminer la fraction des cellules tumorales concernées par une mutation donnée ⁷⁰. Ceci est déterminé en tenant compte de la fraction allélique, de la pureté de l'échantillon et d'éventuelles anomalies du nombre de copies au niveau du site de la mutation. Par définition, une mutation intéressant une fraction de cellules cancéreuses (CCF) supérieure à 90% est considérée comme clonale. Dans le cas contraire, la mutation est sous-clonale. Parmi les 10 patients pour lesquels nous avons des échantillons appariés d'ADN circulant et d'ADN tumoral, 98% des mutations clonales présentes dans l'ADN tumoral étaient détectées dans l'ADN circulant et 64% des mutations sous-clonales détectées dans l'ADN tumoral étaient retrouvées dans l'ADN circulant (Figure 14). Réciproquement, 97% des mutations présentes dans l'ADN

circulant ont été détectées dans l'ADN tumoral; et 63% des mutations sous-clonales détectées dans l'ADN circulant étaient retrouvées dans l'ADN tumoral (Figure 15).

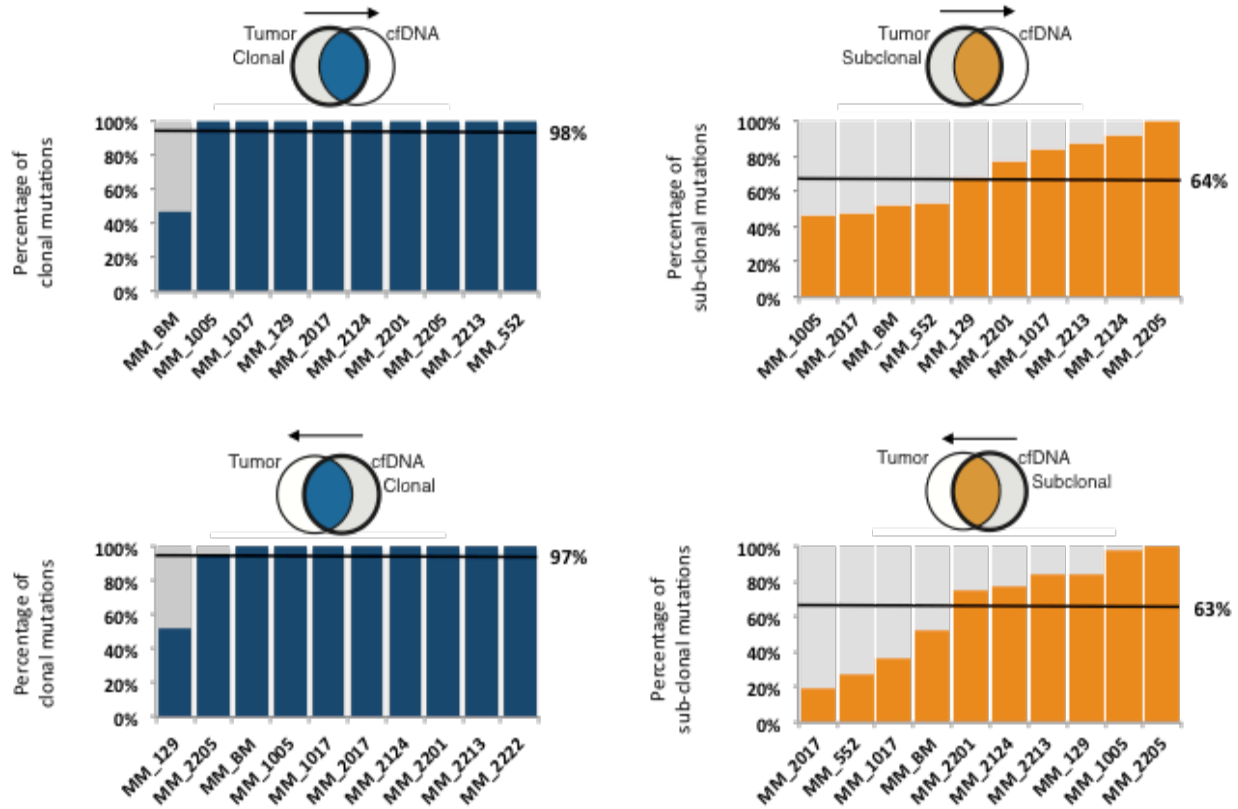


Figure 15. Proportion de mutations clonales et sous-clonales partagées par l'ADN circulant et l'ADN des cellules tumorales.

Afin de déterminer la distribution des sous-clones comparativement entre l'ADN circulant et l'ADN tumoral, nous avons réalisé des analyses de clusters des CCF dans les 2 compartiments. Cette technique permet de comparer les fractions de cellules cancéreuses concernées par chaque mutation dans l'ADN circulant et dans l'ADN tumoral et de les regrouper par cluster afin de déduire la composition des différents clones présents au sein de la tumeur. Dans l'intégralité des cas, un cluster de mutations était présent à l'état clonal à la fois dans l'ADN des cellules tumorales et dans l'ADN circulant. De plus, la majorité des sous-clones était détectable dans les 2

compartiments, cependant avec des fractions tumorales variables (Figure 16). Dans certains cas, un sous-clone était retrouvé dans un seul des compartiments et notamment, un clone arborant une mutation *TP53* n'était détectable que dans l'ADN circulant. Cela suggère que ces mutations sous-clonales étaient soit trop faiblement représentées pour être détectées soit absentes du site de biopsie médullaire et potentiellement présentent dans un autre site de la moelle osseuse ou site extra-médullaire et ainsi détectées au niveau de l'ADN circulant. Ces données indiquent que le séquençage de l'ADN circulant pourrait améliorer la résolution de l'hétérogénéité clonale dans MM.

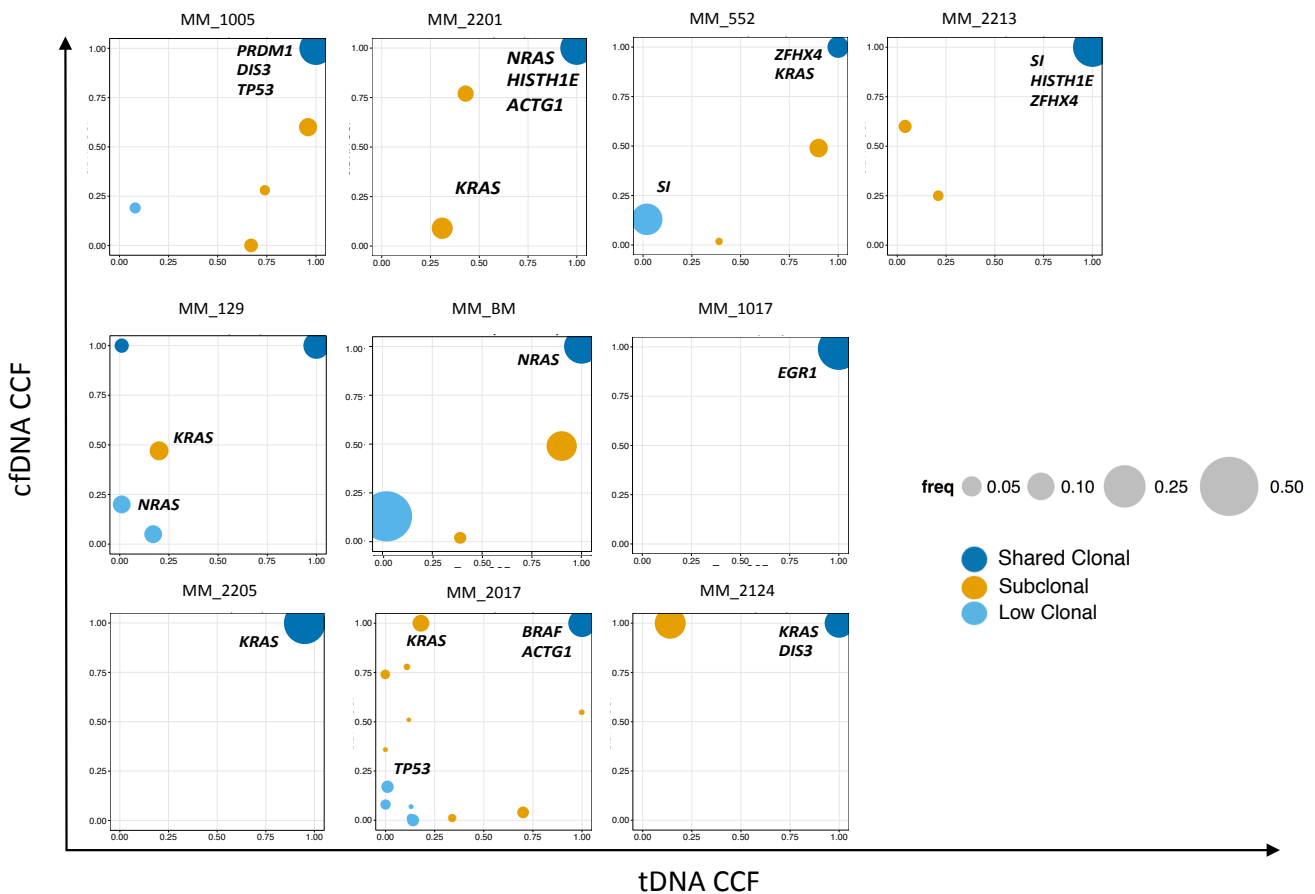


Figure 16. Répartition des clones comparativement entre l'ADN circulant et l'ADN des cellules tumorales par analyse de cluster de fraction tumorale des mutations nucléotidiques identifiées.

Evaluation de l'évolution clonale par séquençage ciblé

Nous avons ensuite réalisé un séquençage ciblé avec une profondeur de lecture d'environ 500x pour 10 paires d'échantillons séquentiels comportant un prélèvement d'ADN circulant au diagnostic et un à la rechute. Pour ce faire, nous avons généré et utilisé un panel de 109 gènes présentant des mutations récurrentes dans le MM selon les trois séries de WES publiées^{50,59,60}. Dans 4 cas nous retrouvons une évolution clonale franche avec une modification des fractions tumorales de certaines mutations correspondant à une sélection clonale au moment de la rechute (Figure 17). Cela indique qu'un séquençage profond ciblé de l'ADN circulant peut permettre d'étudier l'évolution clonale de façon longitudinale dans le MM.

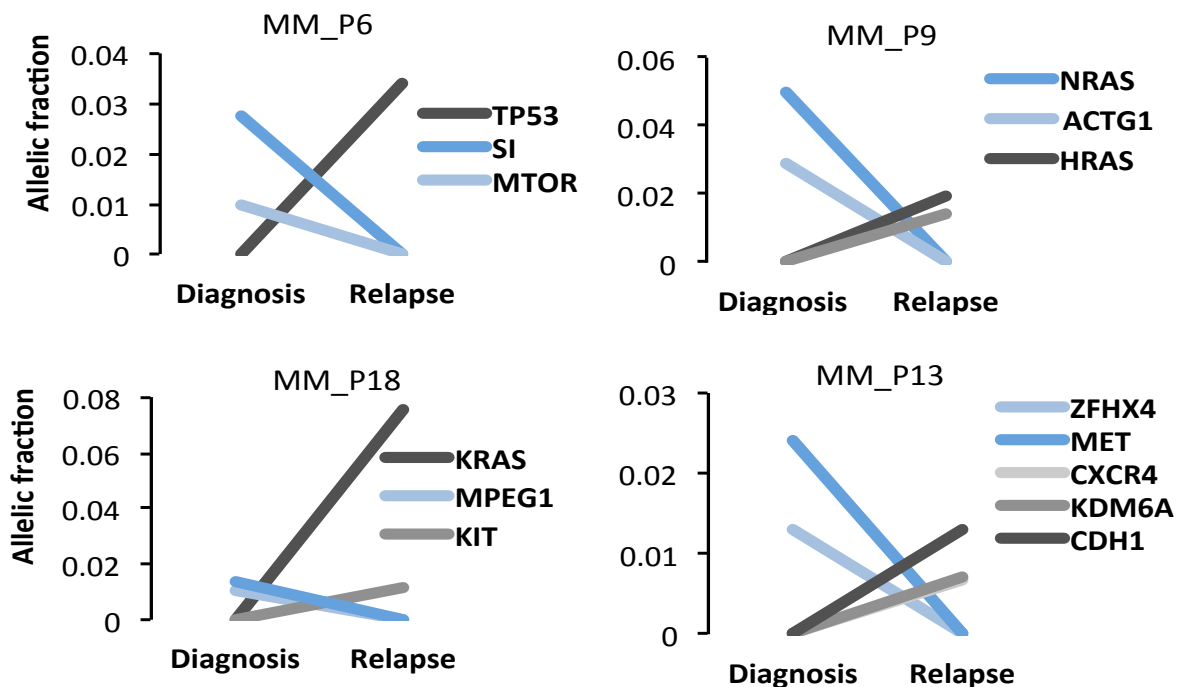


Figure 17. Evaluation d'échantillons séquentiels d'ADN circulant par séquençage ciblé chez 4 patients atteints de MM.

DISCUSSION

Le MM est une maladie génétiquement complexe et hétérogène associant des événements primaires et des événements secondaires conduisant au développement et à la progression de la maladie du stade de MGUS aux stades réfractaires de MM. Les événements primaires sont divisés en 2 sous-types : hyperdiploïdes et nonhyperdiploïdes. Les tumeurs hyperdiploïdes sont caractérisées par une trisomie des chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et / ou 21. Les tumeurs nonhyperdiploïdes comportent des translocations impliquant le locus IGH, principalement t(4; 14), t(6; 14), t(11; 14), t(14; 16) et t(14; 20). Les événements secondaires correspondent à des anomalies du nombre de copies, des translocations de *MYC* et des mutations nucléotidiques somatiques dans les voies de MAPKinase, NF- κ B et de la réparation l'ADN. Malgré des avancées thérapeutiques significatives, le MM reste une maladie quasi-constamment incurable. Cela est en grande partie dû à l'hétérogénéité clonale et à la possibilité d'évolution clonale des tumeurs, par sélection de clones résistants aux traitements, au cours de la maladie.

Ainsi, une l'évaluation longitudinale de l'hétérogénéité et de l'évolution clonales permettrait d'établir dans la pratique clinique le risque de progression, l'apparition de clones de résistance et donc la réponse aux traitements. Pour ce faire, l'emploi de biopsies liquides représente une approche intéressante puisqu'elle ne nécessite qu'une simple prise de sang afin de déterminer les anomalies génomiques présentes dans le MM de façon séquentielle au cours de la maladie.

Dans notre travail, nous rapportons la faisabilité et la représentativité du séquençage de l'ADN circulant comparativement au séquençage de l'ADN des cellules tumorales. Nous montrons que plus de 75% des patients atteints de MM ont plus de 3% d'ADN tumoral au sein de l'ADN circulant. De plus, par séquençage exomique complet de paires d'échantillons, nous montrons que l'ADN circulant est très représentatif des anomalies génomiques des cellules tumorales et peut même améliorer la définition de l'hétérogénéité clonale dans le MM. Enfin, un séquençage ciblé profond, nous a permis d'établir la faisabilité de suivre l'évolution clonale par l'ADN circulant.

De nombreuses applications cliniques peuvent découler du séquençage longitudinal de l'ADN circulant. Tout d'abord cette approche pourrait permettre la détection précoce de la progression de la maladie aux stades précurseurs (MGUS et le SMM). Une surveillance continue de l'évolution des anomalies génomiques pourrait permettre d'identifier les patients à risque de progression ou en cours de progression, avant l'apparition des premiers symptômes.

Au stade de MM symptomatique, le séquençage de l'ADN circulant pourrait notamment permettre d'évaluer la réponse au traitement (évolution des fractions alléliques de mutations présentes à l'initiation du traitement) et l'identification de mutations de résistance aux traitements.

Cette technique devra aussi être étudiée dans le cadre de la maladie résiduelle (MRD) afin d'évaluer sa sensibilité de détection de faibles clones persistants après réponse au traitement. Plusieurs études ont montré l'existence d'une forte association entre le statut de la MRD et le pronostic des patients. Les techniques actuelles d'analyse de la MRD comportent la réalisation de cytométrie en flux et de séquençage

du réarrangement de l'Ig monoclonale sur échantillons de moelle osseuse. L'analyse de la MRD par séquençage ciblé profond de l'ADN circulant permettrait ainsi son évaluation au cours du temps, sans que des aspirations de moelle osseuse répétitives soient nécessaires.

L'implémentation du séquençage de l'ADN circulant dans la pratique clinique pourrait ainsi permettre un suivi dynamique des patients, au cours de l'histoire naturelle de la maladie, tout en ne nécessitant qu'une simple prise de sang. Par ailleurs, le coût des séquençages ULP-WGS et ciblé est raisonnable et compatible avec leur application en pratique clinique. Il y a donc un réel intérêt à développer cette approche prospectivement, dans le cadre d'essais thérapeutiques, afin d'en évaluer méthodiquement les applications.

REFERENCES

1. Stewart AK, Richardson PG, San-Miguel JF. How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood* 2009;114:5436-43.
2. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011;364:1046-60.
3. International Myeloma Foundation. Multiple myeloma. Cancer of the bone marrow. 2008/2009 ed2008/2009.
4. Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, et al. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010;28:1599-605.
5. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.
6. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia* 2008;22:414-23.
7. Vital A. Paraproteinemic neuropathies. *Brain Pathol* 2001;11:399-407.
8. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
10. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:269-77.

11. Bataille R, Grenier J, Sany J. Beta-2-microglobulin in myeloma: optimal use for staging, prognosis, and treatment--a prospective study of 160 patients. *Blood* 1984;63:468-76.
12. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
13. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2013;369:438-47.
14. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-7.
15. Moreau P, Facon T, Attal M, et al. Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myelome 9502 randomized trial. *Blood* 2002;99:731-5.
16. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, 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;28:2077-84.
17. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-46.

18. Dimopoulos MA, Richardson PG, Schlag R, et al. VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study. *J Clin Oncol* 2009;27:6086-93.
19. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med* 2014;371:906-17.
20. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2016;375:1319-31.
21. Lonial S, Vij R, Harousseau JL, et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2012;30:1953-9.
22. Altieri A, Chen B, Bermejo JL, Castro F, Hemminki K. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *European journal of cancer* 2006;42:1661-70.
23. Broderick P, Chubb D, Johnson DC, et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nature genetics* 2012;44:58-61.
24. Chubb D, Weinhold N, Broderick P, et al. Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nature genetics* 2013;45:1221-5.
25. Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3112-21.

26. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-303.
27. Ross FM, Ibrahim AH, Vilain-Holmes A, et al. Age has a profound effect on the incidence and significance of chromosome abnormalities in myeloma. *Leukemia* 2005;19:1634-42.
28. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C, et al. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1879-82.
29. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002;100:1417-24.
30. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Cancer research* 1999;59:4546-50.
31. Walker BA, Wardell CP, Murison A, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nature communications* 2015;6:6997.
32. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88:674-81.

33. Solvason N, Wu WW, Kabra N, Wu X, Lees E, Howard MC. Induction of cell cycle regulatory proteins in anti-immunoglobulin-stimulated mature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:407-17.
34. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2020-8.
35. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003;101:1520-9.
36. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101:4569-75.
37. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008;359:906-17.
38. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol* 2010;28:4630-4.
39. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 2011;117:2009-11.
40. Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:217-23.

41. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013;88:360-76.
42. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12:115-30.
43. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12:131-44.
44. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998;12:960-9.
45. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 2003;17:427-36.
46. Pawlyn C, Melchor L, Murison A, et al. Coexistent hyperdiploidy does not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood* 2015;125:831-40.
47. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;80:203-8.
48. Walker BA, Wardell CP, Brioli A, et al. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J* 2014;4:e191.

49. Sawyer JR, Tian E, Heuck CJ, et al. Jumping translocations of 1q12 in multiple myeloma: a novel mechanism for deletion of 17p in cytogenetically defined high-risk disease. *Blood* 2014;123:2504-12.
50. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015.
51. Chang H, Jiang A, Qi C, Trieu Y, Chen C, Reece D. Impact of genomic aberrations including chromosome 1 abnormalities on the outcome of patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Leukemia & lymphoma* 2010;51:2084-91.
52. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009;27:4585-90.
53. Chang H, Qi X, Jiang A, Xu W, Young T, Reece D. 1p21 deletions are strongly associated with 1q21 gains and are an independent adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Bone marrow transplantation* 2010;45:117-21.
54. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001;15:981-6.
55. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, et al. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Blood* 1999;94:2583-9.

56. Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, et al. Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia* 2006;20:1610-7.
57. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-21.
58. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011;471:467-72.
59. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014;25:91-101.
60. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature communications* 2014;5:2997.
61. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010;463:899-905.
62. Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nature genetics* 2013;45:1134-40.
63. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood* 2005;106:2156-61.
64. Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 2014;28:34-43.

65. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014;28:1705-15.
66. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British journal of haematology* 1994;86:774-9.
67. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67-71.
68. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199-209.
69. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415-21.
70. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol* 2012;30:413-21.

AUTEUR : Nom : Manier

Prénom : Salomon

Date de Soutenance : 24 Mars 2017

Titre de la Thèse : Intérêt et applications cliniques du séquençage de l'ADN circulant dans le Myélome Multiple

Thèse - Médecine - Lille 2017

Cadre de classement : Hématologie

DES + spécialité : Hématologie

Mots-clés : Myélome Multiple, ADN circulant, Mutations somatiques

Résumé : ***Contexte.** Le séquençage de l'ADN circulant (ADNc) permet de suivre l'évolution clonale en réalisant des prélèvements séquentiels par une simple prise de sang. Son utilisation dans le myélome multiple (MM) est toutefois dépendante d'études caractérisant le profil génomique de l'ADN circulant en comparaison à l'ADN des cellules tumorales de la moelle osseuse (ADNt). **Méthodes.** Dans cette étude, nous avons réalisé un séquençage génomique complet de très faible couverture (ULP-WGS) pour 88 échantillons d'ADNc. Les librairies ont été construites avec le kit Kappa Hyper Plus et séquencées sur un HiSeq 4000 avec une couverture de 0,1X ; permettant de quantifier la fraction tumorale et de déterminer les anomalies du nombre de copies (CNA). Un séquençage exonique complet (WES) a été réalisé sur 30 échantillons appariés ADNc/ADNt/ADN germinale correspondant à 10 patients. Les librairies ont été préparées avec le kit Nextera Rapid Capture Exome et séquencées sur HiSeq 4000 avec une couverture de 200X. Les données de séquençage ont été analysées à l'aide des logiciels MuTect, ABSOLUTE, ReCapSeg, GISTIC et MutSig. **Résultats.** Parmi les 88 échantillons séquencés par ULP-WGS (73 MM, 10 SMM et 5 MGUS), la fraction tumorale dans l'ADNc variait de 0 à 91% avec une moyenne de 12,4%. De plus, 75% des échantillons avaient plus de 3% d'ADN tumoral détectable au sein de l'ADNc. Par WES, les CNA étaient concordantes entre l'ADNc et l'ADNt. Parmi les gènes mutés de façon récurrente dans le MM – dont KRAS, NRAS et TP53 - 98% des mutations présentes dans l'ADNt étaient détectées dans l'ADNc. Concernant l'hétérogénéité clonale, parmi les mutations détectées dans l'ADNt, 98% des mutations clonales et 64% des mutations sous-clonales étaient retrouvées dans l'ADNc. L'analyse par clusters de mutations entre l'ADNc et l'ADNt a permis d'identifier une majorité de clones et sous-clones communs aux 2 compartiments. Cependant, certains sous-clones n'étaient présents que dans un seul compartiment, indiquant que l'ADNc peut améliorer la définition de l'hétérogénéité clonale dans le MM. **Conclusions.** Ces résultats indiquent que le séquençage par WES et par ULP-WGS de l'ADNc et des CTC est représentatif du statut mutationnel des cellules tumorales de la moelle osseuse et peut améliorer la résolution de l'hétérogénéité clonale dans le MM. Cette approche pourrait donc permettre d'étudier l'évolution clonale et la maladie résiduelle de façon séquentielle dans le MM.*

Composition du Jury :

Président : Pr. Thierry Facon

Assesseurs : Pr. Bruno Quesnel, Pr. Franck Morschhauser, Pr. Xavier Leleu, Dr. Valérie Coiteux, Dr. Louis Terriou