

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 09 Décembre 2020
Par M BOUCHEZ Geoffrey**

**ETAT DE L'ART DU SUIVI DE LA MALADIE RESIDUELLE
DANS LE MYELOME MULTIPLE
PAR CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH, CHRU de Lille

Directeur, conseiller de thèse : Monsieur le Docteur Florent Dumezy, PH, CHRU de Lille

Assesseur(s) : Madame le Professeur, Agnès Charpentier, PU-PH, GHICL
Monsieur le Docteur Salomon Manier, MCU-PH, CHRU de Lille



Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie

Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire

Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique

Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie

Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury :

À ma présidente de jury de thèse,

Madame le professeur, Stéphanie Poulain.

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Soyez assurée de mon plus grand respect ainsi que de ma plus haute considération.

À mes assesseurs,

Madame le professeur Agnès Charpentier.

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Merci aussi pour votre accueil et toutes les connaissances en hématologie que j'ai pu acquérir par l'intermédiaire de ce stage à Saint Philibert. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Monsieur le docteur Salomon Manier.

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et je vous en remercie. Ce fut également un grand plaisir d'avoir travaillé à vos côtés pour la présentation d'un cas clinique dans le cadre de la réunion clinico-biologique qui ne s'est malheureusement pas déroulée. J'ai aimé le sujet et j'ai beaucoup appris. Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

À mon directeur de thèse,

Monsieur le docteur Florent Dumézy.

Merci d'avoir accepté d'encadrer cette thèse, de m'avoir donné de précieux conseils et le temps que vous m'avez consacré à travers ces nombreuses relectures (car oui, il en fallait du temps...). Cela a été un plaisir et un honneur d'avoir travaillé avec vous et l'idée de pouvoir continuer à travailler à vos côtés pour le mémoire me ravit.

Merci à Adélaïde et à mon ancien colocataire, Quentin, d'avoir pris le temps de relire toute ma thèse et merci à Pauline de m'avoir aidé à faire la mise en page !

Je tiens également à remercier toute l'équipe d'hématologie du CHU de Lille, les autres biologistes dont Valérie et surtout Christophe pour vos conseils en cytométrie, les techniciens de cytologie et de cytométrie pour votre disponibilité notamment en CMF où j'ai appris beaucoup de choses sur la partie technique, qui me servira pour la suite dans le cadre de mon mémoire.

Bien évidemment, merci à l'ensemble de mes co-internes du CHU de Lille, Popo, Quentin, Maël, Thibaut, KJ, Kitty, Mika, Alex, Victoria. 7 mois à vos côtés à rigoler, à se prendre la tête sur le planning ! Merci pour tous ces moments partagés avec vous et de votre soutien 😊 !

Et encore merci à Quentin et Maël pour tous ces bon moments passés chez vous devant Koh-lanta le vendredi soir, un bon moyen de décompresser surtout dans les dernières semaines !

A l'ensemble de toute l'équipe et à mes co-internes de Saint-Philibert, Guillaume , Léa et Jeanne. Merci pour toutes ces parties de tarot le midi et à ton soutien Guillaume (ou plutôt un soutien collectif) pour toutes ces prises de tête sur notre thèse.

Je n'oublie pas non plus toutes les autres personnes que j'ai connu depuis le début de mon internat, avec qui j'ai fait de belles rencontres.

Merci à mes amis de la fac, Quentin, Simon, Juliette, Léa, Firas, Steeve, Florian, Dany, Clément, Nicolas... avec qui j'ai passé mes études de pharma et toutes ces soirées à vos côtés, je n'ai vraiment pas vu passer toutes ces années, j'ai vraiment hâte de vous revoir.

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai connu au collège et au lycée, Axel, Quentin, Hubert, Kévin, Lucas, Clara...même si ça commence à faire loin tout ça, je ne vous oublie pas pour autant!

Et je compte bien finir ces pages de remerciements pour ma famille, mes parents et mes deux frères Thibaut et Enzo, c'est toujours un vrai bonheur de revenir vous voir les week-end, d'autant plus que cette dernière année était particulièrement difficile. Je sais que sans vous je ne serais pas là actuellement, merci beaucoup, vous avez grandement contribué à la réussite de mes études. Je vous suis reconnaissant. Merci également à tout le reste de ma famille.

ABREVIATIONS

7-AAD : 7-aminoactinomycine-D
AA700 : APC-Alexa Fluor 700
AA750 : APC-Alexa Fluor 750
ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADCP : Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF488 : Alexa Fluor 488
AF647 : Alexa Fluor 647
AF700 : Alexa Fluor 700
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
APC : Allophycocyanine
ASCT : Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques
ASO-qPCR : Allele Specific Oligonucleotide-quantitative Polymerase Chain Reaction
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
BCMA : Antigène de maturation des cellules B
BrdU : Bromodésoxyuridine
BV510 : Brilliant Violet 510
CART-cells : Chimeric Antigen Receptor T-Cells
CD : Cluster de différenciation
CDC : Cytotoxicité dépendante du complément
CDR : Complementary Determining Region
CMF : Cytométrie en flux
CPTC : Cellule plasmotique tumorale circulante
CRAB : Hypercalcémie ; Insuffisance rénale ; Anémie ; Lésions osseuses
CRP : Protéine C réactive
CV : Coefficient de variation
DM4 : Dérivés de maytansinoïde de type 4
ECD : Phycoérythrine Texas Red
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
EEQ : Evaluation Externe de Qualité
EMA : Agence européenne des médicaments
ESCAA : Société Européenne d'Analyse Cellulaire Clinique
FDA : Food and Drug Administration
FDG : Fluorodésoxyglucose
FISH : Hybridation in situ par fluorescence
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FS : Forward Scatter
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HDAC : Histone désacétylase
HHV-3 : Human HerpesVirus 3
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
Ig : Immunoglobuline
IL-6 : Interleukine-6
IMF : Intensité moyenne de fluorescence
Imid : Immunomodulateur
IMWG : International Myeloma Working Group
IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4
IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISS : International Staging System
 KrOr : Krome Orange
 LDH : Lactate déshydrogénase
 LOD : Limit of Detection
 LOQ : Limit of Quantification
 MGG : May-Grünwald Giemsa
 MGUS : Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
 MM : Myélome multiple
 MPT : Melphalan – Prednisone – Thalidomide
 MRD : Minimal Residual Disease
 MSKCC : Memorial Sloan Kettering Cancer Center
 mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin
 NCI : National Cancer Institute
 NGF : Next Generation Flow
 NGS : Séquençage de nouvelle génération
 OS : Overall Survival
 PB : Pacific Blue
 PBS : Phosphate Buffered Saline
 PC5.5 : Phycoérythrine Cyanine 5.5
 PC7 : Phycoérythrine Cyanine 7
 PCA : Analyse en composantes principales
 PE : Phycoérythrine
 PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein Complex
 PFS : Progression Free Survival
 PMT : Photomultiplicateur
 RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand
 RC : Réponse complète
 RP : Réponse partielle
 Rd : Lénelidomide – Dexaméthasone
 SAB : Sérum Albumine Bovine
 SICC : Société Internationale de Cytométrie Clinique
 SlamF7 : Signaling lymphocyte activation molecule family member 7
 SNParray : Single Nucleotide Polymorphism array
 SRL : Special Reference Laboratories
 SS : Side Scatter
 SUV : Standard Uptake Value
 TBRP : Très bonne réponse partielle
 TEP : Tomographie par émission de positons
 VCD : Bortézomib – Cyclophosphamide – Dexaméthasone
 VMP : Bortézomib – Melphalan - Prednisone
 VTD : Bortézomib – Thalidomide - Dexaméthasone
 VS : Vitesse de sédimentation

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	13
ABREVIATIONS	17
SOMMAIRE	19
TABLE DES ILLUSTRATIONS	23
LE MYELOME MULTIPLE	25
1. Définition	25
2. Epidémiologie	25
A. Incidence	25
B. Survie	25
3. Facteurs de risques	26
4. Diagnostic	26
A. Circonstances de découverte	26
• Patients asymptomatiques (20% des cas)	26
• Patients symptomatiques	26
- Atteinte osseuse	26
- Atteinte rénale	27
- Hyperviscosité	27
- Manifestations neurologiques	27
- Autres symptômes	28
B. Bilan radiologique	28
C. Bilan biologique	29
• Examens biochimiques des protéines sériques et urinaires	29
• Créatininémie	31
• Calcémie	31
• Hémogramme	31
• Myélogramme	33
5. Critères diagnostiques dans le myélome	35
6. Facteurs pronostiques au diagnostic	36
A. Facteurs pronostiques liés à la masse tumorale	37
B. Facteurs pronostiques liés à la résorption osseuse	37
C. Facteurs pronostiques intrinsèques à la cellule tumorale	37
D. Classifications pronostiques	39
• Classification de Durie et Salmon	39
• <i>International Staging System (ISS)</i>	39
7. Bases thérapeutiques	40

A. Sujets éligibles à la greffe de cellules souches autologues	41
• Induction	41
• Intensification	42
• Consolidation	42
• Entretien	42
B. Sujets non éligibles à la greffe de cellules souches autologues	43
C. Traitement lors de la rechute	43
D. L'immunothérapie	43
E. Les CART-cells	45
• BCMA	45
• Autres antigènes	46
F. Traitements locaux et systémiques des complications	46
G. Orientations futures pour la thérapie du myélome multiple	46
H. Critères de réponse	47
LA MALADIE RESIDUELLE	51
1. Définition	51
2. Impact clinique	51
3. Intérêt de l'étude de la MRD dans le myélome multiple	52
A. La MRD, nouveau biomarqueur de substitution de la survie globale et de la survie sans progression	52
B. Incorporation du statut MRD dans la thérapeutique du myélome	53
C. Perspectives cliniques et orientations futures	54
D. Conclusion	55
4. Méthodes de détection	55
A. ASO-qPCR	56
B. Séquençage de nouvelle génération (NGS)	56
C. Méthode basée sur la cytométrie en flux	57
LA CYTOMETRIE EN FLUX	59
1. Le cytomètre	59
A. Système fluidique	59
B. Système optique	60
C. Système électronique	60
2. Réglages	61
A. Voltages des PMT	61
B. Contrôle du cytomètre en flux	61
C. Matrice de compensation	62
3. Anticorps et fluorochromes	62
A. Intérêt des anticorps	62
	20

B.	Qualités et défauts des fluorochromes utilisés	63
C.	L'effet bubble ou distorsion de signal	64
4.	Préparation et analyse d'un échantillon	65
A.	Préparation	65
B.	Principes d'analyse	65
	OBJECTIF	67
	ETUDE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE DANS LE MYELOME MULTIPLE : ETAT DE L'ART	69
1.	Aperçu de l'évolution des tests de cytométrie en flux dans le myélome	69
A.	Historique	69
B.	Expressions antigéniques des plasmocytes malins	70
2.	Echantillons	72
A.	Le choix de la source de l'échantillon	72
•	La moelle osseuse	72
•	Le sang périphérique	73
B.	Anticoagulant	74
C.	Conditions environnementales	75
3.	Traitement des échantillons	75
A.	La lyse érythrocytaire	75
•	Réactifs de lyse	76
B.	Le Ficoll	76
C.	La leucoconcentration	77
D.	La perméabilisation	77
E.	Conditions de marquage	79
4.	Conception des panels	80
A.	Choix des anticorps	80
B.	Choix des combinaisons fluorochromes-anticorps	80
C.	Panels validés pour l'étude de la MRD dans le myélome	81
•	Panel EuroFlow	81
•	Panel SRL-Flow (<i>Special Reference Laboratories</i>)	83
•	Panel MSKCC (<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>)	83
•	Autres panels	84
5.	L'acquisition	84
6.	Défis face à l'immunothérapie	85
A.	Problème du Daratumumab	85
B.	Problèmes des CART-cells	86
C.	Stratégie de gating ou marquage alternative	86
•	Anticorps intracytoplasmiques	86

- Anticorps anti-p63 (clone VS38c)	86
- Anticorps anti-IRF4	87
● Anticorps de surface	88
- Anticorps anti-CD38 multi-épitopes (CD38ME)	88
- Nanocorps JK-36	89
- Anticorps anti-CD229	90
- Anticorps anti-CD54	91
- Anticorps anti-SLAMF7	92
RESULTATS DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	93
1. Présentation du panel au laboratoire	93
A. Anticorps et fluorochromes choisis initialement	93
B. Méthode de marquage choisie	94
C. Tests à réaliser pour valider cette méthode	95
● Choix des anticorps	95
- Test de spécificité pour les anticorps de gating	95
- Tests de conditions minimales saturantes pour tous les anticorps	96
● Test de la combinaison	96
- Evaluation de la qualité de la matrice de compensation	96
- Test d'évaluation des fuites par soustraction d'un anticorps dans le panel	96
- Test de la conservation des prémix (Ac mélangés à l'avance)	97
● Test du marquage intracellulaire (pour chaque réactif de perméabilisation testé)	97
- Persistance des marquages de surface	97
- Evaluation de la mortalité des cellules	97
● Test de stabilité de l'échantillon	98
- Avant marquage (durée de conservation d'un échantillon non marqué)	98
- Après marquage (durée de conservation d'un échantillon marqué)	98
● Tests de performance de la technique	98
- Sensibilité	98
- Limite de détection / quantification	99
- Linéarité	100
- Reproductibilité intra-laboratoire	100
- Variabilité inter opérateur en analyse manuelle	101
- Comparaison avec une analyse automatisée	101
● Conclusion	101
D. Liste des éléments pertinents devant apparaître sur le compte rendu	101
DISCUSSION	103
CONCLUSION	107
BIBLIOGRAPHIE	108

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : lacunes multiples à l' "emporte-pièce" du crâne observées en radiographie (15)	28
Figure 2 : profil électrophorétique montrant un pic monoclonal dans la zone des gammaglobulines (17)	30
Figure 3 : immunofixation sérique révélant une IgG kappa monoclonale (17)	30
Figure 4 : frottis sanguin (MGG), montrant des hématies en rouleaux (23)	32
Figure 5 : plasmocytes matures dans le myélome multiple (MGG x400) (24)	33
Figure 6 : plasmocytes correspondant au sous-type lymphoplasmacytoïde (MGG x400)	34
Figure 7 : plasmoblastes (coloration MGG) (24)	34
Figure 8 : contour nucléaire irrégulier des plasmocytes (25)	35
Figure 9 : différents aspects des plasmocytes (coloration MGG x250) (24)	35
Figure 10 : approche schématique des thérapies initiales (40)	41
Figure 11 : survie selon le statut de la maladie résiduelle chez les patients en rémission complète après la consolidation (70)	52
Figure 12 : survie sans progression après consolidation selon le moment où la MRD est indétectable (70)	53
Figure 13 : scénarios possibles pour l'applicabilité clinique de la MRD dans le myélome (72)	54
Figure 14 : principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (74)	59
Figure 15 : principe de la focalisation hydrodynamique (75)	60
Figure 16 : exemple de recouvrement des spectres d'émission de fluorescence des différents fluorochromes nécessitant des compensations (BD Biosciences)	62
Figure 17 : compensation de la population PE faussement positive dans le canal 3 (Beckman Coulter)	64
Figure 18 : impact pronostique des CPTC sanguines sur la survie sans progression par la cytométrie en flux de nouvelle génération (84)	73
Figure 19 : impact pronostique au suivi des CPTC sanguines sur la survie sans progression par CMF (84)	74
Figure 20 : comparaison des niveaux d'expression des antigènes de surface de trois lignées cellulaires de myélome en utilisant les deux panels (94)	79
Figure 21 : comparaison des indices de coloration des CD38 en fonction des fluorochromes utilisés pour le marquage des plasmocytes normaux et malins (78)	81
Figure 22 : saturation du CD38 par le daratumumab visible en CMF (105)	85

Figure 23 : comparaison du panel standard au panel VS38c par cytométrie de patients sous daratumumab (107).....	87
Figure 24 : identification avec l'IRF4 des plasmocytes malins (noirs) des autres cellules (grises) chez un patient atteint de myélome multiple après un traitement par daratumumab (110).....	88
Figure 25 : évaluation comparative par cytométrie en flux de l'anti CD38-FITC (LD38) monoclonal (points gris foncé) et de l'anti CD38-FITC multi-épitopes (points rouges) chez un patient sous daratumumab (Cytognos).....	89
Figure 26 : caractéristiques avantageuses des anticorps à chaîne lourde de camélidés (111)	89
Figure 27 : détection par cytométrie de plasmocytes six semaines après l'arrêt du daratumumab avec un nanocorps (105)	90
Figure 28 : comparaison de la MFI du CD229 entre les plasmocytes et les autres cellules (93).....	91
Figure 29 : illustration de la corrélation entre les pourcentages de plasmocytes par différentes stratégies de gating (93)	91
Figure 30 : profils d'expression du CD54, du CD229 et du CD319 sur les plasmocytes d'un patient atteint d'un myélome multiple asymptomatique (113).....	92

Tableaux

Tableau 1 : critères diagnostiques du myélome multiple.....	36
Tableau 2 : classification de Durie et Salmon (36).....	39
Tableau 3 : système de stadification international révisé (38).....	40
Tableau 4 : distorsion du signal de chaque fluorochrome en fonction des canaux (Beckman Coulter).....	65
Tableau 5 : marqueurs les plus fréquemment utilisés pour la détection des phénotypes associés au myélome (78).....	71
Tableau 6 : conception du panel EuroFlow en six cycles d'essais consécutifs (101).....	82
Tableau 7 : récapitulatif des différents clones d'anticorps utilisés dans les études citées.....	84
Tableau 8 : présentation du projet de panel réalisé au laboratoire (les clones sont notés entre parenthèse).....	93

LE MYELOME MULTIPLE

1. Définition

Le myélome multiple, encore appelé maladie de Kahler, est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération et une accumulation anormale dans la moelle osseuse d'un clone cellulaire composé de plasmocytes sécrétant une immunoglobuline monoclonale complète ou incomplète dans le sérum et/ou dans l'urine. Cette prolifération clonale est souvent responsable de complications telles qu'une insuffisance rénale, ou encore de douleurs osseuses pouvant aller jusqu'à des fractures. Des formes asymptomatiques peuvent exister.

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

2. Epidémiologie

A. Incidence

Le myélome représente 1% de l'ensemble des cancers et environ 15% de l'ensemble des hémopathies malignes, la seconde derrière les lymphomes non hodgkiniens (1).

C'est une pathologie qui touche essentiellement le sujet âgé, avec une prédominance masculine (2). L'âge moyen au diagnostic est de 66 ans (3) et l'incidence est estimée à 7 cas pour 100 000 habitants (2), celle-ci augmentant en raison du vieillissement de la population et de l'amélioration des techniques de diagnostic. L'incidence du myélome multiple est plus élevée dans la population afro-américaine par rapport aux caucasiens, et elle est plus faible chez les individus asiatiques (4).

B. Survie

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour les patients chez qui a été diagnostiqué un myélome multiple. Cependant, l'introduction de nouvelles thérapies au cours des 10 à 20 dernières années a amélioré la survie relative des patients, qui approche désormais 50% à 5 ans dans la population générale et plus de 60% chez les patients diagnostiqués avant l'âge de 65 ans (5).

3. Facteurs de risques

La cancérogenèse du myélome multiple peut être favorisée par plusieurs facteurs environnementaux tels que l'exposition aux pesticides, aux radiations ionisantes ou par stimulation antigénique dans les infections chroniques (6).

De plus, chez certains patients, il existe une étape préalable de prolifération plasmocytaire appelée gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), qui se caractérise par de faibles concentrations d'immunoglobulines monoclonales. La probabilité de transformation vers le myélome multiple chez ces patients est de 1% par an (7).

De rares cas familiaux existent, faisant évoquer des facteurs de prédisposition génétique (8).

4. Diagnostic

A. Circonstances de découverte

- Patients asymptomatiques (20% des cas)

En l'absence de signes cliniques, le myélome multiple peut être suspecté au cours de la réalisation d'un examen sanguin systématique (vitesse de sédimentation élevée et CRP normale, numération sanguine, calcémie, électrophorèse des protéines sériques), d'un examen d'imagerie (radiographie, scanner, IRM...) ou tout simplement dans le cadre du suivi d'un MGUS.

- Patients symptomatiques
 - Atteinte osseuse

La plupart des patients atteints de myélome multiple développent des lésions osseuses, symptômes prédominants de cette maladie. Cela peut se traduire initialement par des douleurs osseuses retrouvées chez 60% des patients au diagnostic (9), et aboutir à terme à des fractures, des tassements vertébraux voire des compressions médullaires. Ces fractures sont associées à un risque plus élevé de décès de 32% par rapport aux patients sans fractures (10), notamment en raison de la perte de mobilité et d'indépendance fonctionnelle, un risque accru de thrombose veineuse profonde, ainsi qu'un risque de mortalité due à la chirurgie des fractures pathologiques.

- Atteinte rénale

L'atteinte rénale reste une complication grave affectant environ 20% des patients au diagnostic (11).

La principale cause est l'excès de chaînes légères libres monoclonales qui précipitent dans la lumière du tubule rénal sous forme de cylindres entraînant une néphropathie tubulo-interstitielle.

Dans les conditions physiologiques, ces chaînes légères libres produites par le plasmocyte sont filtrées par le glomérule puis réabsorbées au niveau du tubule proximal pour enfin être dégradées par le lysosome. Dans le myélome, ces plasmocytes malins produisent des chaînes légères libres en grande quantité, dépassant ainsi les capacités de réabsorption et de catabolisme. Ces chaînes vont précipiter au niveau du tubule distal sous forme de cylindres myélomateux, aboutissant ainsi à une obstruction tubulaire.

Cliniquement, l'atteinte rénale se manifeste par une insuffisance rénale aiguë, favorisée par des facteurs comme la déshydratation, les infections, l'hypercalcémie, les médicaments néphrotoxiques comme les AINS, ou encore le pH urinaire acide.

- Hyperviscosité

Complication rare, elle survient moins fréquemment que dans la maladie de Waldenström. L'augmentation de l'immunoglobuline monoclonale peut rendre le sang épais et visqueux, entraînant un défaut d'oxygénation tissulaire. L'hyperviscosité se manifeste par des céphalées, fatigue, insomnie, troubles de la vision, bourdonnements d'oreille, difficultés à respirer, oppression thoracique et peut aller jusqu'au coma.

- Manifestations neurologiques

Les os les plus touchés dans le myélome sont les vertèbres. Ces lésions peuvent être à l'origine de compressions de la moelle épinière, entraînant une faiblesse musculaire des membres inférieurs voire leur paralysie.

Une neuropathie périphérique est présente chez environ 20% des patients au diagnostic (12). Cela se traduit par une sensation de picotement, de brûlure, d'engourdissement au niveau des mains et des pieds.

La méningite myélomateuse reste exceptionnelle.

- Autres symptômes

On peut retrouver d'autres symptômes liés à l'hypercalcémie tels que l'asthénie, une faiblesse musculaire, une confusion, des troubles de la concentration, une déshydratation et la sensation de soif. L'hypercalcémie est la conséquence de la destruction osseuse par les ostéoclastes qui libèrent le calcium, et peut constituer un problème majeur si elle n'est pas traitée de façon appropriée.

Des maladies infectieuses peuvent survenir en raison de la production d'une immunoglobuline monoclonale qui ne joue plus son rôle dans le cadre du système immunitaire. Cette augmentation va entraîner parallèlement une diminution des anticorps physiologiques nécessaires à la défense de l'organisme contre les infections.

Ces signes sont plus souvent d'origine bactérienne et, sont particulièrement redoutés les septicémies, les pneumonies et les infections "opportunistes" survenant souvent après autogreffe. On retrouve principalement *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, les bacilles Gram négatif, HHV-3 et les virus de la grippe (13). La vaccination antigrippale est recommandée.

B. Bilan radiologique

L'évaluation de la maladie osseuse repose sur des radiographies conventionnelles détectant les lésions chez près de 80% des patients au moment du diagnostic (14). Les vertèbres, le crâne, la cage thoracique, le bassin, l'humérus et le fémur sont les sites les plus touchés. On recherche principalement des lacunes ovalaires, rondes, bien limitées et sans structure interne, de type « géode à l'emporte-pièce ».

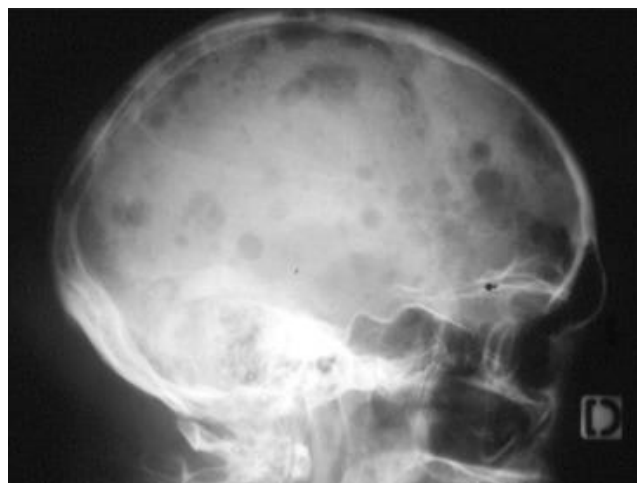


Figure 1 : lacunes multiples à l' "emporte-pièce" du crâne observées en radiographie (15)

Depuis, de nouvelles méthodes d'imagerie, notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP) au fluorodésoxyglucose (FDG), permettent de détecter des lésions focales de la moelle osseuse bien avant les radiographies conventionnelles (16).

C. Bilan biologique

Des examens biologiques complètent les examens cliniques et radiologiques pour établir un diagnostic de myélome multiple.

De plus, les examens biologiques ont un intérêt dans l'évaluation du pronostic, dans la prise de décision thérapeutique et pour préparer le suivi de la pathologie dans le cadre de l'évaluation de la réponse au traitement.

- Examens biochimiques des protéines sériques et urinaires

Le myélome multiple est caractérisé par la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale complète ou incomplète dans le sang et/ou les urines. Il est donc nécessaire de réaliser une électrophorèse des protéines sériques, une immunofixation des protéines sériques et urinaires et le dosage des chaînes légères libres sériques, afin de mettre en évidence la présence de cette immunoglobuline monoclonale.

Ces examens sont normaux chez certains patients (environ 2%) notamment dans le cadre des myélomes non sécrétants.

- Dosage des protéines sériques

Toute suspicion de myélome se traduira dans 85% des cas par une hyperprotidémie, reflétant la masse protéique circulante dans le myélome multiple. Dans 15% des cas, ces plasmocytes sécrètent des immunoglobulines monoclonales incomplètes, composées de chaînes légères libres : cela se traduit par une hypoprotidémie et plus précisément, une hypogammaglobulinémie.

- Electrophorèse des protéines sériques

La présence d'une gammopathie monoclonale dans le myélome se traduira par un pic monoclonal pointu, à base étroite, symétrique, en γ -globuline mais aussi en β - ou α 2-globuline.

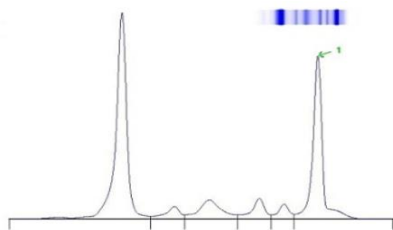


Figure 2 : profil électrophorétique montrant un pic monoclonal dans la zone des gammaglobulines (17)

- Immunofixation des protéines sériques

Elle va permettre de mettre en évidence et préciser l'isotype de l'immunoglobuline monoclonale. Elle est réalisée suite à la découverte d'un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques, d'une hypogammaglobulinémie ou de signes cliniques faisant évoquer une gammapathie monoclonale.

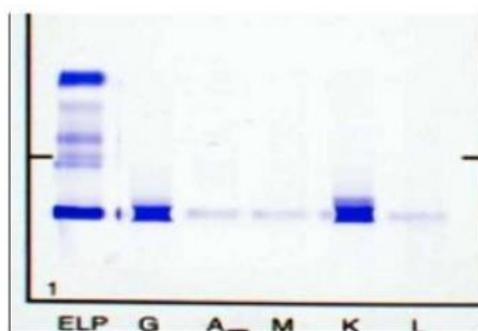


Figure 3 : immunofixation sérique révélant une IgG kappa monoclonale (17)

Chez les patients atteints de myélome multiple, 70% présentent une immunoglobuline monoclonale de type IgG, 20% de type IgA et 5 à 10% produisent uniquement des chaînes légères libres monoclonales. Les myélomes à IgM, IgE et IgD restent très rares (3).

- Dosage des chaînes légères libres sériques

Physiologiquement, il y a un léger excès de synthèse des chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes, qui se retrouvent dans le sang puis dans les urines. Dans le myélome, il y a également un excès de chaînes légères libres. Le dosage des chaînes légères libres kappa et lambda (par immunonéphélométrie ou immunoturbidimétrie) va permettre, en combinaison avec l'électrophorèse et l'immunofixation, de s'affranchir des dosages sur les urines de 24 heures. De plus, ces chaînes légères libres sériques ont un impact pronostique péjoratif dans toutes les gammapathies. Enfin, ce dosage va permettre une surveillance des patients atteints de myélome non sécrétant ou oligosécrétant (18).

- Examen des urines

L'électrophorèse des protéines urinaires permet de mettre en évidence une protéinurie de Bence Jones (constituée de chaînes légères libres kappa ou lambda).

Cette analyse est complétée par une immunofixation afin de préciser le type de chaîne légère (2/3 des patients produisent des chaînes légères libres kappa) (3).

- Créatininémie

La fonction rénale peut être évaluée par la concentration sérique de créatinine. L'IMWG (*International Myeloma Working Group*) considère une atteinte de la fonction rénale dans le diagnostic du myélome multiple comme un taux de créatinine sérique supérieur à 177 $\mu\text{mol/L}$ (2 mg/dL) ou une clairance de la créatinine inférieure à 40 ml/min (19). 20% des patients nouvellement diagnostiqués présentent une atteinte significative de la fonction rénale (20).

- Calcémie

L'hypercalcémie est la complication métabolique la plus courante du myélome et survient chez environ un tiers des patients. Elle peut être à l'origine d'un risque de décès par troubles du rythme cardiaque. L'IMWG considère l'hypercalcémie comme significative dans le diagnostic du myélome comme un taux de calcium sérique supérieur de plus de 0.25 mmol/L (1 mg/dL) à la limite supérieure des valeurs normales, ou supérieur à 2.75 mmol/L (11 mg/dL) (19).

Elle reflète d'une part l'augmentation de la résorption osseuse par les ostéoclastes stimulés par diverses cytokines, mais aussi le défaut de la filtration glomérulaire, où la fonction rénale chez ces patients est souvent altérée, dépassant les capacités rénales à éliminer l'excès de calcium (21).

- Hémogramme

- Anémie

Le plus souvent normochrome et normocytaire, c'est une complication fréquente dans le myélome. Elle est initialement présente chez environ 73% des patients (3).

L'IMWG considère l'anémie comme significative dans le diagnostic du myélome comme un taux d'hémoglobine inférieur de plus de 2 g/dL à la limite inférieure des valeurs normales ou un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL (19).

Celle-ci est liée à l'infiltration des plasmocytes dans la moelle osseuse, conduisant à une réduction des précurseurs érythroïdes, à un déficit en érythropoïétine, notamment chez les patients présentant une insuffisance rénale, et à l'augmentation de l'hépcidine régulant négativement le fer lors d'une inflammation chronique. Les traitements comme la radiothérapie ou encore une fausse anémie par hémodilution en cas de forte protidémie peuvent aussi entraîner une anémie.

- Thrombopénie

L'infiltration des plasmocytes dans la moelle osseuse peut être aussi responsable d'autres cytopénies comme une thrombopénie inférieure à 100 G/L, mais cela reste assez rare (8%) (22). L'apparition de cette cytopénie aggrave le pronostic, reflétant une importante masse tumorale.

- Neutropénie

On observe une neutropénie chez environ 10% des patients (22), notamment dans les formes évoluées, sans être associée à des infections graves. Elle ne nécessite donc pas de traitement.

- Vitesse de sédimentation (VS)

La présence d'une immunoglobuline monoclonale peut induire une accélération de la VS (> 50 mm), se traduisant sur le frottis par l'apparition d'hématies sous forme de rouleaux. La VS peut être normale dans le myélome non sécrétant ou lorsque la protéine monoclonale ne précipite qu'à basse température.

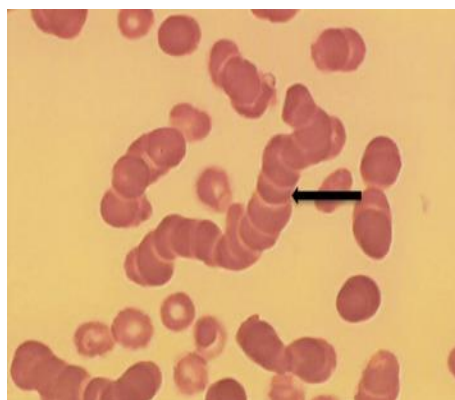


Figure 4 : frottis sanguin (MGG), montrant des hématies en rouleaux (23)

- Myélogramme

- Plasmocytose médullaire

Le myélogramme est nécessaire pour établir le diagnostic. Dans un échantillon de moelle osseuse, nous allons pouvoir mettre en évidence une infiltration plasmocytaire représentant plus de 10% des éléments nucléés, mais ce critère est insuffisant pour établir un diagnostic. Chez certains patients, il peut y avoir moins de 10% de plasmocytes en raison de l'hémodilution ou d'une répartition hétérogène des plasmocytes. En revanche, une plasmocytose supérieure à 60% dans la moelle est suffisante pour établir un diagnostic de myélome.

- Morphologie plasmocytaire

- Variations morphologiques selon le stade de maturation

De nombreuses morphologies plasmocytaires peuvent être observées dans une moelle osseuse.

Tout d'abord, on retrouve le myélome multiple à plasmocytes matures, dans 40 à 50% des cas, qui correspond à des cas de myélome présentant une majorité de plasmocytes d'apparence matures (chromatine mature, absence de nucléole, présence d'un archoplasme) et une minorité de plasmocytes nucléolés (24).

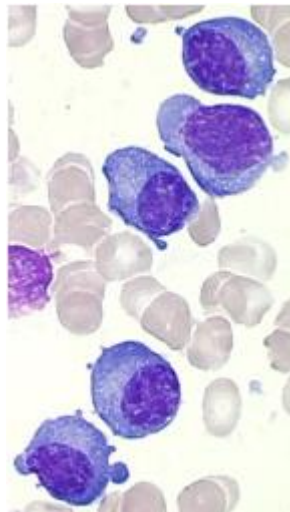


Figure 5 : plasmocytes matures dans le myélome multiple (MGG x400) (24)

Dans 5 à 15% des cas, le cytoplasme peut être réduit, avec un rapport nucléocytoplasmique élevé (> 0.6) : on parle de myélome multiple lymphoplasmacytoïde (figure 6).

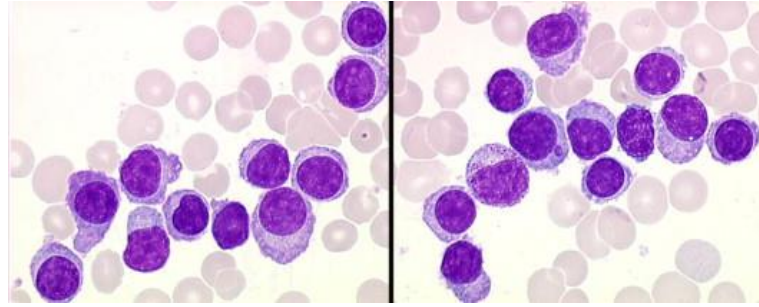


Figure 6 : plasmocytes correspondant au sous-type lymphoplasmacytoïde (MGG x400) (24)

Enfin, dans 2 à 3% des cas, les plasmocytes peuvent correspondre à des plasmoblastes, caractérisés par un rapport nucléo-cytoplasmique supérieur à 0,6, un noyau volumineux, une chromatine finement dispersée, un nucléole proéminent central et un cytoplasme basophile (figure 7).

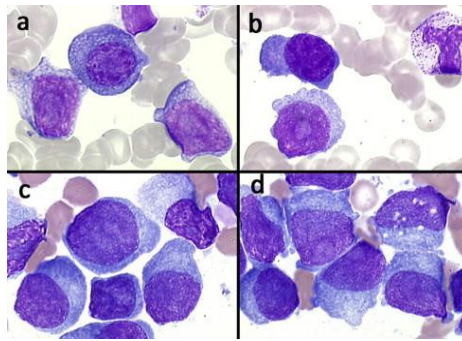


Figure 7 : plasmoblastes (coloration MGG) (24)

➤ Anomalies nucléaires

On peut observer des anomalies morphologiques au niveau du noyau, comme un contour nucléaire irrégulier, prenant une forme de bulle, d'haltère ou de trèfle. Ces anomalies nucléaires sont assez spécifiques du myélome.

D'autres anomalies comme la présence d'un nucléole, d'une chromatine immature et d'une perte de l'archoplasme sont fréquemment retrouvées. Elles reflètent plutôt une immaturité globale et elles sont liées à une maladie plus avancée et à un pronostic défavorable (24).

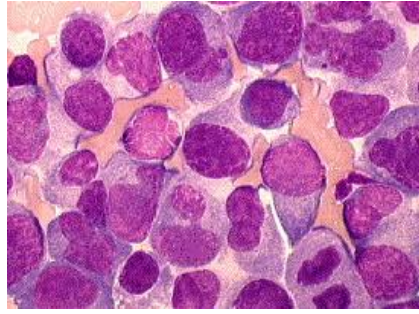


Figure 8 : contour nucléaire irrégulier des plasmocytes (25)

➤ Anomalies cytoplasmiques et de la membrane externe

Ces anomalies ne sont pas spécifiques du myélome. On peut par exemple observer des plasmocytes avec un cytoplasme très rouge, résultant d'une anomalie dans la structure de la fraction glucidique des molécules d'IgA avec une forte teneur en hydrates de carbone, donnant un aspect « flammé » à ces cellules (26).

Des plasmocytes peuvent aussi présenter des inclusions sphériques de couleurs bleu pâle, gris, rose ou souvent incolores au sein du cytoplasme voire du noyau (=cellules de Mott).

Plus rarement, on peut retrouver des inclusions en forme d'aiguilles allongées, minces, dispersées ou regroupées en faisceaux, souvent incolores.

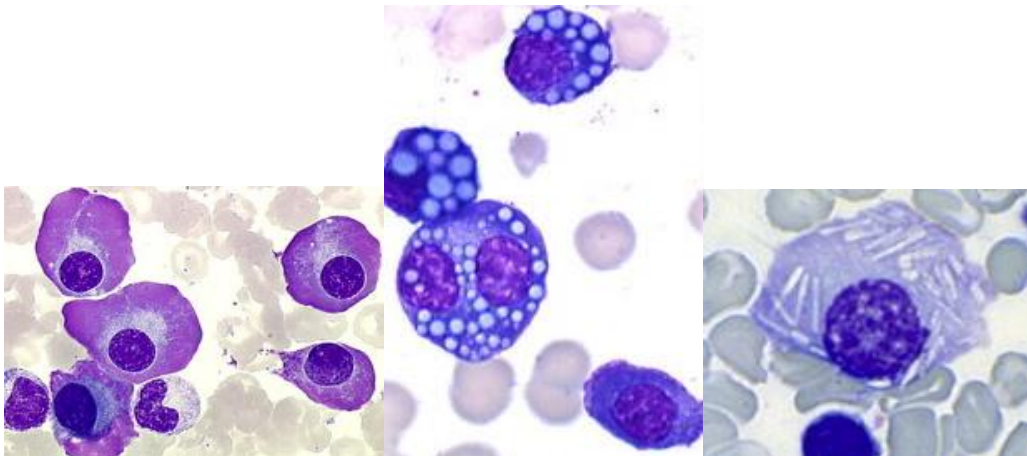


Figure 9 : différents aspects des plasmocytes (coloration MGG x250) (24)

5. Critères diagnostiques dans le myélome

Devant ces signes clinico-radio-biologiques rencontrés dans le myélome, l'IMWG a décidé d'actualiser les critères diagnostiques en 2014 (19), en mettant à jour les seuils de certains paramètres biologiques, notamment la créatinine sérique, et en

incluant trois biomarqueurs diagnostiques associés aux caractéristiques du CRAB (tableau 1), qui sont :

- Une plasmocytose médullaire clonale supérieure ou égale à 60%.
- Un rapport de chaînes légères libres impliquées/non impliquées supérieur ou égal à 100.
- La présence de deux lésions ou plus à l'IRM.

Plasmocytose médullaire clonale $\geq 10\%$ (ou plasmocytome osseux ou extra-médullaire)	
ET	
Une ou plusieurs atteinte(s) organique(s) liée à l'infiltration tumorale (critères CRAB)	
Hypercalcémie	Calcium sérique > 1 mg/dL (> 0.25 mmol/L) au-dessus de la limite supérieure de la normale ou > 11 mg/dL (> 2.75 mmol/L)
Insuffisance rénale	Clairance de la créatinine < 40 mL/min ou créatinine sérique > 2 mg/dL (> 177 μ mol/L)
Anémie	Hémoglobine < 10 g/dL ou > 2 g/dL sous la limite inférieure de la normale
Lésions osseuses	Une ou plusieurs lésions ostéolytiques sur les radiographies du squelette, le scanner ou le TEP-Scanner
ET/OU	
Au moins un biomarqueur de malignité	
Plus de 1 lésion focale à l'IRM (de diamètre supérieur à 5 mm)	
Plasmocytose médullaire $\geq 60\%$	
Rapport de chaînes légères libres impliquées/non impliquées ≥ 100	

Tableau 1 : critères diagnostiques du myélome multiple

La mise en place de nouveaux médicaments permet de prolonger la durée de survie chez les patients asymptomatiques en intervenant précocement. Ces trois biomarqueurs sont donc nécessaires pour identifier un sous-ensemble de patients atteints de myélome multiple indolent, ne présentant encore aucun critère CRAB mais qui sont à risque imminent de progression.

D'autre part, la révision des critères CRAB va permettre l'utilisation de meilleures méthodes de détection des complications osseuses et des localisations extra-médullaires comme la tomodensitométrie, l'IRM, la TEP, ainsi qu'une meilleure estimation des lésions rénales en utilisant la clairance de la créatinine.

6. Facteurs pronostiques au diagnostic

Le myélome multiple reste une pathologie incurable, avec une médiane de survie de 4 à 5 ans. Cependant, certains patients peuvent vivre plus de dix ans en raison de l'amélioration de la prise en charge. Cette variabilité de la survie va

dépendre de l'hétérogénéité de la biologie cellulaire du myélome, mais aussi des facteurs liés à l'hôte. La recherche de ces différents paramètres va permettre de stratifier les patients de manière fiable, avec une meilleure évaluation initiale et un meilleur suivi.

A. Facteurs pronostiques liés à la masse tumorale

Ces facteurs comprennent l'isotype de la chaîne lourde et du taux de l'immunoglobuline monoclonale, le taux d'hémoglobine, la calcémie, l'étendue des lésions osseuses et une plasmocytose médullaire élevée (de l'ordre de 30% en cytologie et de 15% en cytométrie (27)).

Puis, d'autres paramètres ont été identifiés comme la β 2-microglobuline, exprimée à la surface des plasmocytes malins. Sécrétée dans le sérum puis éliminée par voie rénale, elle est le reflet de la masse tumorale. Cependant, l'augmentation de sa concentration sérique est fortement influencée par l'insuffisance rénale, elle-même reconnue comme facteur pronostique péjoratif dans le myélome (28).

Plus récemment, d'autres marqueurs ont été décrits, comme le syndécan-1 (CD138), où des taux sériques élevés sont associés à une survie significativement plus courte. Toutefois, ce marqueur n'est pas utilisé en pratique courante (29).

B. Facteurs pronostiques liés à la résorption osseuse

L'étendue des lésions osseuses fait partie des facteurs pronostiques essentiels. Elle se base sur l'analyse de radiographies osseuses évaluant l'ensemble du squelette. Devant les nombreuses variations interindividuelles des analyses radiologiques, ce facteur est remplacé par l'étude d'autres paramètres comme l'hypercalcémie, qui reflète en partie l'activité des ostéoclastes.

C. Facteurs pronostiques intrinsèques à la cellule tumorale

- Le degré de prolifération des plasmocytes

Parmi ces facteurs, on retrouve le degré de prolifération (habituellement faible) des plasmocytes, inversement corrélé à la survie. L'étude de ce paramètre par cytométrie en flux est difficile, car cela nécessite une analyse immédiate après le prélèvement.

- Cytologie plasmoblastique

Les patients atteints de myélome multiple avec présence de plasmocytes de morphologie immature atteignent plus facilement des rémissions, mais leur survie globale est diminuée (30).

- La CRP

Un taux sérique élevé de CRP est associé à un mauvais pronostic (31). L'IL-6 produite par le microenvironnement médullaire stimule la synthèse de cette protéine, et donc cette dernière reflète l'activité de la cytokine.

- L'albumine

Sur ce même mécanisme, on peut citer l'albumine. En cas de myélome, les cytokines produites par la tumeur inhibent la production d'albumine dans le foie, entraînant une baisse du taux sérique de cette dernière.

- La LDH

Synthétisée par les cellules en prolifération, un taux sérique élevé de la lactate déshydrogénase (LDH) est associé à une survie globale plus courte, et peut également être un indicateur de maladie extra-médullaire (32).

- Anomalies chromosomiques

L'analyse cytogénétique des plasmocytes est le principal facteur pronostique lié à la cellule tumorale, mais son étude est difficile pour plusieurs raisons (faible index prolifératif et faible infiltrat des plasmocytes dans les prélèvements). Des techniques comme l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) des plasmocytes malins triés, la SNParray (*Single Polymorphism array*) ou le séquençage de nouvelle génération (NGS) sont des techniques nécessaires pour détecter ces anomalies chromosomiques.

Les anomalies numériques sont plus fréquentes que les anomalies structurales, le myélome variant hyperdiploïdie est associé à un bon pronostic.

Concernant les anomalies structurales, les deux principales anomalies à rechercher sont la délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)) et la translocation t(4 ;14), qui sont associées à un pronostic défavorable en termes de survie sans progression et de survie globale (33). D'autres anomalies peuvent être recherchées comme la translocation t(14 ;16) et la translocation t(11 ;14) (34).

- Autres hémopathies

Enfin, la survenue d'une autre hémopathie comme une leucémie aiguë ou un syndrome myélodysplasique secondaire a un effet péjoratif. L'étude de Maia (35) a démontré que près de 12% des patients au moment du diagnostic de myélome présentaient un syndrome myélodysplasique, indépendamment associé à une survie globale et à une survie sans progression plus courte.

D. Classifications pronostiques

La combinaison de plusieurs facteurs pronostiques a permis de classer les myélomes en plusieurs catégories de pronostics.

- Classification de Durie et Salmon

La classification de Durie et Salmon de 1975 a été la première méthode pour évaluer le pronostic des patients (36). C'est une classification en trois stades, basée sur la masse tumorale. Plusieurs paramètres radiologiques et biologiques y figurent (tableau 2). Elle reste peu utilisée aujourd'hui car son intérêt pronostique est limité notamment dans la catégorisation des lésions osseuses, le nombre de lésions osseuses sur les radiographies étant dépendant de l'observateur.

I	Hemoglobin > 10 g / dL
	IgG < 5 gm / dL
	IgA < 3 gm / dL
	Normal Calcium
	M protein in urine < 4 g / 24 hours
	None or an osteolytic lesion
II	Criteria intermediate between I and II
III	Hemoglobin < 8.5 g / dL
	IgG > 7 g / dL
	IgA > 5 g / dL
	Serum calcium > 12 mg / dL
	M protein in urine > 12 g / 24 hours
Subclassification	Multiple osteolytic lesions
A	creatinine < 2 mg / L
B	creatinine ≥ 2 mg / dL

Tableau 2 : classification de Durie et Salmon (36)

- *International Staging System (ISS)*

Un système de stadification simple, fiable, peu coûteux, appliqué à l'échelle internationale a été développé en 2005 (37). Il est basé sur deux déterminations

facilement réalisables dans les laboratoires, le taux de $\beta 2$ -microglobuline et le taux d'albumine. Ce système définit trois groupes avec des pronostics différents. Cette classification a été révisée en 2015 (*Revised International Staging System, r-ISS*), en y intégrant les anomalies cytogénétiques comme la t(4 ;14), la t(14 ;16) et la del(17p), ainsi que la lactate déshydrogénase (tableau 3).

	Critères	Fréquence (%)	Survie à 5 ans (%)
Stade I	$\beta 2m < 3,5 \text{ mg/l}$ et Albumine $\geq 35 \text{ g/l}$ Absence d'anomalie cytogénétique de haut risque LDH normale	28	82
Stade II	Aucun critère du stade I ou III	62	62
Stade III	$\beta 2m \geq 5,5 \text{ mg/l}$ Anomalie cytogénétique de haut risque LDH augmentée	10	40

Tableau 3 : système de stadification international révisé (38)

7. Bases thérapeutiques

Le myélome reste une maladie incurable qui rechute même en cas de réponse prolongée après une thérapie initiale.

Avec le développement de nombreuses molécules ces dernières années, sept classes thérapeutiques sont actuellement approuvées par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) dans le traitement du myélome multiple : les corticoïdes, les inhibiteurs du protéasome, les immunomodulateurs (Imid), les agents alkylants, les inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC), les anticorps monoclonaux et les CART- cells (*Chimeric Antigen Receptor T-Cells*).

Le traitement est initié chez les patients qui présentent des symptômes imputables au myélome ou des biomarqueurs de malignité. Les patients asymptomatiques ne doivent pas être mis sous traitement, mais ils doivent être surveillés, car le risque de progression vers un myélome symptomatique (10% par an) reste assez élevé au cours des cinq premières années (39).

Le but de la thérapie initiale est de contrôler le processus néoplasique et d'empêcher la survenue de complications.

Différentes stratégies vont être employées, selon que le patient soit éligible à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou non (figure 10).

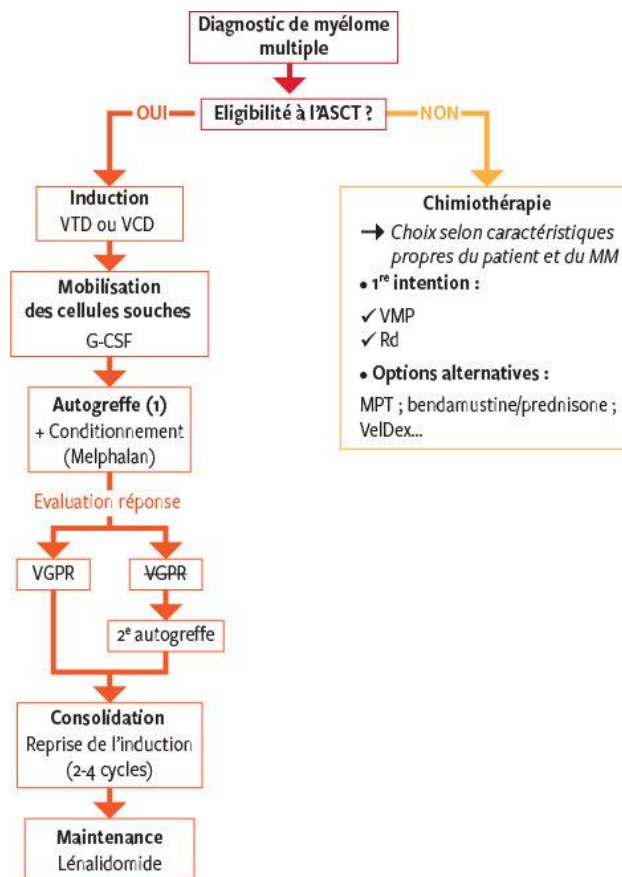


Figure 10 : approche schématique des thérapies initiales (40)

A. Sujets éligibles à la greffe de cellules souches autologues

L'absence de comorbidités et un état général conservé sont les critères de sélection clés pour une autogreffe de cellules souches (ASCT) qui, en général, est réalisée chez les patients jeunes (< 65 à 70 ans).

Cette thérapie, par rapport aux traitements conventionnels dans le myélome, a l'avantage de prolonger considérablement la survie des patients, mais ses effets sont très toxiques. Ainsi, des critères d'admissibilité sont nécessaires, comme un âge jusqu'à 65-70 ans, l'absence de dysfonction cardiaque, pulmonaire, rénale ou hépatique (41).

• Induction

Il s'agit de la première phase du traitement du myélome multiple. Le but est de réduire le nombre de plasmocytes dans la moelle osseuse et le taux d'immunoglobulines monoclonales produites par les plasmocytes. Ce traitement dure plusieurs mois, de 3 à 6 cycles et comporte une association de 2 ou 3

médicaments (un inhibiteur du protéasome, un immunomodulateur et un glucocorticoïde). Le traitement d'induction de référence reste l'association bortézomib - lénalidomide (ou le thalidomide) - dexaméthasone (VRD). Mais depuis, de nombreux schémas thérapeutiques ont été étudiés, notamment le remplacement du bortezomib par le carfilzomib qui a montré d'excellents résultats en phase 2 (42).

Le recueil des cellules souches s'effectue après le traitement d'induction et avant la phase d'intensification, en utilisant des facteurs de croissance granulocytaires seuls ou en combinaison avec une cure d'Endoxan au préalable (43).

- Intensification

Il s'agit d'un traitement à base de Melphalan à haute dose (200 mg/m²) avant la transplantation de cellules souches autologues (44). Il est possible d'effectuer une double transplantation, améliorant nettement la survie globale chez les patients qui n'ont pas une très bonne réponse partielle (diminution de 90% du taux sérique de paraprotéine) après une transplantation (45).

- Consolidation

Un traitement de consolidation est administré après la greffe de cellules souches. Par une chimiothérapie de courte durée, ce traitement va permettre de réduire la charge tumorale après la greffe et d'améliorer la profondeur de la réponse. L'association bortezomib-thalidomide-dexaméthasone a montré un bénéfice (46), mais des effets toxiques importants comme la polyneuropathie périphérique, et une résistance au traitement par le thalidomide sont souvent rencontrés, d'où un traitement court (47).

- Entretien

Il est réalisé suite à une greffe de cellules souches, mais aussi après un traitement d'induction chez les patients non greffés. Le médicament est administré à faible dose sur une longue période (2 ans), afin de maintenir le patient en rémission et de prévenir la récurrence. De plus, ceci permet la réduction des effets indésirables et une amélioration de la qualité de vie du patient. Le lénalidomide semble être la meilleure thérapie, avec un bénéfice sur la survie globale et la survie sans progression (48). Une étude de phase III étudie

l'utilisation de l'ixazomib dans le traitement d'entretien, qui pourrait être utilisé en cas d'intolérance au lénalidomide (49).

B. Sujets non éligibles à la greffe

Le traitement standard consiste en plusieurs cycles d'une association incluant un agent immunomodulateur (lénalidomide) ou un inhibiteur du protéasome (bortézomib), en combinaison avec un glucocorticoïde (dexaméthasone) et un agent alkylant (melphalan). Deux combinaisons ont montré une efficacité équivalente : lénalidomide-dexaméthasone et lénalidomide (à dose réduite) - bortezomib – dexamethasone (50,51).

C. Traitement lors de la rechute

Le choix du traitement va dépendre de plusieurs facteurs notamment l'âge, la fonction rénale, les comorbidités...

Pour les patients jeunes, on peut reprendre le traitement au cours de la phase d'induction, mais souvent le choix se porte sur un inhibiteur du protéasome de seconde génération (carfilzomib, ixazomib,) ou vers une deuxième autogreffe.

Pour les patients âgés, il est préférable de changer de classe médicamenteuse, en privilégiant une association de deux molécules plutôt que trois afin de minimiser la toxicité. La durée du traitement est généralement plus longue.

D. L'immunothérapie

L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui consiste à utiliser les défenses immunitaires d'un patient pour lutter contre sa maladie.

Le daratumumab (Darzalex ®), anticorps monoclonal de type IgG1 anti-CD38, est responsable d'une activité antiproliférative et d'une déplétion des lymphocytes T régulateurs (52). Son mécanisme passe par une cytotoxicité dépendante du complément (CDC), une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et une phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP).

Il est actuellement utilisé en monothérapie (en dernière ligne de traitement) pour le traitement des patients en rechute et réfractaires ; en association à une

bithérapie (légalidomide et dexaméthasone ou bortézomib et dexaméthasone) chez les patients ayant reçu au moins un traitement antérieur ; et en association à une trithérapie (bortézomib, melphalan et prednisone) en première ligne de traitement chez les patients nouvellement diagnostiqués et non éligibles à une autogreffe de cellules souches. Cette dernière association a montré un bénéfice spectaculaire sur la survie globale, avec une réduction de 40% du risque de décès sur une période de 3 ans (53).

L'isatuximab (Sarclisa ®), un autre anticorps monoclonal anti-CD38, a reçu une approbation de la Commission européenne pour le traitement du myélome multiple, en association avec le pomalidomide et la dexaméthasone chez les patients en rechute et réfractaires, ayant reçu au moins deux traitements antérieurs incluant le légalidomide et un inhibiteur du protéasome. Son mécanisme d'action passe aussi par une CDC, une ADCC et une ADCP. Son approbation repose sur des résultats positifs d'un premier essai clinique de phase III randomisé (ICARIA-MM) (54).

L'élotuzumab (Empliciti ®) est un anticorps monoclonal de type IgG1 ciblant la protéine SlamF7 (*Signaling lymphocyte activation molecule family member 7*), qui est présente à la surface des plasmocytes, des monocytes, des lymphocytes T, B et NK. Il inhibe l'adhésion des plasmocytes aux cellules stromales de la moelle osseuse en stimulant les lymphocytes NK ou par un phénomène d'ADCC (55). Il est utilisé en combinaison au légalidomide et la dexaméthasone chez les patients atteints de myélome ayant déjà reçu au moins un traitement.

L'indatuximab ravtansine (nBT062) est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD138, lié à des dérivés de maytansinoïdes DM4. Ce dernier a des propriétés antimitotiques, en perturbant le réseau des microtubules, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose. Il est actuellement en cours d'évaluation dans les essais cliniques. Il a été démontré qu'une monothérapie par l'indatuximab inhibe significativement la croissance des plasmocytes malins in vivo et prolonge la survie de l'hôte (56).

Le belantamab mafodotin est un anticorps monoclonal de type IgG1 dirigé contre l'antigène de maturation des cellules B (BCMA) couplé au monométhyl auristatin

F (agent antimétabolique). Il dispose actuellement d'une ATU pour les patients triple-réfractaires. Le principal effet indésirable est la survenue de kératopathies de grade III (57).

E. Les CART-cells

Les CART-cells sont des lymphocytes T génétiquement modifiés par des technologies d'ingénierie cellulaire, dotés d'un récepteur spécifique qui reconnaît les cellules malignes exprimant l'antigène cible. Il existe actuellement 4 générations différentes de CART-cells :

- Les CAR de première génération sont constitués d'un domaine extra-membranaire de liaison à l'antigène tumoral, composé des domaines variables de chaîne lourde et de chaîne légère, d'un linker transmembranaire et d'un domaine d'activation intracellulaire dérivé du CD3ζ.
- Les CAR de seconde et troisième génération comportent respectivement un et deux domaines de costimulation (CD28, 4-1BB ou OX40) pour promouvoir la survie et la prolifération de ces cellules.
- Les CAR de quatrième génération (cellules « CAR T blindées »), produisent des cytokines qui améliorent la fonction de ces cellules ou modifient le micro-environnement tumoral.

Plusieurs antigènes sont à l'étude dans des essais précliniques et cliniques :

- BCMA

Il joue un rôle important dans la pathogenèse du myélome. Son niveau d'expression est plus élevé sur les plasmocytes malins par rapport aux plasmocytes normaux. Il a un rôle dans la prolifération, la survie, la résistance aux médicaments, et un rôle dans l'immunothérapie par la production d'anticorps anti-BCMA suite aux perfusions de lymphocytes de donneur chez les patients atteints de myélome après une greffe allogénique.

Le premier essai clinique de phase I chez l'homme (NCT02215967) a analysé quatre niveaux de doses de ces CART-cells chez les patients en rechute ou réfractaires. Plus de la moitié des patients ont obtenu une très bonne réponse partielle, avec une survie médiane sans événements de 31 semaines. De meilleures réponses ont été associées à des taux élevés de CART-cells et à une diminution de BCMA.

Plusieurs autres essais cliniques de phase I, de phase II voire de phase III (NCT03651128) sont actuellement en cours.

- **Autres antigènes**

Plusieurs autres cibles d'antigènes sont à l'étude dans le cadre d'une thérapie avec des CART-cells, notamment le CD19 (NCT02794246), SLAMF7 (NCT03710421), (NCT04142619), le CD138 (NCT03196414), le CD38 (NCT03464916), le CD56...

F. Traitements locaux et systémiques des complications

En cas d'atteinte osseuse, les bisphosphonates (zolédronate, pamidronate) représentent le traitement de référence, en complément d'antalgiques de palier 2 voire 3. Le denosumab (antagoniste de RANKL) a également reçu une approbation pour la prophylaxie des atteintes squelettiques chez les patients nouvellement diagnostiqués.

On peut également avoir recours à la radiothérapie si les douleurs sont résistantes aux dérivés morphiniques. Le recours à la chirurgie est nécessaire en cas de fractures.

Pour les patients ayant une anémie, l'érythropoïétine peut être utilisée.

Une hydratation alcaline est recommandée mais en revanche, les médicaments néphrotoxiques et l'injection d'iode sont à éviter, afin de prévenir les complications néphrologiques.

Enfin, la vaccination antigrippale et les vaccinations contre le pneumocoque et *Haemophilus influenzae* sont recommandées afin de prévenir les infections.

G. Orientations futures pour la thérapie du myélome multiple

Des études récentes ont montré que l'association lors des essais de phase II et III entre l'ixazomib (inhibiteur du protéasome), le daratumumab, le lénalidomide et la dexaméthasone a montré une excellente efficacité et une toxicité minimale (58,59).

Une autre étude de phase II très encourageante étudie l'association entre le carfilzomib, le lénalidomide, la dexaméthasone et le daratumumab (60), et a montré qu'environ 80% des patients atteignent une maladie résiduelle négative sans augmentation significative des toxicités et sans utiliser une dose élevée.

D'autres thérapies se développent actuellement, comme par exemple :

- Le temsirolimus (inhibiteur de mTOR) qui est évalué en association avec le bortézomib chez les patients en rechute et réfractaires (61).
- Le sorafénib qui cible la voie Ras / Raf / MEK / ERK, actuellement en phase I et II (62).
- Le vénétoclax (anti-Bcl2) qui a démontré une efficacité en monothérapie chez les patients récidivants et réfractaires avec une translocation t (11;14) (63).
- Le sélinexor (inhibiteur de XPO1) en association avec la dexaméthasone à faible dose, a démontré une efficacité chez les patients atteints de myélome réfractaire à tous les traitements couramment utilisés (64).
- L'AMG 420 est un anticorps bispécifique qui lie le BCMA et le CD3. Il est actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase I (65) et a montré des résultats encourageants.

H. Critères de réponse

Les critères de réponse ont été initialement développés afin de comparer l'efficacité de chaque nouvelle classe dans les essais cliniques, mais aussi d'évaluer la réponse au traitement et de pouvoir détecter la rechute le plus précocement possible. Ces critères de réponse définis par l'IMWG (66) se basent sur l'évaluation sérique et urinaire des protéines monoclonales, ainsi que sur l'évaluation de la plasmocytose médullaire. Six catégories de réponse existent:

- Une réponse complète stricte « sCR » (*stringent complete response*) :
 - RC tel que définie ci-dessous.
 - Et un ratio des chaînes légères libres normal.
 - Et une absence de plasmocytes malins en immunohistochimie ou en cytométrie en flux à 2-4 couleurs.
- Une réponse complète RC (*complete response*) :
 - Immunofixation négative du sérum et de l'urine.
 - Et une plasmocytose médullaire inférieure à 5%.
 - Et une disparition de tout plasmocytome des tissus mous.
- Une très bonne réponse partielle TBRP (*very good partial response*) :
 - Détection de l'immunoglobuline monoclonale dans le sérum et les urines par immunofixation mais non à l'électrophorèse.

- Ou diminution d'au moins 90% de l'immunoglobuline monoclonale sérique avec une immunoglobuline monoclonale urinaire inférieure à 100mg/24h.
- Une réponse partielle RP (*partial response*) :
 - Diminution d'au moins 50% de l'immunoglobuline monoclonale sérique avec une diminution d'au moins 90% de l'immunoglobuline monoclonale urinaire.
 - Et diminution d'au moins 50% de la taille des plasmocytomes des tissus mous si présents initialement.
- Une maladie stable MS :
 - Lorsque les critères RC, TBRP, RP ou MP ne sont pas remplis.
- Une maladie progressive MP :
 - Augmentation d'au moins 25% de l'immunoglobuline monoclonale sérique et/ou de l'immunoglobuline monoclonale urinaire.
 - 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.

Le traitement du myélome a considérablement changé au cours de la dernière décennie, avec l'introduction de nouvelles classes thérapeutiques efficaces, ce qui a considérablement amélioré le taux et la profondeur de la réponse. Ainsi, de nouvelles catégories de réponse doivent être définies pour identifier des réponses plus profondes que celles classiquement définies comme réponses complètes. De nouvelles approches se sont concentrées à l'identification des cellules tumorales résiduelles dans la moelle osseuse, comme le séquençage des gènes, la cytométrie en flux, ou encore des techniques d'imagerie pour détecter la présence d'une maladie résiduelle (MRD) en dehors de la moelle osseuse. En combinant ces nouvelles méthodes, l'IMWG a, en 2016 (67), défini de nouvelles catégories de réponse qui sont :

- MRD négative prolongée : MRD négative dans la moelle osseuse (par NGS et / ou par CMF) et sur l'imagerie; contrôlée à 1 an.

- MRD négative en CMF : absence de clone phénotypiquement anormal dans la moelle osseuse analysée en CMF utilisant une technique ayant une sensibilité $\geq 10^{-5}$.
- MRD négative en NGS : absence de clone dans la moelle osseuse en NGS ; la présence d'un clone étant définie par le séquençage d'au moins 2 reads identiques par une plateforme ayant une sensibilité $\geq 10^{-5}$.
- MRD négative moelle et imagerie : MRD négative dans la moelle osseuse (par NGS et / ou par CMF avec une sensibilité $\geq 10^{-5}$) ou diminution de la valeur d'absorption standardisée inférieure au médiastin ou diminution inférieure aux tissus mous environnants.

Les anciennes techniques de surveillance de la maladie sont insuffisantes pour faire la distinction entre les patients à haut risque de rechute imminente et ceux chez qui une rémission durable est attendue. Les nouvelles techniques ont permis aux cliniciens et aux chercheurs d'évaluer la MRD avec une spécificité et une sensibilité remarquable. L'étude de la MRD mène à plusieurs objectifs qui seront détaillés dans le chapitre suivant.

LA MALADIE RESIDUELLE

1. Définition

Lors d'un traitement cytotoxique dans une hémopathie comme le myélome, le taux de plasmocytes malins va diminuer, jusqu'à l'obtention chez le patient d'une rémission cytologique complète, caractérisée par la présence de moins de 5% de plasmocytes résiduels sur le myélogramme.

Cependant, les patients peuvent rechuter après cette rémission. Ceci s'explique par la persistance jusqu'à 10^9 à 10^{10} plasmocytes malins chez le patient, représentés sous le terme de maladie minimale résiduelle (*minimal residual disease*, MRD).

L'évaluation cytologique est limitée par la persistance de plasmocytes normaux, et n'est généralement fiable que lorsque les taux de plasmocytes anormaux atteignent 5% de la cellularité médullaire totale. De plus, la distinction entre plasmocytes normaux et malins peut être difficile (40-50% des plasmocytes malins sont de morphologie normale). La rémission cytologique complète seule est donc insuffisante pour une stratification précise du risque chez les patients atteints de myélome. Des techniques plus sensibles, comme la biologie moléculaire et la cytométrie en flux, ont donc été développées pour l'étude de la maladie résiduelle, permettant la détection des plasmocytes jusqu'à une cellule sur 10^5 , voire une sur 10^6 , selon leur sensibilité.

2. Impact clinique

Plutôt qu'attendre que les patients rechutent pour initier un traitement, traiter les patients présentant une maladie résiduelle va permettre de prendre de l'avance sur la maladie par rapport à un traitement plus tardif lors de la rechute. En effet, le nombre de cellules malignes est susceptible d'être corrélé à la complexité clonale, et donc à la probabilité de résistance subclonale à une ou plusieurs thérapies.

De plus, un nombre minimal de cellules malignes peut être moins efficace dans le processus de remodelage du microenvironnement, de reprogrammation des cellules hématopoïétiques et d'induction des niches chimio-protectrices. Par conséquent, certains médicaments peuvent être plus efficaces contre la maladie

résiduelle que contre la maladie au moment de la rechute clinique. Enfin, la tolérance aux médicaments ayant des effets secondaires importants est meilleure qu'au moment de la rechute (68). Les objectifs de l'étude de cette MRD seront d'évaluer l'efficacité et la réponse au traitement, de prévoir le risque de rechute, et donc d'adapter le traitement si nécessaire.

Une corrélation entre l'obtention d'une maladie résiduelle indétectable et une survie améliorée a été démontrée dans plusieurs études indépendamment du type de traitement (69).

3. Intérêt de l'étude de la MRD dans le myélome multiple

A. La MRD, nouveau biomarqueur de substitution de la survie globale et de la survie sans progression

L'étude de Paiva (70) a évalué la valeur pronostique du suivi de la maladie résiduelle par cytométrie en flux de nouvelle génération chez des patients atteints de myélome multiple au diagnostic, après induction (six cycles de VRD), au 100^{ème} jour après la phase d'intensification (chimiothérapie à haute dose et autogreffe de cellules souches) et après la phase de consolidation avec le VRD.

Cette étude s'est intéressée à deux paramètres cliniques :

- La survie sans progression (PFS), définie ici comme le temps écoulé entre la consolidation jusqu'à la progression de la maladie ou le décès.
- La survie globale (OS), définie ici comme le temps écoulé entre la consolidation et le décès quelle qu'en soit la cause.

Dans cette étude, les patients qui ont obtenu une rémission complète avec une MRD indétectable avaient une survie sans progression et une survie globale bien meilleures que ceux ayant une MRD détectable après la phase de consolidation (figure 11).

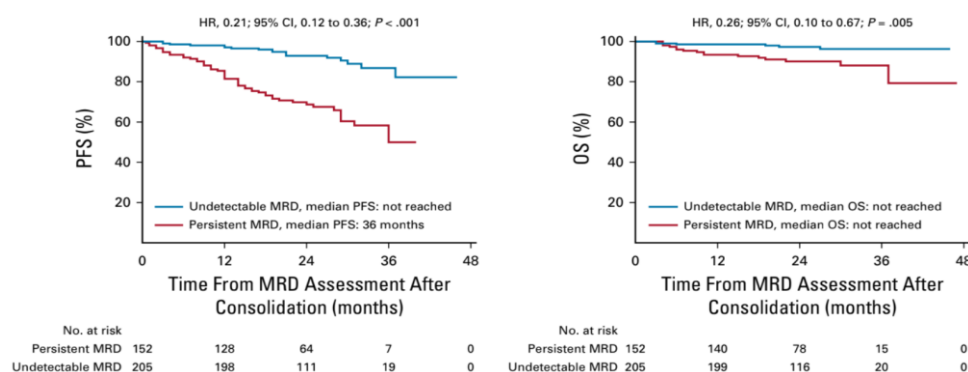


Figure 11 : survie selon le statut de la maladie résiduelle chez les patients en rémission complète après la consolidation (70)

L'impact du statut MRD est également intéressant chez les patients à haut risque : avec une maladie résiduelle indétectable à une sensibilité de 10^{-5} à 10^{-6} , il n'y avait aucune différence significative pour le taux de survie sans progression et le taux de survie globale à 36 mois chez ces patients en fonction du stade ISS. Chez les patients à haut risque, l'atteinte d'une maladie résiduelle indétectable avec une technique de cytométrie en flux beaucoup plus sensible a surmonté le mauvais pronostic.

B. Incorporation du statut MRD dans la thérapeutique du myélome

Alors que l'évaluation de la MRD est importante pour prédire le risque de progression de la maladie ou de rechute, elle peut être également importante dans les futures décisions de traitement en pratique clinique, telles que la poursuite ou l'arrêt du traitement sur la base de la positivité ou de la négativité de la MRD respectivement.

• Le traitement d'intensification

Dans cette même étude, il n'y avait aucune différence en termes de survie sans progression pour les patients qui ont atteint une MRD négative et qui ont reçu un traitement d'intensification (chimiothérapie à haute dose et autogreffe) contre ceux qui n'ont pas reçu cette thérapie (figure 12). Ces données suggèrent l'hypothèse que les patients capables d'atteindre une MRD négative après le traitement d'induction peuvent ne pas avoir besoin d'un traitement d'intensification. Le statut de la MRD pourrait donc être utilisé pour décider entre une approche basée sur la transplantation ou une approche non basée sur la transplantation.

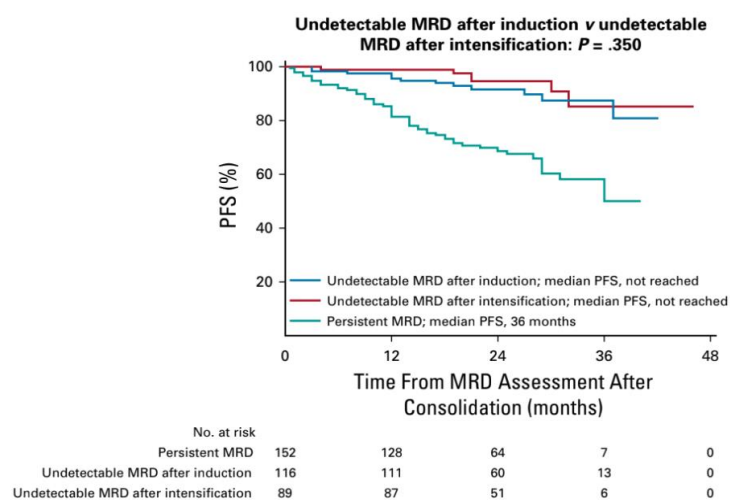


Figure 12 : survie sans progression après consolidation selon le moment où la MRD est indétectable (70)

- Le traitement d'entretien

Une autre question concerne la durée optimale d'un traitement d'entretien après induction / transplantation chez les patients avec une MRD négative.

À travers cette étude, plusieurs patients (17%) sont passés d'une maladie résiduelle détectable à indétectable, en particulier pendant la première année d'entretien, et aucun n'a connu une progression de la maladie. D'autres études récentes (71) confirment ce passage d'une MRD détectable à indétectable chez une grande proportion de patients (34%) avec des résultats sur la survie qui n'étaient pas significativement différents entre ces patients et ceux qui ont commencé cette période d'entretien avec une MRD négative.

Lorsqu'un patient peut maintenir une MRD négative persistante (au moins 2 points de MRD négative à 1 an d'intervalle), on peut alors envisager un arrêt du traitement afin de limiter l'exposition à un traitement inutile et de réduire le risque de tumeurs malignes secondaires et d'autres effets indésirables, en particulier chez les patients âgés et fragiles. En revanche, chez les patients dont la MRD devient positive, une modification du traitement d'entretien ou une intensification du traitement peut être envisagée. Cette stratégie est illustrée sur la figure ci-dessous.

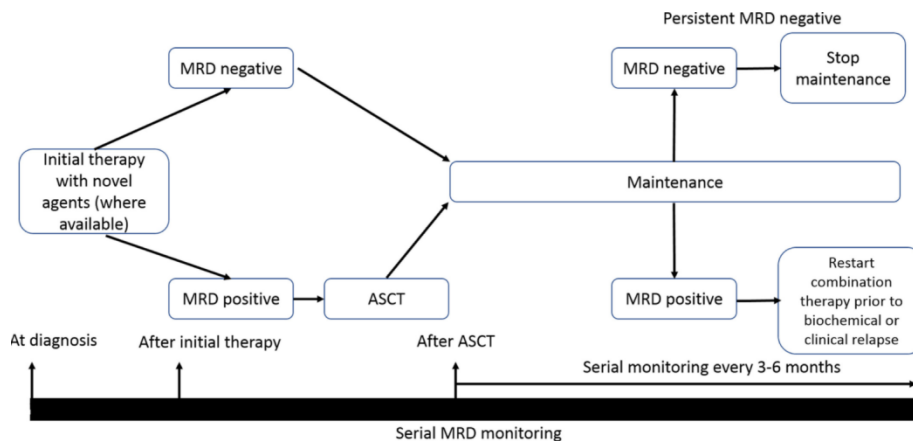


Figure 13 : scénarios possibles pour l'applicabilité clinique de la MRD dans le myélome (72)

C. Perspectives cliniques et orientations futures

Comme la MRD est un facteur prédictif de la survie sans progression et de la survie globale, ce biomarqueur peut être considéré comme marqueur de substitution pour l'évaluation des essais cliniques et l'approbation réglementaire de nouveaux médicaments. Avec l'augmentation de la survie globale et de la survie sans progression due à l'introduction de nouvelles thérapies contre le

myélome, l'obtention des résultats définitifs des essais cliniques basés sur les décès peut prendre un temps considérable, retardant l'approbation des médicaments ou des combinaisons de traitements nécessaires.

En résumé, de nombreuses questions se posent dans la pratique clinique :

- Peut-on se passer de l'autogreffe chez les patients MRD- après induction ?
- Peut-on envisager une fenêtre thérapeutique ou un arrêt de traitement ?
- La double autogreffe permettrait-elle d'augmenter le taux de MRD- chez les patients MRD+ ?
- Le moment ou la rapidité avec laquelle la maladie résiduelle devient indétectable a-t-elle de l'importance ?

L'essai clinique en cours (NCT04221178) au Centre de cancérologie Memorial Sloan Kettering déterminera si l'arrêt du traitement d'entretien chez les patients atteints de myélome avec une MRD négative pendant au moins 3 ans a le même effet sur le contrôle de la maladie que la poursuite de ce traitement.

Un autre essai clinique en cours (SWOG S1803) du Groupe d'oncologie du sud-ouest étudie si le statut de la MRD après 2 ans d'entretien avec le lénalidomide ou le daratumumab + le lénalidomide peut guider l'arrêt ou la poursuite du traitement en fonction du statut MRD.

D. Conclusion

Les progrès extraordinaires réalisés dans le domaine de la thérapeutique du myélome remettent en question les anciennes techniques d'évaluation de la réponse au traitement. L'évaluation de la MRD par la CMF a prouvé sa pertinence en tant qu'outil de pronostic. Toutefois, son adoption en tant qu'outil de prise de décision soulève plusieurs questions.

4. Méthodes de détection

L'évaluation de la MRD est basée sur des techniques mettant en évidence un marqueur tumoral retrouvé fréquemment et de manière spécifique dans la tumeur.

La technique doit répondre à plusieurs conditions (73) :

- Avoir une sensibilité d'au moins 10^{-5} .
- Avoir une bonne spécificité, afin d'éviter les faux-positifs.

- Avoir une bonne stabilité entre le diagnostic et la rechute.
- Avoir une applicabilité à un grand nombre de patients.
- Être facilement réalisable en routine hospitalière.
- Avoir une rapidité de rendu des résultats compatible avec la prise en charge du patient.
- Avoir un coût acceptable.

La biologie moléculaire et la cytométrie en flux sont les deux techniques répondant plus ou moins à ces conditions et sont utilisées pour évaluer la maladie résiduelle.

A. ASO-qPCR

Les méthodes de biologie moléculaire comme l'ASO-qPCR (*Allele Specific Oligonucleotide-quantitative Polymerase Chain Reaction*) sont basées sur la réaction en chaîne par polymérase qui identifie les cellules tumorales grâce à l'amplification des réarrangements des gènes codant pour la partie variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline clonale (VDJ-IgH). Dans cette approche, une amorce oligonucléotidique spécifique d'allèle, complémentaire de la partie variable, est associée à une amorce consensus. Cette technique apporte des informations qualitatives et quantitatives, si les amorces sont couplées à une sonde fluorescente pour suivre l'amplification en temps réel. La sensibilité est de l'ordre de 10^{-5} copies/mL.

B. Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Ici, tous les réarrangements complets et incomplets des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines sont amplifiés par PCR en deux étapes puis séquencés, et la fréquence de chaque clonotype est calculée avec un seuil arbitraire fixé à 5%, utilisé comme cible pour détecter la maladie résiduelle dans les échantillons de suivi du patient.

Les avantages de l'apport du NGS par rapport à l'ASO-qPCR sont :

- Une détection de la MRD plus rapide car il ne nécessite pas l'utilisation d'amorces spécifiques au patient, et il n'y a pas besoin d'utiliser une courbe standard pour la quantification de la maladie résiduelle.
- La sensibilité de cette technique est de l'ordre de 10^{-6} (1 cellule tumorale pour au moins 1 000 000 cellules nucléées) en théorie.

- L'applicabilité du NGS dans l'étude de la maladie résiduelle du myélome multiple est plus élevée que celle de l'ASO-qPCR.
- Enfin, en analysant tous les réarrangements, il est possible de détecter des sous-clones, et donc de suivre l'évolution clonale en espérant la détection d'une reconstitution immunitaire oligoclonale lors de l'obtention d'une réponse profonde.

Néanmoins, cette technique reste encore limitée à certains laboratoires et il n'existe pas de standardisation internationale concernant la conception expérimentale et l'interprétation des résultats du NGS dans la maladie résiduelle.

C. Méthode basée sur la cytométrie en flux

La cytométrie en flux va permettre de mettre en évidence des antigènes de surface ou intracytoplasmique grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques marqués par des fluorochromes. Sur la base des antigènes exprimés par la cellule, mais aussi sur des caractéristiques de taille et de structure, cette méthode va permettre d'identifier et quantifier les plasmocytes malins parmi les autres cellules de l'échantillon.

La cytométrie en flux multiparamétrique reste l'outil standard pour évaluer la maladie résiduelle dans le myélome de par son applicabilité à tous les patients, son coût relativement faible, sa rapidité d'exécution et sa disponibilité dans la majorité des laboratoires. De plus, la sensibilité de ce test augmente avec les performances techniques des derniers appareils.

Néanmoins cette technique reste difficile à mettre au point, nécessitant des échantillons frais et un grand nombre de cellules à analyser, l'existence de problèmes de reproductibilité entre les différents laboratoires ainsi que l'arrivée de nouveaux traitements comme l'immunothérapie qui impactent l'analyse.

LA CYTOMETRIE EN FLUX

1. Le cytomètre

La cytométrie en flux est une technique biologique qui permet l'étude qualitative et quantitative de particules isolées en suspension entraînées par une gaine de liquide dans l'analyseur. Elle se compose d'un système fluide, un système optique et un système électronique (figure 14).

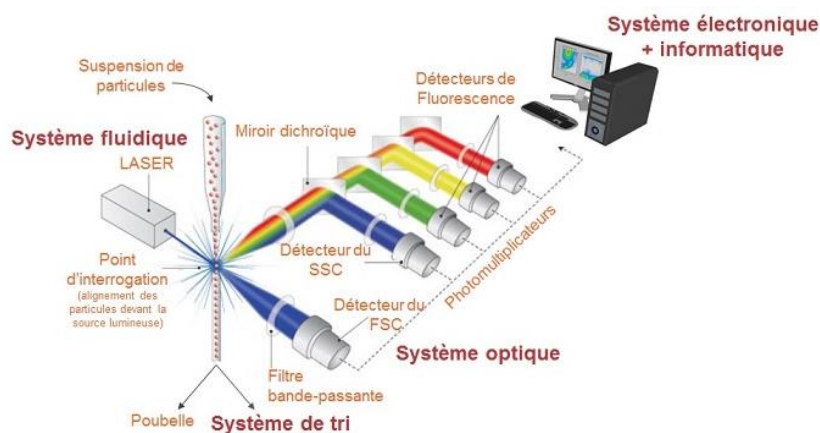


Figure 14 : principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (74)

A. Système fluide

Ce système est basé sur la focalisation hydrodynamique : il va entraîner les particules en suspension les unes après les autres devant une ou plusieurs sources d'excitations (en exerçant une pression sur l'échantillon, le liquide de gaine et celui de l'échantillon ne se mélangeront pas). Le liquide de gaine va alors entraîner une accélération du liquide de l'échantillon qui s'étire, ce qui provoque l'alignement des cellules qu'il contient les unes derrière les autres à l'entrée de la chambre d'analyse, afin qu'elles passent exactement devant le laser (figure 15).

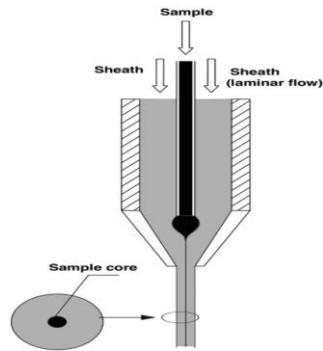


Figure 15 : principe de la focalisation hydrodynamique (75)

B. Système optique

Il implique une source lumineuse composée d'un ou plusieurs lasers, comme les lasers violet (405nm), les lasers bleu (laser argon, 488 nm) qui sont les plus utilisés, et les lasers rouge (633 nm). Ces lasers se composent d'une lumière monochromatique qui excite un ou plusieurs fluorochromes à une longueur d'onde donnée. En appliquant plusieurs lasers, on peut ainsi utiliser un éventail plus large de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes. On peut utiliser de 8 à 13 fluorochromes différents en même temps selon les machines actuellement utilisées en biologie clinique, et donc étudier l'expression de ce nombre d'antigènes au sein d'une cellule.

Quand une particule traverse le faisceau lumineux, la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille de la cellule (FS=Forward Scatter) et la lumière réfléchie mesurée sur le côté (SS=Side Scatter) donne une mesure de la structure de la cellule. La présence de filtres et de miroirs dichroïques permet d'adresser les rayonnements émis sur les détecteurs dédiés.

C. Système électronique

Les détecteurs sont des tubes photomultiplicateurs (PMT) qui transforment et amplifient la lumière reçue en un signal électrique compris entre 0 et 10 volts, puis un convertisseur analogico-numérique les transforme en des signaux digitaux.

2. Réglages

A. Voltages des PMT

Les voltages des photomultiplicateurs sont souvent réglés à l'aide d'un échantillon de cellules non marquées, de telle sorte que les cellules apparaissent dans la première décade pour chaque fluorochrome mesuré. Quand le voltage appliqué aux PMT augmente, le signal fluorescent est de plus en plus séparé du bruit de fond, offrant une plus grande résolution du signal positif. En outre, la tension idéale doit permettre au signal de fluorescence des cellules d'être vu sur la même échelle numérique. Si la tension est réglée trop au-dessus de la tension idéale, les signaux faibles seront toujours bien séparés de l'arrière-plan, mais les signaux forts de fluorescence peuvent sortir de l'échelle. Inversement, si la tension est réglée en dessous de la tension idéale, cela entraînera très probablement une détection compromise des signaux faibles, qui seront mal séparés des événements négatifs.

La détermination des tensions doit être effectuée si les filtres, PMT, lasers ou fluorochromes sont changés, mais aussi pour des types de cellules significativement différents, pour des panels anticorps-fluorochrome et pour des protocoles significativement différents (marquage de surface par rapport au marquage intracellulaire par exemple).

B. Contrôle du cytomètre en flux

Un contrôle journalier de la stabilité optique et fluidique du cytomètre est nécessaire pour s'assurer de la constance au cours du temps d'une intensité de signal donnée. Il est fait grâce à l'utilisation de billes de contrôle qualité avec lesquelles on va pouvoir vérifier deux paramètres essentielles :

- Les billes Flow-Check : elles vont permettre l'ajustement et/ou la vérification de l'alignement des systèmes optiques et fluidiques de l'appareil.
- Les billes Flow-Set : elles vont permettre la vérification quotidienne de la conservation du niveau d'intensité de fluorescence.

C. Matrice de compensation

La plupart des fluorochromes utilisés en cytométrie en flux multiparamétrique ont des spectres d'émission de fluorescence assez larges. Si deux fluorochromes ont des spectres d'émission qui se chevauchent, un détecteur va reconnaître les photons émis par les deux molécules, induisant une interférence dans l'interprétation des résultats (figure 16).

Cependant, la proportion de débordement de fluorescence captée par un détecteur voisin par rapport à l'émission de fluorescence détectée par le PMT est constante pour chaque fluorochrome, et donc elle peut être calculée et soustraite mathématiquement (ce sont les compensations de fluorescence). Cette compensation est appliquée après l'acquisition des données. Une matrice de compensation complète est calculée par un logiciel, sur la base de l'ensemble des cellules monomarquées, puis elle est appliquée aux données mesurées soit via le logiciel d'analyse, soit via l'instrument lui-même.

Il est impératif que les calculs de compensation soient réalisés après le réglage des voltages des PMT, car le degré de compensation requis dépend de ces derniers. Néanmoins, certains cytomètres ont la capacité d'ajuster automatiquement les paramètres de compensation lorsque les voltages PMT sont modifiés.

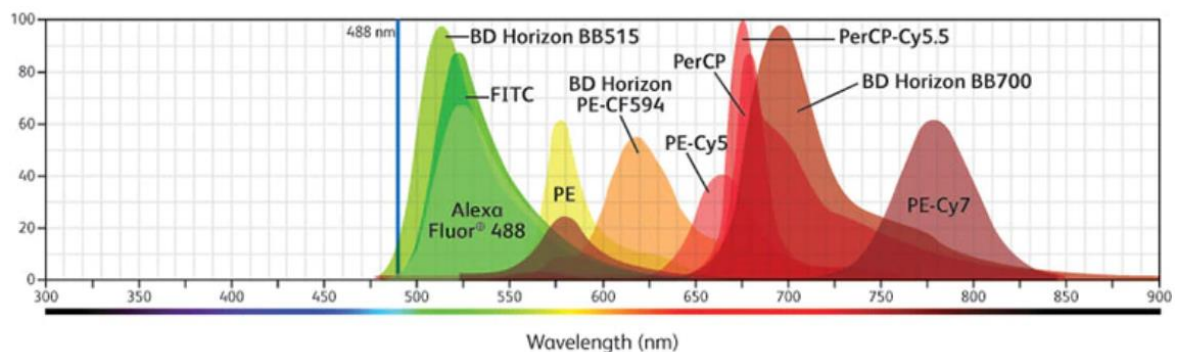


Figure 16 : exemple de recouvrement des spectres d'émission de fluorescence des différents fluorochromes nécessitant des compensations (BD Biosciences)

3. Anticorps et fluorochromes

A. Intérêt des anticorps

Il existe deux catégories d'anticorps :

- Les anticorps primaires, directement couplés à un fluorochrome.
- Les anticorps secondaires, utilisés pour le marquage indirect avec un anticorps primaire non couplé.

En sélectionnant un anticorps, le type monoclonal ou polyclonal doit aussi être considéré.

Par leur propriété de se fixer de façon stable et spécifique sur des molécules, les anticorps peuvent détecter la présence d'un antigène de surface ou intracytoplasmique sur une cellule. En se fixant sur l'épitope, un simple lavage élimine les anticorps non fixés ce qui permettra lors du passage sur le cytomètre de révéler la fixation spécifique à l'antigène.

Le nombre de clones d'anticorps et de fournisseurs ne cesse d'augmenter, ce qui permet de faire de plus en plus de panels différents mais en contrepartie la diversité des anticorps augmente et devient plus complexe de déterminer quelle combinaison de clones d'anticorps, de fluorochromes et de fournisseurs choisir. De plus, certains anticorps ne sont pas disponibles avec le fluorochrome désiré, ou alors plusieurs clones d'anticorps existent pour un même antigène.

B. Qualités et défauts des fluorochromes utilisés

Il existe trois groupes de fluorochromes :

- Les fluorochromes organiques.
- Les fluorochromes protéiques.
- Les fluorochromes conjugués : un fluorochrome organique couplé à un fluorochrome protéique.

Le fluorochrome optimal doit avoir un profil de fluorescence correspondant à la configuration optique de l'instrument.

Les principales caractéristiques qui décrivent les performances du fluorochrome et contribuent à son utilité dans un panel comprennent :

- Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence.
- Le coefficient d'extinction (la capacité à absorber la lumière) et le rendement quantique (le rapport entre le nombre effectif de photons émis et le nombre de photons absorbés) compris entre 0,1 et 1. Le produit de ces deux paramètres détermine la brillance.
- Les chevauchements d'émission de fluorescence avec les fluorochromes voisins.
- La stabilité du conjugué anticorps-fluorochrome.
- La durée de vie de la fluorescence.

De plus, le fluorochrome sélectionné doit être disponible pour une grande liste d'anticorps et doit avoir une sensibilité limitée aux autres réactifs utilisés lors des

procédures préanalytiques (solutions de lyse des érythrocytes, perméabilisant cellulaire...), à l'exposition à la lumière, à la température et au pH. Par exemple, les fluorochromes en tandem comme APC-Cy7 et PE-Cy7 peuvent se dégrader en raison du traitement de l'échantillon (exposition à la lumière ou à des températures élevées) et conduisent à des problèmes de compensation en émettant de façon inhabituelle aux longueurs d'ondes des autres détecteurs (APC et PE).

C. L'effet bubble ou distorsion de signal

Les méthodes de compensation ne permettent pas toujours une compensation parfaite des cytomètres multiparamétriques. Après compensation, il est possible d'observer un étalement du signal entraînant une dispersion plus grande des données (effet de « trompette ») que celle observée pour les cellules négatives. Ceci entraîne un chevauchement de la population négative qui peut être confondu avec une population faiblement positive (figure 17). Cette distorsion peut être estimée en mesurant la déviation standard de la fuite avant compensation et en la comparant avec la déviation standard de la population négative au niveau de la médiane de fluorescence de la population négative.

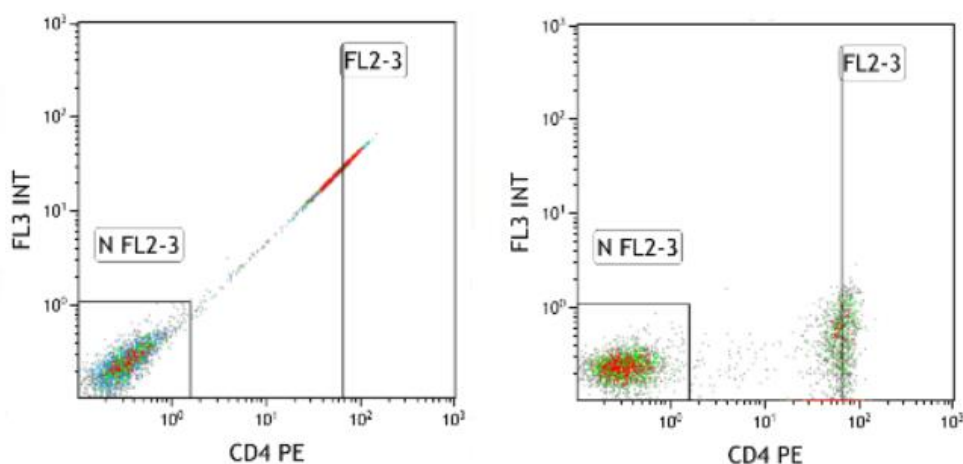


Figure 17 : compensation de la population PE faussement positive dans le canal 3 (Beckman Coulter)

Pour que l'on constate de la distorsion, il faut qu'il y ait de la fuite. Chaque fluorochrome est testé dans chaque canal et une matrice est obtenue (tableau 4). Cette matrice doit être utilisée pour chaque combinaison de marquages, afin de connaître ce problème. Ce phénomène de distorsion s'observe plus particulièrement avec les fluorochromes APC-Alexa700 (FL6 et FL8), PC5.5 (FL5

et FL7) et APC (FL7) et il n'est limitable que par le choix des antigènes ciblés par ces couleurs lors de la constitution d'un panel d'anticorps.

	FACTEUR DE DISTORSION (sd de la fuite/sd négatif)									
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PacB	KrOr
FL1		1.00	1.00	1.22	1.00	1.00	1.00	1.00	1.11	1.00
FL2	1.42		1.36	1.38	1.38	1.00	1.15	1.00	1.00	1.17
FL3	1.30	5.25		1.00	1.00	1.00	1.20	0.70	1.00	1.00
FL4	1.00	3.14	6.00		1.25	1.00	2.00	1.00	1.14	1.00
FL5	1.00	3.00	3.40	7.86		1.00	2.80	1.60	1.00	1.00
FL6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		10.91	2.53	1.70	1.00
FL7	1.00	1.00	1.00	12.00	1.80	7.33		3.86	1.00	1.00
FL8	1.00	1.00	1.00	4.00	6.14	4.17	13.50		1.00	1.00
FL9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00

Tableau 4 : distorsion du signal de chaque fluorochrome en fonction des canaux (Beckman Coulter)

4. Préparation et analyse d'un échantillon

A. Préparation

Le sang et la moelle osseuse sont les prélèvements les plus courants en cytométrie, mais il est possible de travailler sur d'autres liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, liquide pleural et liquide bronchoalvéolaire).

Ces prélèvements sont acheminés dans des tubes avec un anticoagulant comme l'héparinate de sodium ou l'EDTA.

Une ou plusieurs étapes de lyse sont réalisées afin d'éliminer les globules rouges pouvant être une source d'interférence dans l'analyse.

Le marquage par les anticorps doit tenir compte du rapport entre le nombre d'anticorps et le nombre de sites antigéniques à marquer : un nombre peu élevé en sites antigéniques peut engendrer des résultats faussement positifs par fixation non spécifique de l'excès d'anticorps, et un nombre élevé en sites antigéniques peut engendrer des résultats faussement négatifs par manque d'anticorps, aboutissant à un signal moins fort que celui attendu. Un lavage avec un tampon isotonique suivi d'une centrifugation sont réalisés afin d'éliminer l'excès d'anticorps non fixé.

B. Principes d'analyse

Lorsqu'un échantillon passe sur le cytomètre, un ensemble d'informations provenant de chaque cellule est enregistré sous forme de fichiers, qui peuvent

être retraités grâce à des logiciels informatiques comme Kaluza®. On peut réaliser plusieurs histogrammes mono et biparamétriques, où chaque cellule est représentée par un point dont la position sur l'histogramme dépend de l'expression des deux marqueurs étudiés (dans le cadre d'un histogramme biparamétrique).

Les logiciels peuvent aussi établir différentes données statistiques sur chaque population étudiée (quantification relative, moyenne, médiane, CV...).

OBJECTIF

L'étude de la maladie résiduelle présente un intérêt croissant dans les hémopathies comme le myélome multiple.

Les différentes techniques utilisées doivent répondre à des exigences en termes de sensibilité, de spécificité et de rapidité de rendu des résultats.

Parmi ces méthodes, la biologie moléculaire est un outil de référence pour répondre à ces contraintes de qualité mais reste une technique complexe, coûteuse et n'est pas toujours rapide dans le rendu des résultats.

Ceci justifie la mise en place d'une autre méthode comme la cytométrie en flux, d'autant plus que ses performances se sont améliorées avec la mise en place de nouveaux automates multiparamétriques, étudiant jusqu'à 8 à 10 paramètres simultanément.

Malgré ces avantages, il existe encore de nombreuses différences dans la manière dont la cytométrie en flux est appliquée, du traitement au moment de l'analyse. En parallèle, le développement de l'immunothérapie a introduit une complexité importante pour l'étude de la MRD, reposant sur l'identification du CD38, et aucune approche standardisée pleinement satisfaisante n'a encore émergé pour atténuer la perte d'expression du CD38. Pour attribuer une importance clinique à un résultat de MRD, des procédures et des paramètres de qualité rigoureux doivent être mis en œuvre.

L'objectif de mon travail est donc de mettre en place une technique de suivi de la maladie résiduelle par cytométrie en flux multiparamétrique chez les patients atteints de myélome multiple, tout en respectant un ensemble de recommandations, de directives, de méthodologies publiées tout récemment afin de pallier à la complexité introduite par les immunothérapies pour l'étude de la MRD.

ETUDE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE DANS LE MYELOME MULTIPLE : ETAT DE L'ART

1. Aperçu de l'évolution des tests de cytométrie en flux dans le myélome

A. Historique

L'étude de la maladie résiduelle dans le myélome multiple par cytométrie en flux a débuté initialement dans les années 1990, où l'on commence à différencier les plasmocytes malins de leurs homologues normaux par la perte d'expression du CD45 et du CD19 et avec une surexpression fréquente du CD56 et du CD117 (76). Les tests ont été limités d'une part par une instrumentation qui ne permettait d'analyser que quatre antigènes à la fois, et d'autre part, par une variation marquée des méthodologies et des panels d'un laboratoire à l'autre. Pour évaluer le phénotype du myélome, l'échantillon était réparti dans plusieurs tubes au moment du diagnostic, puis ces mêmes tubes étaient utilisés pour le suivi, mais cette approche ne tenait pas compte des changements immunophénotypiques potentiels du diagnostic au suivi et le nombre d'anticorps par tube étant faible, la sensibilité était limitée.

La deuxième génération des tests de cytométrie en flux est apparue avec la possibilité d'analyser entre 6 à 8 antigènes par tube. Malgré les progrès significatifs, une enquête sur les grandes institutions académiques publiée en 2013 a révélé des différences marquées pour les panels d'anticorps utilisés, du nombre de cellules acquises et des sensibilités attendues. Chaque laboratoire avait sa propre technique d'analyse qui n'étaient pas directement comparables (77). Il existait même une variabilité dans la définition d'un plasmocyte malin par cytométrie. En effet, certains laboratoires se sont basés sur la négativité du CD19 et du CD45, alors que des sous-populations de plasmocytes normaux peuvent ne pas exprimer ces antigènes. Les différentes configurations des cytomètres, le préanalytique, les procédures et les réactifs de préparation utilisés, les panels

d'anticorps et les approches hétérogènes d'analyses et d'interprétation des données aboutissent à une variabilité des résultats obtenus.

Enfin, l'arrivée des tests plus récents de troisième génération (ou flux de nouvelle génération, NGF) vise à remédier à ces hétérogénéités, en standardisant les seuils de sensibilité, le nombre de cellules à l'acquisition, les panels d'anticorps, les réactifs et les stratégies analytiques.

B. Expressions antigéniques des plasmocytes malins

Afin d'utiliser la cytométrie en flux pour l'étude de la MRD dans le myélome multiple, il est essentiel de distinguer le phénotype des plasmocytes malins de celui des plasmocytes normaux.

Comme pour les plasmocytes normaux, les plasmocytes malins peuvent être identifiés par l'expression du CD38 et du CD138.

Les plasmocytes physiologiques de la moelle osseuse ou du sang sont généralement positifs pour le CD19, le CD27 et le CD81. En revanche, les plasmocytes malins montrent typiquement une expression réduite ou absente pour le CD27, le CD45 et le CD81, et une expression anormale pour les CD28, CD33, CD56, CD117 et CD200 (tableau 5). Ils sont généralement négatifs pour les marqueurs des lymphocytes B tels que le CD19 ou le CD22, mais peuvent être positifs pour le CD20 dans un sous-ensemble de cas. Dans de rares cas de myélomes, on retrouve des plasmocytes malins exprimant le CD19.

Ils expriment une chaîne légère d'immunoglobuline cytoplasmique monotypique.

Antigène	Motif aberrant	% de cas d'expression anormale
CD19	-	96%
CD20	dim +	17 à 30%
CD27	- ou dim +	40 à 68%
CD28	+	15 à 45%
CD33	+	18%
CD38	dim +	80%
CD45	-	73%
CD54	dim +	60 à 80%
CD56	++	60 à 75%
CD81	- ou dim +	55%
CD117	+	30 à 32%
CD200	+ / ++	≥70%
CD307	++	N / A

Tableau 5 : marqueurs les plus fréquemment utilisés pour la détection des phénotypes associés au myélome (78)

En règle générale, il faut savoir qu'aucun marqueur phénotypique unique ni même une petite combinaison d'antigènes ne peut identifier tous les plasmocytes malins. L'expression ou non de chacun des marqueurs varie en fonction de chaque patient, de la présence de différents sous-clones plasmocytaires et du stade de différenciation de ces cellules. Cette hétérogénéité phénotypique rend l'identification des plasmocytes très difficile et nécessite de définir des panels spécifiques et sensibles.

Concernant l'impact pronostique des antigènes, l'étude d'Arana (79) a montré que la thérapie a conduit à la sélection et à la persistance d'un petit nombre de plasmocytes malins chimiorésistants, qui ont montré une expression progressivement plus élevée pour le CD81. De plus, une expression aberrante du CD38 et une réactivité pour le CD81 en l'absence d'expression du CD117 ont identifié un sous-ensemble de patients (9%) qui avaient une survie sans progression et une survie globale significativement inférieures. Ce profil phénotypique était également lié à des taux significativement plus élevés de rechute précoce.

Puis, l'analyse groupée dans une grande série (1265 patients) montre que chez les patients avec une diminution de l'intensité médiane de fluorescence du CD38 et du CD138, la survie sans progression et la survie globale sont plus courtes.

L'étude de Matéo (80) a montré qu'une absence d'expression du CD117 et une expression du CD28 seraient associées à une évolution défavorable. Une faible proportion de patients de cette étude, présentant un profil d'expression du CD19, était associée à une survie sans progression et à une survie globale plus courtes d'environ 1 et 2 ans respectivement. Enfin, une baisse d'expression du CD56 était associée à une survie sans progression plus courte.

2. Echantillons

A. Le choix de la source de l'échantillon

- La moelle osseuse

La première étape lors du suivi de la maladie résiduelle dans le myélome multiple en cytométrie est le prélèvement. La moelle osseuse est le lieu de développement de la maladie, c'est l'échantillon le plus riche en plasmocytes et reste donc le prélèvement de choix. Au-delà du geste invasif, cette approche pose quelques défis supplémentaires, notamment :

- L'étude de la maladie résiduelle peut conduire à des résultats faussement négatifs en raison d'une maladie exclusivement extra-médullaire.
- L'obtention d'échantillons d'une grande qualité et non hémodilués est essentielle pour l'étude de la MRD. L'hémodilution de la moelle osseuse étant un problème majeur pour l'étude de la maladie résiduelle, il est recommandé d'utiliser une méthode d'évaluation de la richesse de l'échantillon avant toute étude de la MRD, comme par exemple la quantification des érythroblastes ou des mastocytes par cytométrie ou la comparaison des numérations leucocytaires médullaire et sanguine basée sur la méthode de Holdrinet (81).
- La répartition des plasmocytes dans la moelle osseuse peut être inégale, ce qui suggère que le prélèvement sur un seul site peut ne pas être pleinement représentatif de la maladie.
- Le pourcentage de plasmocytes est sous-représenté par la cytométrie en flux par rapport à l'étude cytologique. Les plasmocytes sont très adhérents aux spicules et sont souvent sous représentés dans les échantillons de cytométrie en flux (82). La préparation des échantillons peut aussi être responsable d'une sous-estimation des plasmocytes en raison de leur sensibilité plus élevée aux dommages mécaniques.

- Le sang périphérique

Le sang est un échantillon alternatif car il est moins riche en plasmocytes, la sensibilité dans le sang sera moins profonde.

Toutefois, l'étude de la MRD sur le sang a récemment suscité un large intérêt, pour être adaptée et standardisée dans le myélome multiple. En plus d'avoir recours à une technique moins invasive et bien que moins sensible, la quantification est beaucoup plus précise (car moins sujet aux problèmes de dilutions).

Chez certains patients atteints de gammopathies monoclonales, des cellules tumorales peuvent s'échapper de la moelle osseuse vers le sang périphérique en tant que cellules plasmatiques tumorales circulantes (CPTC). Avec l'amélioration de la sensibilité des cytomètres, il est plus fréquent de détecter les CPTC chez plus de 80% des patients au diagnostic (83).

L'étude de Sanoja-Flores (84) a montré que chaque patient ayant des cellules plasmatiques tumorales dans la circulation, avait une maladie résiduelle positive au niveau de la moelle osseuse, ce qui suggère que la présence de ces dernières dans la circulation sanguine après la thérapie peut être un marqueur de substitution afin d'éviter le recours à la ponction de moelle, en particulier chez les patients qui ont atteint une réponse complète stricte.

D'un point de vue pronostique, cette étude a aussi démontré que la présence de ces cellules est associée à une survie plus courte (environ 9 mois) chez les patients atteints de myélome multiple et chez ceux qui ont atteint une réponse complète stricte quelle que soit la phase de traitement (figure 18).

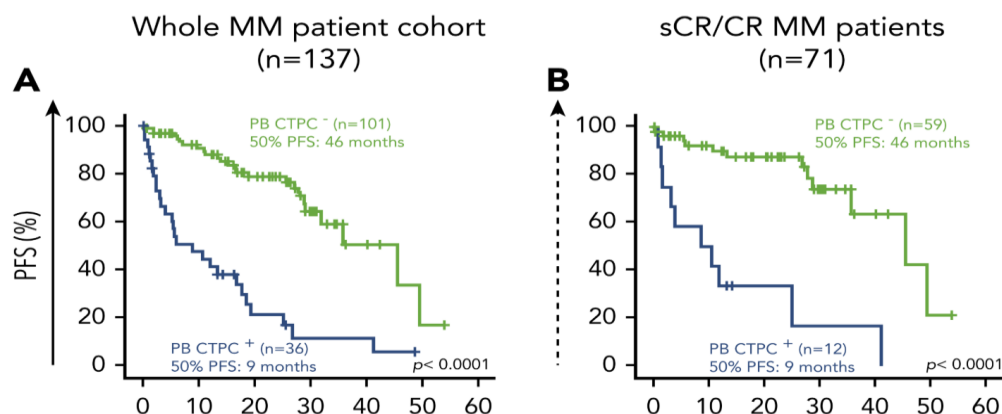


Figure 18 : impact pronostique des CPTC sanguines sur la survie sans progression par la cytométrie en flux de nouvelle génération (84)

En ce qui concerne les échantillons de sang de suivi, une surveillance séquentielle de ces cellules a montré que les patients atteints de myélome multiple et qui étaient CTPC⁻ ou qui sont devenus négatifs pour ces cellules, ont de meilleurs résultats sur la survie sans progression que ceux avec un résultat sanguin CTPC⁺ (figure 19).

Néanmoins, cette analyse doit être confirmée sur des séries plus importantes et sur un suivi à plus long terme.

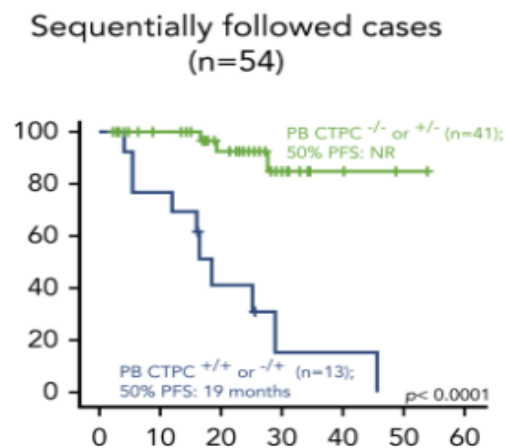


Figure 19 : impact pronostique au suivi des CPTC sanguines sur la survie sans progression par CMF (84)

Bien que la présence de la MRD dans le sang périphérique par cytométrie en flux soit moins sensible, ces cellules pourraient être utilisées comme valeur pronostic indépendante et complémentaire dans le diagnostic du myélome, ainsi que chez les patients en rémission complète, où elles permettent de prédire une progression imminente de la maladie. Cela est probablement dû au lien étroit entre les cellules myélomateuses circulantes et la dissémination tumorale.

Toutefois, au vu de la différence de sensibilité, une MRD non détectable dans le sang entraîne nécessairement une recherche de MRD dans un échantillon de moelle osseuse.

B. Anticoagulant

Les échantillons de sang ou de moelle osseuse doivent être prélevés dans des tubes avec un anticoagulant : seuls les échantillons anticoagulés à l'EDTA ou à l'héparinate de sodium sont acceptables en CMF.

Le citrate ne doit pas être utilisé car le rapport anticoagulant/sang n'étant pas optimal, ceci affecte le pH et réduit la viabilité des cellules.

L'anticoagulant peut aussi influencer l'expression de certains marqueurs, comme par exemple le CD138, un protéoglycane héparane sulfate, qui peut montrer une diminution de son expression en présence d'héparinate de sodium en raison de sa liaison à l'héparine (85). L'EDTA permet en outre l'étude morphologique préalable des échantillons. Il est donc recommandé de réaliser les prélèvements pour la CMF sur tube EDTA

C. Conditions environnementales

Après le prélèvement, il est important d'éviter les changements de températures excessives, un transport à température ambiante reste acceptable. Il a été démontré que le CD138 peut présenter une perte variable ou une expression diminuée en cas de traitement retardé et / ou d'exposition au froid, ou de conditions physiques provoquant une hypoxie de l'échantillon (86). Le délai entre le recueil des échantillons et le marquage ne doit pas excéder 48 heures (87).

3. Traitement des échantillons

En raison de la très faible quantité de plasmocytes dans la moelle osseuse, notamment dans le cadre du suivi de la MRD, il est nécessaire qu'un grand nombre de cellules soit acquis. Il existe plusieurs méthodes d'enrichissement cellulaire utilisées en cytométrie en flux.

A. La lyse érythrocytaire

La lyse peut être réalisée avant ou après marquage. Si elle est réalisée après le marquage, la densité des épitopes ne sera pas impactée, mais cela nécessite beaucoup plus d'anticorps qui peuvent adhérer de façon non spécifique aux globules rouges, interférant dans l'analyse.

Si elle est réalisée avant, cela va permettre de limiter le marquage aux leucocytes, réduisant ainsi le volume des anticorps et le coût de la technique. La lyse avant marquage possède quand même certaines contraintes, notamment :

- Il peut y avoir des problèmes de stabilité avec des conjugués anticorps-fluorochromes (phycoérythrine), notamment pour les lyses commerciales qui sont plus ou moins agressives (contrairement aux lyses à base de chlorure d'ammonium, qui sont plus douces).

- L'expression antigénique peut être impactée durant le prétraitement, cette technique nécessitant deux étapes de lyse des globules rouges et pouvant nuire à la densité des épitopes (notamment pour les lyses commerciales).

La Société Internationale de Cytométrie Clinique (SICC) et la Société Européenne d'Analyse Cellulaire Clinique (ESCCA) recommandent d'utiliser la lyse avant marquage (87), afin d'avoir un échantillon plus concentré et d'acquérir plus de leucocytes pour l'analyse. Cette technique est considérée comme une méthode de référence pour l'étude de la maladie résiduelle par cytométrie en flux.

- Réactifs de lyse

Il a été démontré que chaque réactif de lyse influence le dénombrement des cellules en cytométrie, et donc la quantification de la MRD (88). Les érythrocytes peuvent être lysés en utilisant du chlorure d'ammonium ou d'autres réactifs disponibles dans le commerce comme FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences), Quicklysis™ (Cytognos) et VersaLyse™ (Beckman Coulter).

Le choix de la meilleure procédure doit remplir les critères suivants :

- Un faible coefficient de variation sur les caractéristiques de taille et de structure.
- De grandes différences dans les valeurs moyennes des détecteurs pour FS et SS entre les principales populations leucocytaires.
- Une perte minimale de cellules.
- Un faible bruit de fond.
- Une variation interlaboratoire minimale.
- Une utilisation facile et rapide.

Les dernières directives consensuelles de la SICC et la ESCCA recommandent les réactifs de lyse à base de chlorure d'ammonium qui satisfont le mieux aux critères précédents (87).

B. Le Ficoll

La récupération des globules blancs peut se faire aussi par gradient de densité avec le Ficoll. Morice et al. (89) ont évalué l'impact de cette technique sur la MRD et suggèrent d'optimiser la phase préanalytique en introduisant l'approche par la lyse des globules rouges plutôt que le Ficoll, qui peut entraîner une réduction du nombre de plasmocytes et une accélération de la perte d'antigènes comme le CD138 et le CD38.

De plus, le taux de récupération cellulaire semble être plus élevé avec la lyse par rapport à la procédure avec Ficoll, d'après une étude récente de Genuardi (90). En effet, une perte cellulaire est estimée entre 15% et 30% due à la toxicité du composant, et déconseille l'utilisation de ce procédé dans un contexte hématologique.

Enfin, la lyse est plus simple à réaliser que le Ficoll, ce qui permet d'accélérer légèrement la phase préanalytique.

C. La leucoconcentration

Pour faciliter l'élimination des globules rouges, l'utilisation de protéines de haut poids moléculaire comme le dextran va augmenter le taux d'agrégation des globules rouges qui sédimentent plus rapidement que les leucocytes. Contrairement à d'autres techniques comme le Ficoll, cette sédimentation n'entraînera aucune perte sélective au niveau des globules blancs (91). Une fois les globules blancs récupérés après la sédimentation, une étape de lavage avant le marquage en surface est réalisée. Toutefois, la réalisation de cette technique reste assez longue et donc n'est pas adaptée en pratique au laboratoire.

D. La perméabilisation

La perméabilisation des cellules est nécessaire, afin d'assurer l'entrée des anticorps impliqués dans la détection des antigènes intracellulaires. Cette perméabilisation va permettre la détection des chaînes légères qui ne sont pas exprimées en surface, afin d'évaluer la clonalité et identifier de manière plus fiable les plasmocytes malins.

À cet effet, plusieurs réactifs commerciaux tels que BD Perm / Wash™ buffer (BD Biosciences), Fix & Perm ® (Thermo Fisher), IntraPrep™ (Beckman Coulter), IntraStain® (Dako), Leucoperm™ (Bio-Rad) ou une combinaison de paraformaldéhyde et de saponine peuvent être utilisés. Le choix du réactif est important et il doit remplir les critères suivants :

- Il doit permettre une perméabilisation de la membrane tout en évitant des dommages cellulaires.
- Il ne doit pas engendrer une augmentation de l'autofluorescence des cellules.
- Il doit éviter le marquage de sites non spécifiques.
- Il ne doit pas interférer avec les anticorps de surface.

Il n'y a aucun avantage ou inconvénient spécifique des kits commerciaux disponibles, et sont donc tous appropriés pour la détection des chaînes légères. En revanche, une combinaison de paraformaldéhyde et de saponine est déconseillée, car elle peut entraîner la formation de liaisons non spécifiques et une autofluorescence des cellules (92).

La perméabilisation peut se faire après le marquage en surface ou simultanément, mais il est recommandé d'effectuer la perméabilisation après le marquage en surface afin d'éviter l'altération de certains épitopes.

L'évaluation de la clonalité des plasmocytes reste importante pour les échantillons de diagnostic, mais la pertinence de cette analyse dans les échantillons de suivi est moins claire pour plusieurs raisons :

- L'existence d'une différence dans les pourcentages de plasmocytes avant et après perméabilisation (93) en raison d'étapes de traitements supplémentaires, entraînant une quantification moins précise. Néanmoins ces pertes peuvent être atténuées en traitant un nombre légèrement plus élevé de cellules.
- La présence d'une faible quantité de plasmocytes malins.
- Les plasmocytes malins peuvent contenir de très faibles niveaux de chaînes légères cytoplasmiques.
- L'existence d'un trouble bi-clonal exprimant à la fois les chaînes légères kappa et lambda.

Ainsi, on peut se demander si les anomalies d'expression atypique des antigènes de surface ne sont pas suffisantes pour l'étude de la MRD.

L'évaluation des chaînes légères reste quand même avantageuse comme le montrent Dold et son équipe (94), qui ont permis d'identifier les plasmocytes malins dans deux échantillons où phénotypiquement, les plasmocytes malins sont apparus proches des plasmocytes normaux. Cette même étude a montré que le marquage des antigènes de surface n'est pas significativement affecté par le marquage intracellulaire supplémentaire, comme en témoigne la figure ci-dessous, où il n'y avait aucune différence significative entre les niveaux d'expression des six antigènes de surface cellulaire entre un panel à 6 couleurs et un panel à 8 couleurs dans lequel les cellules subissent une étape de perméabilisation.

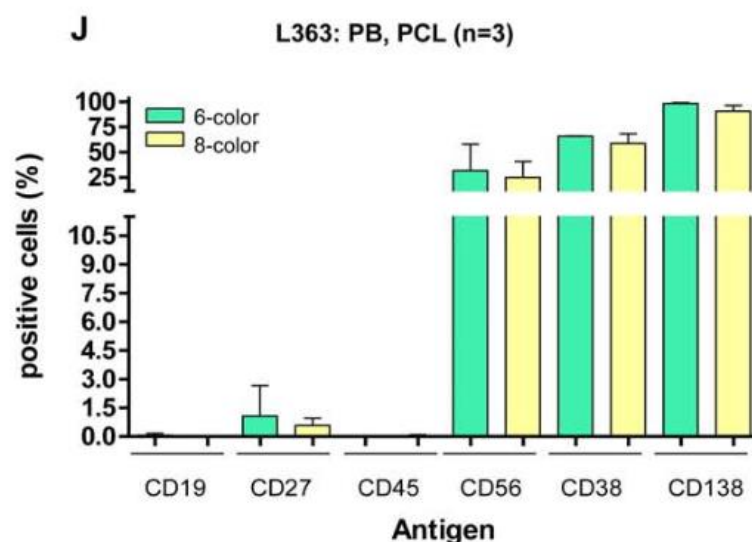


Figure 20 : comparaison des niveaux d'expression des antigènes de surface de trois lignées cellulaires de myélome en utilisant les deux panels (94)

L'évaluation des chaînes légères est aussi justifiée dans les cas d'instabilité immunophénotypique des plasmocytes malins. Spears *et al.* ont observé un changement phénotypique du diagnostic au suivi dans 31% des cas (95), et même dans 41% des cas dans l'étude de Cao et ses collaborateurs (96). Cette instabilité doit être prise en compte pour le suivi de la maladie résiduelle, et le rapport du Réseau européen sur le myélome recommande l'évaluation combinée de la clonalité avec l'immunophénotypage de surface (97).

E. Conditions de marquage

La plupart des fournisseurs recommandent un volume d'anticorps de 10 à 20 μL pour 500 000 cellules et un volume total de 100 μL de préparation cellulaire (anticorps et échantillon). Dans le cadre du suivi de la MRD dans le myélome, il faut redéfinir les conditions de marquage, qui sont différentes des recommandations commerciales. Il faut tenir compte notamment du nombre de cellules dans chaque tube avant le marquage et du volume final de la préparation cellulaire, afin d'avoir une incubation correcte des anticorps.

4. Conception des panels

A. Choix des anticorps

Le choix d'un anticorps dépend de sa spécificité vis-à-vis d'un antigène, mais aussi de son utilité à l'identification des plasmocytes, en tenant compte notamment de la fréquence des profils d'expression aberrants pour chaque marqueur sur les plasmocytes malins. Il doit pouvoir discriminer parfaitement ces plasmocytes des autres cellules.

Il a été démontré qu'une combinaison de huit anticorps au diagnostic (98) et au suivi de la maladie résiduelle (99) peut facilement permettre d'identifier le phénotype des plasmocytes malins. De même, cela fournit des informations sur la qualité de l'échantillon en identifiant des sous-ensembles de cellules associés à la moelle osseuse.

Il existe un consensus (97) sur le fait que l'utilisation du CD38, du CD45 et du CD138 dans au minimum un tube, en combinaison avec les caractéristiques de taille et de structure, fournit la meilleure approche pour l'identification des plasmocytes malins et normaux et leur discrimination de toutes les autres cellules de l'échantillon. Un panel doit aussi inclure au minimum le CD19 et le CD56 afin de détecter les plasmocytes malins.

Avec l'apparition des nouveaux cytomètres, les analyses deviennent de plus en plus sensibles à un niveau où l'on commence à identifier de petites populations plasmocytaires qui sont CD19 négatives et CD56 positives, correspondant à des plasmocytes normaux au stade terminal polyclonal et non à des plasmocytes monoclonaux. La possibilité d'élargir le panel pour une identification encore plus précise des populations anormales est alors recommandée, en incorporant des marqueurs supplémentaires comme le CD27, le CD81, le CD117, le CD200 ou le CD307 (100).

B. Choix des combinaisons fluorochromes-anticorps

L'efficacité des panels dépend non seulement des anticorps sélectionnés, mais également des fluorochromes auxquels ils sont conjugués.

Les combinaisons fluorochromes-anticorps qui ont été évaluées et qui se sont montrées performantes dans la littérature doivent être considérées comme une première option, tandis que l'utilisation d'autres combinaisons doit toujours être envisagée qu'après comparaison directe avec celles de références. Une

combinaison optimale de fluorochromes est rarement obtenue et par conséquent, une évaluation systématique des différentes options de fluorochromes est incontournable.

Le CD38 est considéré comme l'un des marqueurs les plus fiables pour l'identification des plasmocytes par cytométrie en flux. La différenciation des lymphocytes en plasmocytes est associée à une expression particulièrement élevée pour ce marqueur et donc, lors de la construction d'une combinaison de marqueurs contenant le CD38, ce dernier doit être associé à un fluorochrome moins brillant (par exemple FITC) afin d'éviter des problèmes de compensation. En revanche, le CD138 doit être conjugué avec des fluorochromes présentant une plus forte intensité lumineuse (HV450, BV421, APC, PE).

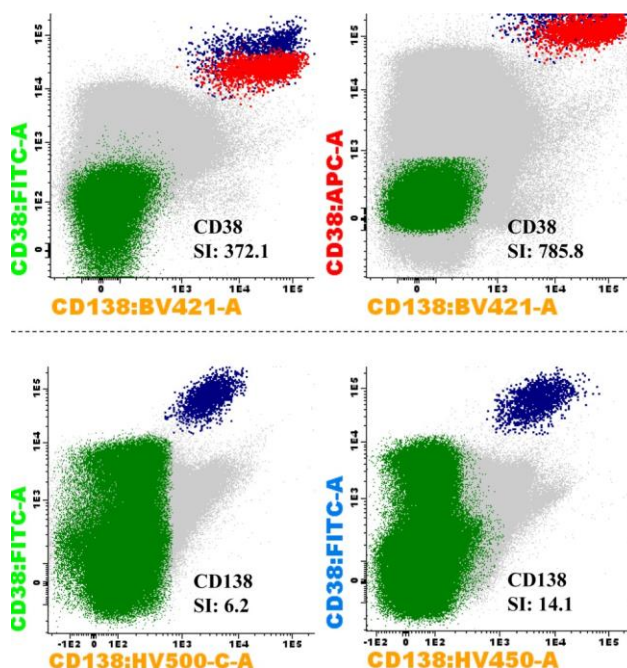


Figure 21 : comparaison des indices de coloration des CD38 en fonction des fluorochromes utilisés pour le marquage des plasmocytes normaux et malins (78)

C. Panels validés pour l'étude de la MRD dans le myélome

- Panel EuroFlow

La disponibilité d'analyse de plusieurs marqueurs a conduit différents laboratoires à concevoir leur propre panel autour de différents antigènes. Le groupe EuroFlow a démontré que des panels composés du CD38, CD19, CD45, CD56, CD27, CD81, CD117 et du CD138, ainsi qu'une évaluation des chaînes légères étaient

la combinaison la plus informative, offrant une distinction nette entre plasmocytes normaux et malins dans 97% des cas évalués (78).

Cette liste d'antigènes informatifs a constitué la base du panel EuroFlow, qui repose sur l'utilisation de deux tubes de huit couleurs combinant la détection des antigènes de surface dans un tube et celle de l'expression intracytoplasmique des chaînes légères kappa et lambda dans un autre tube.

Ce panel a pour objectifs notamment :

- L'identification positive des plasmocytes dans la moelle osseuse.
- Une discrimination précise entre les plasmocytes normaux / réactionnels et les plasmocytes malins.
- La confirmation de leur clonalité par l'étude de l'expression restreinte des chaînes légères.
- De limiter le nombre de tubes afin de réduire le temps et le coût de la technique.
- Un tube composé essentiellement de marqueurs de surface afin d'éviter le biais lié à la perméabilisation.

La configuration finale de leur panel résulte de l'évaluation de 6 versions de combinaisons (tableau 6) prenant en compte la qualité d'expression de chaque marqueur individuel, la disponibilité de chaque fluorochrome pour un marqueur en fonction de la position dans le panel, ainsi que leurs niveaux d'intensité de fluorescence (entraînant des problèmes de compensation).

		<i>PacB</i>	<i>AmCyan</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCPCy5.5</i>	<i>PECy7</i>	<i>APC</i>	<i>APCCy7</i>
1 (n = 7)	1	CD45	CD19	CyIgλ	CyIgκ	CD38	CD56	CD27	^c
	2	CD45	CD19	β2 micro	CD81	CD38	CD117	CD28	^c
		<i>PacB</i>	<i>AmCyan</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCPCy5.5</i>	<i>PECy7</i>	<i>APC</i>	<i>AF700</i>
2 (n = 68)	1	CD19	CD45	CyIgλ	CyIgκ	CD138	CD56	CD27	CD38
	2	CD19	CD45	β2 micro	CD81	CD138	CD117	CD28	CD38
3 (n = 5)	1	CD19	CD45	β2 micro	CyIgλ	CD138	CD56	CyIgκ	CD38
	2	CD19	CD45	CD27	CD81	CD138	CD117	CD28	CD38
		<i>PacB</i>	<i>AmCyan</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCPCy5.5</i>	<i>PECy7</i>	<i>APC</i>	<i>APCH7</i>
4 (n = 29)	1	CD19	CD45	β2 micro	CyIgλ	CD138	CD56	CyIgκ	CD38
	2	CD19	CD45	CD27	CD81	CD138	CD117	CD28	CD38
5 ^d (n = 5)	1	CD19	CD45	CD138	CyIgλ	β2 micro	CD56	CyIgκ	CD38
	2	CD19	CD45	CD138	CD81	CD27	CD117	CD28	CD38
		<i>PacB</i>	<i>PacO</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCPCy5.5</i>	<i>PECy7</i>	<i>APC</i>	<i>APCH7</i>
6 (Final) (n = 100)	1	CD45	CD138	CD38	CD56	β2 micro	CD19	CyIgκ	CyIgλ ^e
	2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

Tableau 6 : conception du panel EuroFlow en six cycles d'essais consécutifs (101)

L'utilisation de plusieurs de ces marqueurs va permettre de discriminer les plasmocytes malins des plasmocytes normaux. Les anticorps différenciants

comprennent ceux qui ciblent les antigènes généralement absents (CD19 et CD45), faiblement exprimés (CD27 et CD81) et fortement positifs (CD56, CD117 et CD200) chez les plasmocytes malins.

Les dernières directives de l'IMWG de 2016 recommandent d'utiliser les techniques de cytométrie en flux avec la méthode EuroFlow pour identifier la clonalité et le phénotype des plasmocytes malins (67).

- Panel SRL-Flow (*Special Reference Laboratories*)

L'acquisition de plusieurs millions de cellules avec un panel de deux tubes nécessite un échantillon deux fois plus important qu'un panel à tube unique, ce qui limite les analyses pour d'autres tests comme la cytogénétique ou la biologie moléculaire. De plus, travailler sur plusieurs tubes entraîne une augmentation des coûts en réactifs. Enfin, l'analyse d'un essai à tube unique est plus simple, sans raisonnement inférentiel entre les tubes.

Ce panel a été développé au Japon, dans le but de réduire le coût. Il consiste en un panel à 8 couleurs sur un seul tube, basé sur le tube 2 du panel Euroflow. Il se compose du CD38 multi-épitopes (FITC), du CD56 (PE), du CD138 (BV450), du CD45 (PerCP-Cy5.5), du CD19 (PE-Cy7), du CD27 (BV500) et des chaînes légères kappa (APC) et lambda (APC-H7) (102).

- Panel MSKCC (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*)

Toujours dans l'optique de réduire les coûts supplémentaires et la charge de travail pour les laboratoires, les principaux groupes américains ont conçu et validé un panel à tube unique à 10 couleurs qui incorpore tous les antigènes recommandés : le CD138 (APC), le CD56 (APC-R700), le CD45 (APC-H7), le CD81 (PB), le CD38 (BV510), le CD27 (BV605), le CD117 (PC5.5), le CD19 (PC7) et les chaînes légères kappa (FITC) et lambda (PE) (103).

En comparant cette approche avec la méthode à huit couleurs, il existe un excellent degré de concordance entre les deux techniques ($r^2 = 0.97$).

Un seul écart s'est produit entre les deux panels (avec un résultat MRD rendu positif pour le panel Euroflow et un résultat MRD rendu négatif pour le panel MSKCC). Bien que les résultats soient comparables, la méthode EuroFlow est légèrement plus sensible, capable d'analyser un plus grand nombre de cellules et avec une confirmation du test sur deux tubes.

- Autres panels

Étant donné que la plupart des panels restent assez onéreux et nécessitent des instruments à 10 couleurs, ils peuvent ne pas être abordables pour tous les laboratoires. Ainsi, des panels plus simples, plus rentables et disponibles pour tous les patients atteints de myélome multiple dans et en dehors des essais cliniques commencent à se développer, avec récemment des panels de 6 à 8 couleurs en un seul tube atteignant une sensibilité de 10^{-5} pour une acquisition de 3 millions de cellules (94), ou encore une méthode basée sur le tube BD OneFlow PCD (104) qui est un réactif à huit couleurs préconfiguré à dose unique, prêt à l'emploi, en formulation séchée, composée du CD38-FITC, CD28-PE, CD27-PerCP-Cy5.5, CD19-PE.Cy7, CD177-APC, CD81-APC-H7, CD45-Horizon V450, CD138-Horizon V500. Deux millions d'événements ont été acquis pour une quantité de 200 μ L de moelle osseuse. La sensibilité était de 1×10^{-5} .

Enfin, il existe aussi chez Beckman Coulter un panel prêt à l'usage, en formulation séchée, le DURAClone RE PC qui comprend 8 marqueurs (CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD138, CD200).

	CD138	CD38	CD45	CD56	CD81	CD27	CD117	CD19	CD200	CD28	B2	K	L
EuroFlow	B-A38	LD38	HI30	C5.9	JS-81	L128	104D2	J3-119	OX104		B2-1	Poly-clonal	1-155-2
SRL-Flow	MI15	CYT-38F2	2D1	MY31		M-T271		SJ25C1				TB28-2	1-155-2
MSKCC	B-A38	HIT2	2D1	NCAM 16.2	JS64	L128	104D2D1	J3-119				Poly-clonal	Poly-clonal
BD One flow	MI15	HB7	2D1		JS81	L128	104D2	SJ25-C1		L293			
Duraclone	B-A38	LS198 4-3	J.33	N901	JS64	1A4CD 27		J3-119	OX-104				

Tableau 7 : récapitulatif des différents clones d'anticorps utilisés dans les études citées

5. L'acquisition

Le nombre d'événements acquis est une étape clé dans l'interprétation de la qualité d'un résultat de MRD négatif. Les cytomètres de première génération évaluaient simultanément 4 à 5 antigènes avec une acquisition au maximum de 500 000 événements cellulaires. Cependant, avec l'efficacité des nouveaux protocoles de traitements améliorant la profondeur de la réponse, l'acquisition

d'un plus grand nombre de cellules est nécessaire. Ainsi, une acquisition d'un minimum de deux millions de cellules (cinq millions étant le nombre optimal) est recommandée pour l'interprétation d'un résultat de MRD (87). L'acquisition pour le panel EuroFlow est de 10 millions de cellules par tube et un minimum de 6 millions de cellules a été acquis pour le panel MSKCC, sur la base de l'identification d'au moins 20 plasmocytes malins pour les deux panels.

Si une telle acquisition n'est pas atteinte, la limite de détection doit être indiquée et le rapport doit contenir une déclaration quant à la diminution de la sensibilité. Un nombre plus élevé de cellules acquises permettra une plus grande sensibilité du test et donc une meilleure évaluation de la profondeur de la réponse.

6. Défis face à l'immunothérapie

A. Problème du Daratumumab

Le paysage du myélome multiple a considérablement changé ces dernières années avec l'arrivée de nouveaux traitements, en particulier les anticorps monoclonaux comme le daratumumab.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'identification des plasmocytes repose essentiellement sur l'expression du CD138 et/ou du CD38, mais l'introduction du daratumumab interfère dans la détection de ces cellules (figure 22).

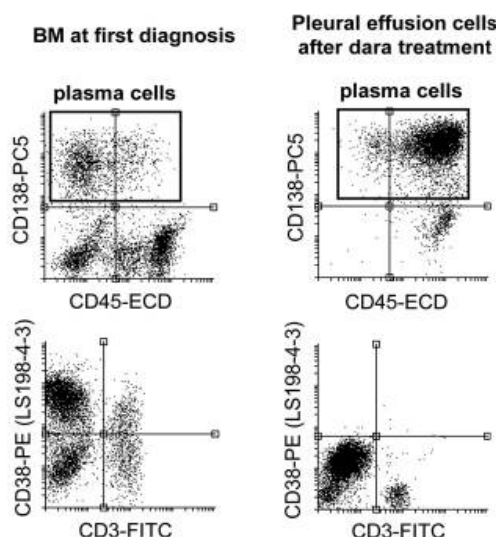


Figure 22 : saturation du CD38 par le daratumumab visible en CMF (105)

Oberle a montré six semaines après la dernière dose de daratumumab chez ce patient (cadrans de droite), une expression négative des plasmocytes pour le CD38 et une expression du CD45, contrastant avec l'immunophénotype des

plasmocytes (CD45- et CD38+) retrouvé au moment du diagnostic (cadres de gauche).

Cette molécule peut donc persister longtemps, plusieurs mois, à la surface des cellules, ce qui représente un défi technique où les variations immunophénotypiques sont d'une importance particulière dans le suivi de la maladie résiduelle par CMF.

De plus, si d'autres marqueurs de surface présentent une baisse d'expression comme le CD138 après plusieurs heures de stockage, cela devient très vite difficile voire impossible de pouvoir identifier les plasmocytes en cytométrie, ou du moins en faire une quantification correcte.

Il est donc important que le clinicien informe le laboratoire d'un traitement par le daratumumab, afin que ce dernier puisse rapidement anticiper et mettre en place des solutions alternatives.

B. Problèmes des CART-cells

Comme cité plus haut, de nombreux essais cliniques étudient l'utilisation de CART-cells ciblant des antigènes de surface comme le CD138 ou le CD38, qui vont davantage compliquer l'identification des plasmocytes par CMF.

C. Stratégie de gating ou marquage alternative

Pour pallier aux nouvelles contraintes induites par les immunothérapies, diverses stratégies de marquages peuvent être évaluées.

- Anticorps intracytoplasmiques

- Anticorps anti-p63 (clone VS38c)

Il s'agit d'un anticorps monoclonal exploré par cytométrie tout récemment, les expériences étant encore limitées.

Son action passe par la reconnaissance d'une protéine transmembranaire non glyquée de type II (p63.8) présente dans le réticulum endoplasmique granuleux des plasmocytes. Cet antigène p63 est également exprimé dans les cellules de l'intestin, les cellules exocrines du pancréas, les cellules de la glande surrénale et dans les mélanomes malins (106).

Courville a analysé (107) un échantillon de moelle osseuse d'un patient atteint d'un myélome multiple exposé au daratumumab au cours du dernier mois. Ainsi, on remarque bien la suppression de l'intensité de fluorescence du CD38 sur

toutes les populations cellulaires (figure 23, cadrans du haut). Les plasmocytes monoclonaux ont été identifiés par l'expression de la chaîne légère lambda mais on observe tout de même un chevauchement avec les lymphocytes B. L'identification devient beaucoup plus facile en utilisant le VS38c (cadrans du bas).

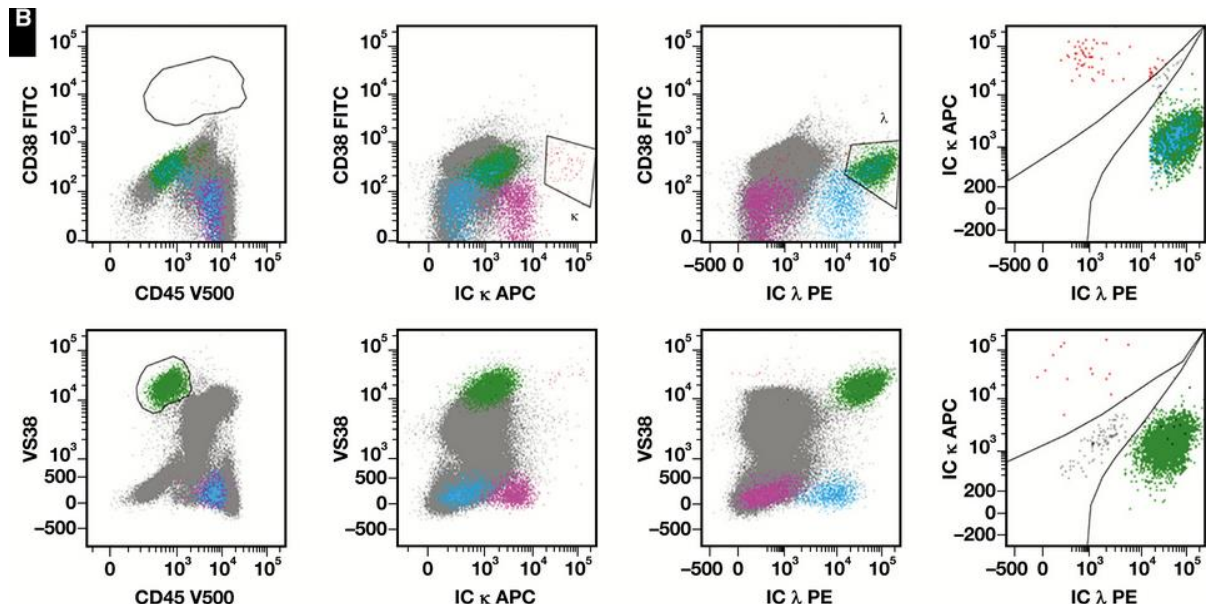


Figure 23 : comparaison du panel standard au panel VS38c par cytométrie de patients sous daratumumab (107)

Cet anticorps est donc une alternative prometteuse au CD38 pour la détection des plasmocytes par cytométrie en flux dans un contexte de thérapie au daratumumab. Cependant, il faut savoir qu'il est fourni par un seul fournisseur, et qu'il n'est disponible que conjugué à la FITC. De plus, comme c'est un anticorps cytoplasmique, une perméabilisation de la membrane cellulaire est nécessaire, mais il est moins susceptible d'être affecté par de nouvelles thérapies ciblant les antigènes de surface.

- Anticorps anti-IRF4

Le facteur de régulation de l'interféron 4 (IRF4) est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de régulation de l'interféron (IRF). Ces derniers jouent un rôle dans la régulation des réponses immunitaires, le développement des cellules immunitaires, la régulation de la croissance cellulaire et le métabolisme. L'IRF4 est essentiel pour la différenciation des plasmocytes (108) et il est surexprimé dans le myélome multiple, où son rôle passe essentiellement par une interaction avec le gène *MYC*. Shaffer a montré (109)

qu'une inhibition de l'IRF4 est toxique pour les lignées cellulaires du myélome, justifiant la mise en place de nouvelles voies thérapeutiques pour traiter le myélome, y compris le ciblage direct de l'IRF4.

En cytométrie, une combinaison de l'expression de IRF4 avec P63, CD45 et / ou CD138, identifie de manière fiable les plasmocytes malins après un traitement par le daratumumab (figure 24). Toutefois, l'IRF4 est une piste thérapeutique potentielle, et donc son intérêt pourrait être limité par l'arrivée de traitements qui le ciblerait.

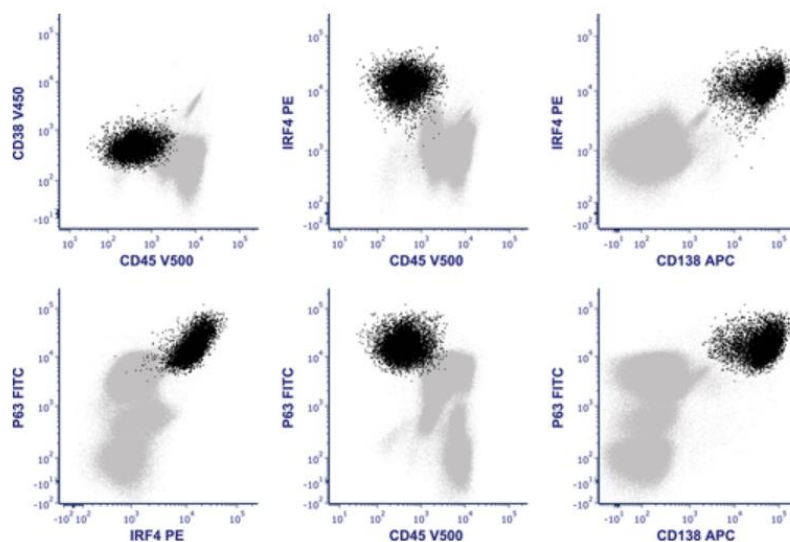


Figure 24 : identification avec l'IRF4 des plasmocytes malins (noirs) des autres cellules (grises) chez un patient atteint de myélome multiple après un traitement par daratumumab (110)

- Anticorps de surface

- Anticorps anti-CD38 multi-épitopes (CD38ME)

Étant donné que tous les anticorps monoclonaux anti-CD38 standards se lient à des épitopes chevauchant le site de liaison du daratumumab, l'entreprise Cytognos a développé un anticorps multi-épitopes qui a la capacité de s'associer à d'autres sites du CD38 indépendamment du daratumumab, ce qui permet l'identification des plasmocytes en cytométrie en flux lorsque les patients sont traités avec les nouvelles thérapies anti-CD38. L'expression du CD38 était préservée sur les plasmocytes malins (figure 25). Cet anticorps n'est aussi disponible que conjugué à FITC.

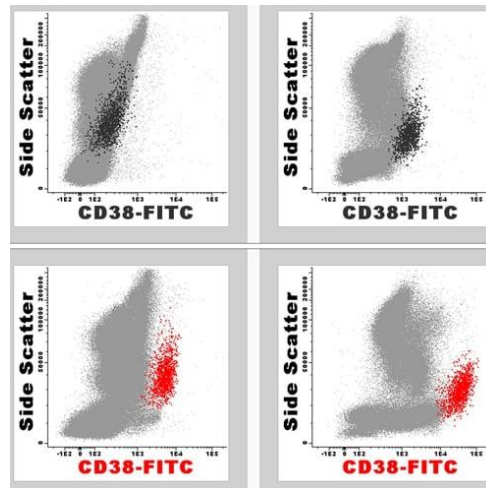


Figure 25 : évaluation comparative par cytométrie en flux de l'anti CD38-FITC (LD38) monoclonal (points gris foncé) et de l'anti CD38-FITC multi-épitoques (points rouges) chez un patient sous daratumumab (Cytognos)

- Nanocorps JK-36

Les nanocorps, dérivés d'anticorps à chaîne lourde qui se trouvent naturellement chez les lamas et les autres camélidés, sont des fragments d'anticorps à domaine variable unique (VHH) qui exposent une longue région 3 (CDR3) déterminante pour la complémentarité de la liaison du paratope à l'antigène (figure 26). Cette caractéristique leur permet de reconnaître les épitoques cachés.

Jk36 est un nanocorps anti-CD38 qui reconnaît un épitoque non masqué par les thérapies anti-CD38.

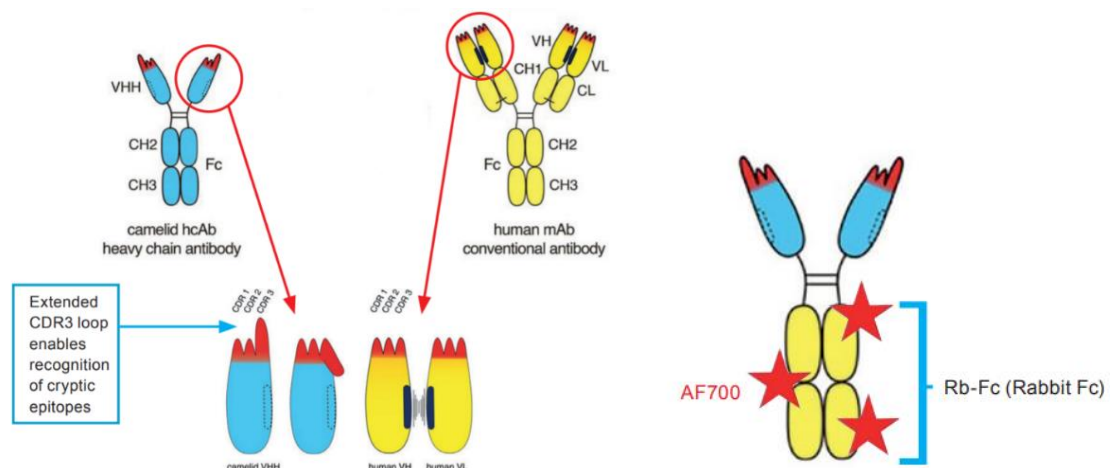


Figure 26 : caractéristiques avantageuses des anticorps à chaîne lourde de camélidés (111)

L'étude de Oberle (105) montre que ce nanocorps contourne le problème de la thérapie anti-CD38 en garantissant une détection fiable du CD38 par cytométrie en flux (figure 27).

Il est actuellement disponible conjugué aux fluorochromes AF700, AF488 et AF647 (clone J146-35).

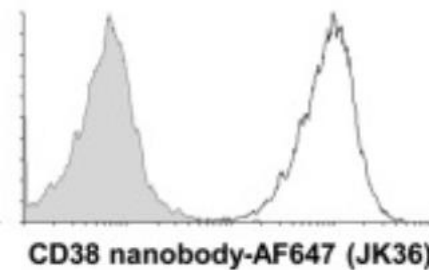


Figure 27 : détection par cytométrie de plasmocytes six semaines après l'arrêt du daratumumab avec un nanocorps (105)

- Anticorps anti-CD229

Le CD229 (LY9) fait partie de la famille des molécules de signalisation de l'activation lymphocytaire (SLAM). Il est exprimé en surface des lymphocytes, des cellules dendritiques et des plasmocytes.

Tembhare (93) a analysé le modèle d'expression de cette molécule sur les plasmocytes chez 251 patients atteints de myélome.

Tout d'abord, en comparant les intensités médianes de fluorescence (MFI), l'expression du CD229 est plus forte sur les plasmocytes que sur les autres cellules (figure 28), permettant une bonne séparation entre les plasmocytes et les lymphocytes B et T, les basophiles et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. De plus, il est exprimé sur la plupart des plasmocytes de l'échantillon, avec une intensité d'expression intermédiaire voire forte contrairement au CD138 qui, dans un tiers des échantillons, a montré une faible expression.

En comparant la variation de l'expression du CD229 entre les plasmocytes malins et les plasmocytes normaux, l'étude a montré que l'intensité médiane de fluorescence du CD229 est statistiquement plus élevée sur les plasmocytes malins. Cependant, l'expression différentielle de ce marqueur sur les deux populations plasmocytaires était insuffisante pour permettre une discrimination visuelle entre ces deux types de plasmocytes.

MFI of CD229 on PC and vs. non-PC from the same samples
(n=50)

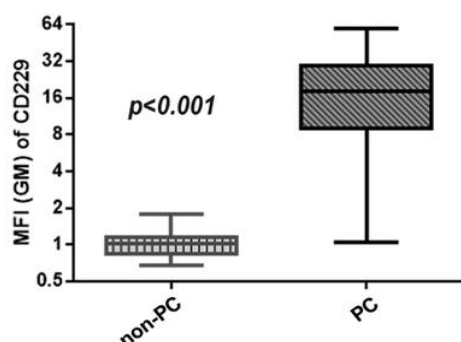


Figure 28 : comparaison de la MFI du CD229 entre les plasmocytes et les autres cellules (93)

En ce qui concerne les plasmocytes identifiés avec le CD229 par rapport aux autres marqueurs de gating traditionnels, les résultats ont indiqué que les stratégies de gating utilisant le CD229 avec une combinaison du CD45 et / ou du CD38 ont une forte corrélation avec le gating de référence (figure 29). Ainsi, le CD229 peut être un marqueur de gating pour les plasmocytes comme alternative au CD38 ou CD138, notamment dans le cadre d'une thérapie par anticorps monoclonaux anti-CD38 ou anti-CD138.

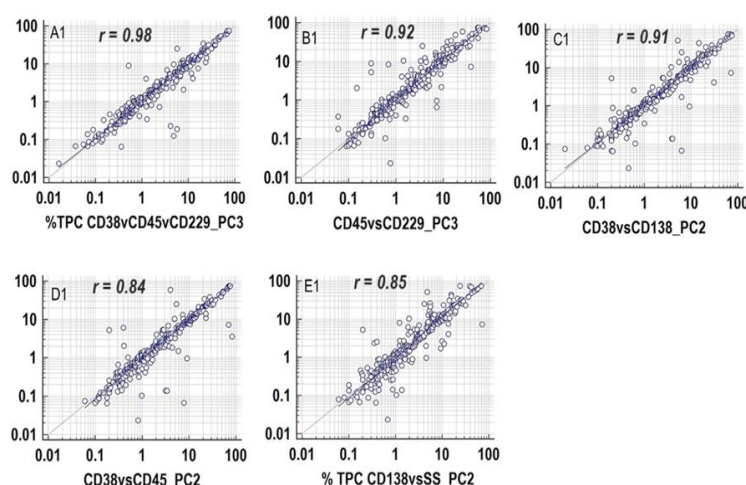


Figure 29 : illustration de la corrélation entre les pourcentages de plasmocytes par différentes stratégies de gating (93)

- Anticorps anti-CD54

Le CD54, ou ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*), est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. C'est une molécule d'adhésion intercellulaire présente au niveau des membranes des leucocytes et des cellules endothéliales. Sa concentration augmente lors de la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, entraînant la liaison des

leucocytes aux cellules endothéliales puis leur migration dans les tissus (112). En ce qui concerne les plasmocytes, le niveau d'expression de cette molécule est légèrement inférieur sur les plasmocytes malins par rapport aux plasmocytes normaux, mais sans différence significative (113). L'identification des plasmocytes par une fenêtre de gating CD54 / CD138 ou CD54 / CD38 a permis une identification claire et nette de tous les plasmocytes (figure 30).

Néanmoins, le pouvoir séparateur du CD54 est bien inférieur au CD138 ou au CD229, il est donc probablement insuffisant pour l'utiliser en tant que marqueur alternatif.

- Anticorps anti-SLAMF7

Le SLAMF7 (CS-1, CD319) est un antigène de la famille des molécules d'activation des lymphocytes de signalisation. Il est exprimé sur les lymphocytes T CD8+, B, NK et sur les cellules dendritiques. Cet antigène est fortement exprimé sur les plasmocytes dans le myélome par rapport aux autres populations leucocytaires et il présente aussi un niveau d'expression légèrement inférieur sur les plasmocytes malins par rapport aux plasmocytes normaux sans différence significative toutefois (114). Un avantage du CD319 est son niveau d'expression sur les plasmocytes relativement stable à 4°C et à 25°C sur une période de 72 heures, contrairement au CD138. Ce marqueur peut être utilisé comme un marqueur alternatif au CD38, mais le pouvoir séparateur du CD319 est aussi inférieur au CD229 (figure 30).

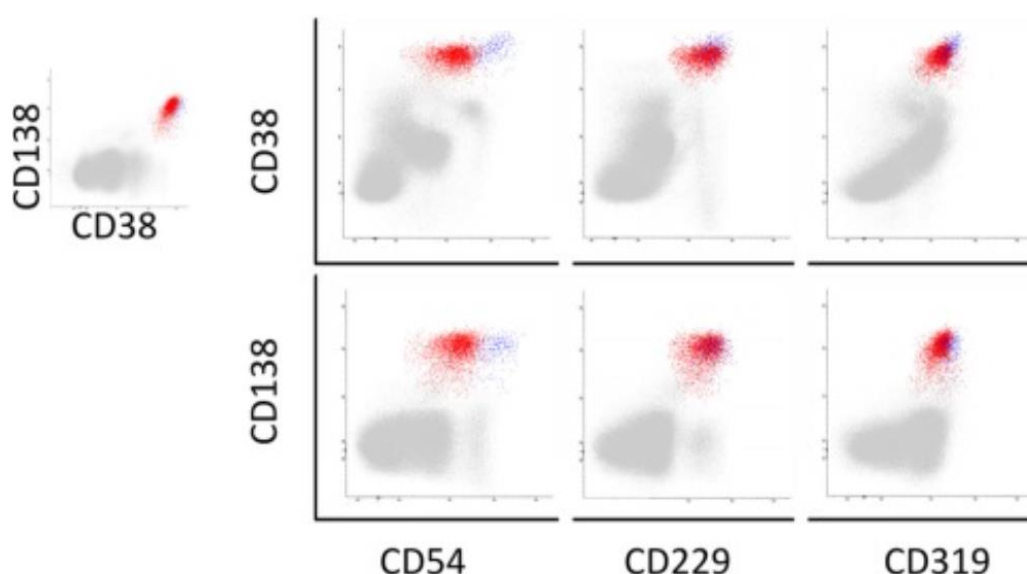


Figure 30 : profils d'expression du CD54, du CD229 et du CD319 sur les plasmocytes d'un patient atteint d'un myélome multiple asymptomatique (113)

RESULTATS DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation du panel au laboratoire

A. Anticorps et fluorochromes choisis initialement

Fluorochromes	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA 700	AA 750	PB	BV 510
Tube Intra- -cytoplasmique	38ME ou 38 nano	81 (JS-81)	45 (J33)	117 (104D2D1)	λ_c	κ_c	56 (N901)	19 (J3-119)	27 (1A4CD 27)	138 (MI15)
Tube surface	81 (JS64)	SLAMF7 (235614)	45	117	200 (OX104)	34 (581)	56	19	27	138

Tableau 8 : présentation du projet de panel réalisé au laboratoire (les clones sont notés entre parenthèse)

La mise en place de ce panel est basée sur plusieurs informations et directives annoncées plus haut, à savoir :

- Ce panel est composé de deux tubes d'au moins 8 anticorps, combinant anticorps de surfaces et intracytoplasmiques (directives de l'IMWG de 2016).
- C'est un panel qui comprend au moins CD138, CD38, CD45, CD19, CD56, CD27, CD81, CD117 permettant la détection des plasmocytes malins dans plus de 90% des myélomes (directives de la SICC et de l'ESCCA).
- Un minimum de cinq paramètres (CD38, CD138, CD45 et les propriétés FS / SS) est inclus dans un même tube pour maximiser l'identification des plasmocytes totaux tout en permettant la suppression des événements contaminants (rapport du Réseau européen).

Les plasmocytes malins expriment faiblement voire n'expriment pas le CD45. Ils ne doivent donc pas être exclus du gating.

- L'expression du CD117 est essentielle pour identifier les plasmocytes malins (généralement positifs pour ce marqueur) mais aussi en tant que valeur pronostique.

- L'utilisation de nouveaux marqueurs en cas de traitement par le daratumumab comme le CD319 (SLAMF7), le CD38 multi-épitoques ou le CD38 nanocorps.

Cependant, l'utilité du CD319 comme marqueur de gating peut diminuer, car de nouvelles thérapies sont de plus en plus utilisées comme les CAR-T cells et l'elotuzumab, ciblant cet antigène. L'utilisation d'autres anticorps cités plus haut devront être testés dans les conditions d'utilisation du laboratoire avant d'envisager leur inclusion dans le panel.

Le choix des clones s'est basé pour la plupart sur le panel Euroflow et le panel Duraclone de chez Beckman Coulter®.

La conception de ce panel tient compte aussi des caractéristiques des fluorochromes, qui ont été choisies (en comparant les intensités médianes de fluorescence) sur deux critères :

- Une séparation nette entre les cellules positives et les cellules négatives.
- Minimiser le potentiel de chevauchement spectral du fait des antigènes fortement exprimés.

Le CD138 est conjugué avec un fluorochrome présentant une forte intensité lumineuse (BV510) alors que le CD38ME est associé à un fluorochrome moins brillant (FITC).

B. Méthode de marquage choisie

L'étude de la MRD dans le myélome est réalisée sur des échantillons de moelle osseuse prélevés dans des tubes EDTA. Le prétraitement est effectué dans les 24 heures après réception du tube.

Un volume de moelle osseuse correspondant à 10 millions de cellules est récupéré. Deux lyses sont réalisées avant le marquage avec du chlorure d'ammonium (suivant les recommandations de l'IMWG), puis les cellules sont lavées avec du PBS. Après la centrifugation (5 minutes, 430G) et l'élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans du PBS+1% SAB afin d'obtenir une suspension de 400 µL contenant 20 millions de cellules.

Une suspension cellulaire de 100 µL contenant 5 millions de cellules est déposée dans chaque tube Falcon® contenant un pré-mix d'anticorps de surface présents initialement. L'incubation est effectuée 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Un lavage avec du PBS est ensuite réalisé pour éliminer les anticorps

non fixés, suivi d'une centrifugation. Après élimination du surnageant, une étape de perméabilisation (IntraStain®, Dako) est effectuée avant le marquage par les anticorps intracytoplasmiques. Un dernier lavage est effectué par du PBS, puis les échantillons sont repris dans 450µL de PBS avant passage sur le cytomètre (Navios®, Beckman Coulter) avec une acquisition d'au moins 3 à 4 millions de cellules.

C. Tests à réaliser pour valider cette méthode

Pour mettre en place une technique en routine, plusieurs tests doivent être réalisés.

Les critères d'acceptabilité permettent de définir la conformité des performances de la méthode à la norme « NF EN ISO 15189 ».

Il n'existe pas de critères d'acceptabilité définis pour le phénotypage des plasmocytes médullaires. Il appartient donc au biologiste médical de déterminer ses propres critères.

- Choix des anticorps
 - Test de spécificité pour les anticorps de gating

La spécificité est définie comme la capacité d'un test à détecter correctement des échantillons négatifs connus tout en évitant les faux-positifs.

Un certain nombre de facteurs influencent la spécificité : les marqueurs utilisés pour définir la population d'intérêt, la stratégie de gating et les interactions entre réactifs.

Le rapport du réseau européen du myélome (115) recommande l'utilisation du CD38, du CD138 et du CD45 comme anticorps de gating pour l'identification des plasmocytes. Les stratégies de gating doivent être vérifiées pour établir que la population d'intérêt est incluse, tandis que les événements non spécifiques doivent être exclus.

Pour ce faire, une analyse est réalisée sur des échantillons contenant la population d'intérêt ainsi que d'autres populations censées être présentes dans les échantillons auxquels le test sera appliqué, et sur des échantillons de moelle osseuse « normale », non pathologique.

- Tests de conditions minimales saturantes pour tous les anticorps

Pour chaque anticorps testé dans ce panel, le fournisseur recommande un volume d'anticorps pouvant aller de 10 à 20 μ l.

Ce test va non seulement déterminer la concentration minimale pour chaque anticorps en fonction du nombre de cellules, et va aussi permettre de limiter le volume en anticorps (permettant ainsi de réduire le coût). Pour cela, un volume de sang ou de moelle osseuse avec des cellules ciblées par les anticorps doit être incubé avec une gamme de concentration de l'anticorps à tester (0 μ l, 2,5 μ l, 5 μ l, 7,5 μ l et 10 μ l). L'intensité médiane de fluorescence est mesurée pour chaque concentration en anticorps, et chaque mesure reportée sur un graphique va permettre de déterminer la concentration minimale saturante (correspondant à la saturation des sites antigéniques par l'anticorps) comme étant le volume se situant sur le plateau juste après le point d'inflexion.

- Test de la combinaison

- Evaluation de la qualité de la matrice de compensation

La compensation est mathématiquement liée à plusieurs variables de l'instrument, y compris les tensions des PMT, la fluorescence, la puissance du laser et les filtres optiques. Par conséquent, lorsque l'une de ces variables est modifiée, elle affectera la compensation. Cela peut se produire pendant la maintenance ou la réparation de l'instrument, ou également si les tensions des PMT sont ajustées.

Chaque anticorps et son fluorochrome doit être testé seul dans un tube ne contenant que la suspension cellulaire, et on calcule un facteur de fuite pour chaque canal qui se définit comme le rapport de la médiane du signal de fuite sur la médiane du signal de la fluorescence, afin d'établir une matrice de compensation. La validation de cette dernière se fait en comparant les intensités médianes de fluorescence en y des populations positives en x par rapport à une population double négative en x et y où y représente l'ensemble des marqueurs compensés. Il ne doit pas y avoir de différence significative.

- Test d'évaluation des fuites par soustraction d'un anticorps dans le panel

Si un marqueur a une densité d'expression variable ou faible, il est nécessaire d'évaluer les fuites des marqueurs des antigènes co-exprimés dans le canal de

ce marqueur par soustraction d'un anticorps, car le débordement peut recouvrir le signal spécifique et masquer des modulations éventuelles.

- Test de la conservation des prémixs (Ac mélangés à l'avance)

L'utilisation d'anticorps mélangés à l'avance dans les tests de maladie résiduelle dans le myélome peut simplifier et standardiser la configuration du test et minimiser les erreurs potentielles de pipetage. Si on choisit d'utiliser des anticorps mélangés à l'avance, il est recommandé de valider que les résultats soient comparables à un marquage extemporané. Cela peut être fait en comparant les résultats tout en utilisant les anticorps mélangés à l'avance aux résultats obtenus en utilisant les anticorps sortis du flacon sur des cellules stabilisées. La comparabilité des résultats dans le temps définira la durée de stabilité du cocktail.

- Test du marquage intracellulaire (pour chaque réactif de perméabilisation testé)

- Persistance des marquages de surface

La quantification des plasmocytes à partir d'échantillons perméabilisés pour le marquage des chaînes légères pourrait ne pas être fiable en raison des étapes de perméabilisation et de lavage des cellules. Il doit être vérifié que ces étapes n'altèrent pas l'expression des antigènes de surface.

Pour ce faire, il faut comparer les intensités médianes de fluorescence des marquages de surface sur des cellules perméabilisées avec celles exprimées sur des cellules non perméabilisées.

- Evaluation de la mortalité des cellules

La perméabilisation peut entraîner une perte des plasmocytes. L'évaluation de la mortalité des cellules est d'une importance capitale pour s'assurer que l'interprétation des données n'est pas biaisée, spécifiquement pour des phénotypes rares. Ainsi, on peut calculer la différence de pourcentages des plasmocytes entre les deux tubes en utilisant une formule « % de perte » de type : $[(\% \text{ de plasmocytes totaux dans le tube de surface} - \% \text{ de plasmocytes totaux dans le tube intracellulaire}) / (\% \text{ des plasmocytes totaux dans le tube de surface})] \times 100$.

On peut aussi estimer la viabilité cellulaire en utilisant les propriétés de taille et de structure et de préférence en même temps que l'évaluation de la maladie résiduelle. Les échantillons dont la viabilité est inférieure à 85% doivent être signalés (87).

- Test de stabilité de l'échantillon

- Avant marquage (durée de conservation d'un échantillon non marqué)

Les plasmocytes sont fragiles et peuvent rapidement entrer en apoptose après le prélèvement, ou en raison d'une mauvaise manipulation de l'échantillon. De plus, le CD138 présente une certaine labilité quelques heures après le prélèvement médullaire.

Les échantillons de plusieurs patients (au moins cinq) doivent être testés « frais » (idéalement dans les 6 heures suivant le prélèvement), servant alors comme base de référence, et à divers intervalles (une fois par jour sur 3 jours) en fonction du moment où les échantillons doivent arriver au laboratoire. L'étude peut se faire par l'observation d'une décroissance du nombre de plasmocytes.

La stabilité de l'échantillon doit être évaluée pour chaque condition de traitement à utiliser. Les échantillons doivent être conservés dans les conditions de stockage prévues d'une manière similaire à celle utilisée en pratique.

- Après marquage (durée de conservation d'un échantillon marqué)

La stabilité des échantillons traités (lyse, marquage) doit également être évaluée pour déterminer la rapidité avec laquelle les échantillons traités doivent être passés sur le cytomètre. Le marquage de surface peut entraîner une internalisation du complexe antigène-anticorps et sa dégradation. Les échantillons (idéalement cinq) sont testés dans l'heure suivant le marquage (servant ainsi de référence). On étudie ensuite l'intensité médiane de fluorescence de chaque marqueur, à divers intervalles de temps correspondants au moment où les échantillons sont passés sur le cytomètre. Les échantillons doivent être conservés dans les mêmes conditions que celles utilisées en pratique (c'est-à-dire à 4° et à l'obscurité).

- Tests de performance de la technique

- Sensibilité

La sensibilité d'une technique est la capacité de détecter correctement une population anormale connue. Pour évaluer la sensibilité de détection d'une population anormale, on peut effectuer des séries de dilutions en mélangeant un échantillon de moelle osseuse non envahie et un échantillon d'une moelle osseuse de diagnostic de myélome (et de phénotype connu), afin d'obtenir des

suspensions cellulaires comprenant un nombre déterminé de cellules. La limite de sensibilité dépendra surtout du nombre d'événements acquis.

Historiquement, les premières études de l'évaluation de la MRD dans le myélome multiple consistaient à utiliser un petit panel fixe de quatre couleurs le plus informatif avec une sensibilité réduite à 10^{-4} (116). Actuellement, avec le développement des nouveaux cytomètres capables d'élaborer des panels de 6, 8 voire de 10 couleurs, la sensibilité s'est considérablement améliorée.

Le test EuroFlow revendique une sensibilité maximale de 2×10^{-6} et une sensibilité de 3×10^{-6} pour le panel MSKCC. La table ronde FDA-NCI et les recommandations consensuelles récentes recommandent d'atteindre une sensibilité de 10^{-5} (117).

- Limite de détection / quantification

Les tests de maladie résiduelle ont deux caractéristiques critiques qui peuvent être directement traduites en spécificité et en sensibilité de la limite inférieure de détection (LOD) et de la limite inférieure de quantification (LOQ).

La limite de détection d'une technique peut être définie comme le nombre minimum d'événements qui constitue une population cellulaire d'intérêt (ici le nombre de plasmocytes malins) divisé par le nombre total d'événements collectés, autrement dit, c'est la plus petite quantité de plasmocytes malins détectable dans la moelle osseuse.

Parce qu'un événement isolé peut être un artefact, les opérateurs visent généralement à identifier des groupes homogènes d'événements afin de les considérer comme des cellules. Un seuil fixé à 10 événements peut identifier une population cellulaire avec confiance (118). Les exigences peuvent être plus élevées si les tests doivent être utilisés dans plusieurs laboratoires avec un niveau d'expertise potentiellement variable et une moindre cohérence dans les préparations cellulaires comme c'est le cas pour le groupe EuroFlow, qui a fixé la limite à 20 événements. La présence d'un groupe de cellules d'une taille supérieure à la limite de détection peut être considérée comme une preuve de la présence d'une maladie résiduelle. Néanmoins, il faut éviter au maximum les faux positifs et donc cette étape comprend un examen d'un nombre significatif d'échantillons de moelle osseuse sans myélome et un nombre significatif de plasmocytes normaux / réactifs.

La limite de quantification est définie comme la plus petite quantité de plasmocytes malins mesurable dans la moelle osseuse avec une précision minimale requise.

Plus de 50 événements constituent un seuil standard pour le dénombrement reproductible d'une population cellulaire par les opérateurs en cytométrie en flux (119).

Ces deux mesures dépendent fortement de l'immunophénotype relatif des populations normales et anormales, ainsi qu'au bruit de fond et d'autres artefacts techniques. Une série de moelle normale de référence sera nécessaire pour déterminer le bruit de fond pour chaque immunophénotype de myélome.

- Linéarité

La linéarité est l'aptitude que présente une technique à donner des résultats proportionnels à chaque dilution.

Elle peut être estimée en utilisant les mêmes échantillons que ceux utilisés pour évaluer la sensibilité. Le coefficient de corrélation (r^2) entre les pourcentages réels de cellules anormales détectées à chaque dilution par rapport à la valeur prédite devra être supérieur à 0.95 (120).

- Reproductibilité intra-laboratoire

La reproductibilité intra-laboratoire (ou fidélité intermédiaire) consiste à analyser un échantillon dans des conditions différentes : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs... Elle permet de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques (norme SH GTA 04).

La reproductibilité reste une préoccupation majeure avec l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'évaluation de la MRD due essentiellement à un manque de standardisation des protocoles entre les laboratoires et à l'interprétation des résultats.

Elle peut être déterminée en mélangeant des échantillons avec des quantités connues de plasmocytes dans un échantillon de moelle osseuse d'un patient non malade. L'analyse se fera en plusieurs fois (généralement en triple) en faisant varier les conditions analytiques : opérateurs différents et utilisant des équipements différents. Le coefficient de variation ainsi calculé doit être inférieur à 10%. Cependant, dans le cadre d'une évaluation de la MRD où le CV augmentera à mesure que la limite de détection est atteinte, un CV inférieur ou égal à 30% est acceptable (120).

- Variabilité inter opérateur en analyse manuelle

La reconnaissance et la quantification des populations cellulaires en cytométrie en flux sont manuelles et dépendent fortement des opérateurs. Le manque relatif d'expertise et les possibilités de formation limitées pour acquérir une telle expertise compliquent encore davantage le problème. Ainsi, d'un laboratoire à l'autre, les interprétations des données peuvent fortement varier. Il a été démontré que les écarts n'étaient pas, pour la plupart, dus aux traitements préanalytiques des échantillons et aux variations techniques, mais à l'interprétation des résultats (121).

La variabilité inter opérateur constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. L'évaluation du maintien de cette maîtrise repose sur la vérification de compétences des opérateurs (habilitation) et la confrontation de leur réanalyse, ou bien l'utilisation d'une évaluation externe de qualité (EEQ) qui n'existe pas encore pour la MRD dans le myélome multiple.

- Comparaison avec une analyse automatisée

Pour tenter d'atténuer le problème de la variabilité inter opérateur, les enquêteurs d'EuroFlow ont introduit une méthode qui se base sur l'identification et le dénombrement automatique des plasmocytes (122). Pour l'analyse des données, les événements de leur panel ont été fusionnés et les valeurs de tous les paramètres mesurés par tube ont été calculées mathématiquement pour les événements correspondant aux plasmocytes à l'aide des fonctions de fusion et de calcul du logiciel Infinicyt. Cette méthode d'analyse a montré des résultats similaires à ceux de l'examen manuel des opérateurs dans l'ensemble avec une sensibilité accrue et un niveau élevé de standardisation. Un sous-ensemble de cas nécessite néanmoins un examen minutieux par les opérateurs, qui n'élimine pas totalement le besoin d'un niveau d'expertise approfondi.

- Conclusion

La mise en place d'une nouvelle technique en CMF pour l'étude de la MRD dans le myélome nécessite une série de tests à réaliser afin de garantir que le laboratoire atteigne les niveaux de qualité requis.

D. Liste des éléments pertinents devant apparaître sur le compte rendu

Afin de garantir que les résultats de l'étude de la MRD soient interprétés correctement et en toute connaissance de cause, il est essentiel que le rapport de

la MRD comprenne suffisamment d'informations notamment les limites de détection et de quantification du test pour chaque échantillon. Ces limites sont basées sur quatre paramètres : le nombre total d'événements analysés, le nombre d'événements de plasmocytes malins détectés, le plus petit nombre d'événements requis pour détecter de manière reproductible une population de plasmocytes malins et le plus petit nombre d'événements requis pour quantifier de manière reproductible une population de plasmocytes malins.

La déclaration à la fois du nombre de plasmocytes malins identifiés dans un échantillon et du nombre total d'événements (normaux + malins) contenus dans celui-ci est obligatoire lors de l'expression du niveau de sensibilité du test.

Ainsi, un rapport complet inclurait :

- L'évaluation de la qualité de l'échantillon (par exemple, les pourcentages d'érythroblastes et / ou de mastocytes pour refléter une hémodilution potentielle basée sur la diminution ou l'absence de telles populations cellulaires spécifiques au sein de la moelle osseuse) (123).
- Le nombre total de leucocytes CD45+ évalués après exclusion des doublets et des débris.
- Le profil d'expression immunophénotypique des plasmocytes malins.
- La proportion et le nombre de plasmocytes malins et normaux (le cas échéant) dans la moelle osseuse.
- La limite de détection et / ou de quantification.
- Une conclusion donnant l'évaluation catégorique du statut MRD.

DISCUSSION

Les patients atteints de myélome multiple nouvellement diagnostiqués suivent un schéma thérapeutique d'induction, d'intensification, de consolidation puis d'entretien. Une question concernant les moments optimaux pour l'évaluation de la MRD reste à l'étude. L'évaluation de la MRD à la fin de l'induction est essentielle, car elle permet d'une part d'évaluer l'efficacité du traitement et d'autre part, de décider d'une approche basée sur la transplantation ou non. Les résultats de la plupart des études cliniques portent sur des patients éligibles à la greffe où la MRD est évaluée après le traitement d'intensification à 3 mois (moment où l'évaluation de la maladie est effectuée pour la réponse à la chimiothérapie à haute dose et à la greffe), mais certaines études ont continué à évaluer les patients tous les 3 à 6 mois. Peu de données sont disponibles sur l'évaluation de la MRD tout au long des dernières étapes du traitement. Jusqu'à présent, la fréquence à laquelle les tests MRD doivent être réalisés reste inconnue.

Les dernières lignes directrices de l'IMWG suggèrent une sensibilité minimale de 10^{-5} par CMF ou NGS pour la détermination d'une MRD négative dans le myélome. Les progrès dans le traitement du myélome ont atteint un seuil où les taux de rémission complète sont de plus en plus importants. Au fur et à mesure que les techniques de suivi de la MRD progressent, quel devrait être le seuil idéal pour la détection d'une maladie résiduelle ? Y a-t-il plusieurs seuils en fonction des critères pronostic détectés au diagnostic ? Comme d'autres hémopathies, les patients qui ont atteint une MRD négative avec une sensibilité de 10^{-6} ont montré de meilleurs résultats en terme de survie sans progression, par rapport à ceux qui ont atteint une MRD négative avec une technique moins sensible (70). Une limitation dans cette observation vient des thérapies utilisées. La plupart des patients reçoivent un traitement d'induction contenant un immunomodulateur et/ou un inhibiteur du protéasome mais pas d'anticorps monoclonaux. Au fur et à mesure que la thérapie évoluera, la pertinence de la MRD évoluera également, avec différents niveaux de MRD pour un pronostic optimal.

Avec l'évolution des techniques, on peut se demander si l'augmentation de la sensibilité au-delà d'un certain seuil est vraiment possible. Le seuil théorique de 10^{-6} en NGS n'est peut-être pas réalisable en pratique courante. La capacité à

analyser 10^7 cellules implique une analyse entre 5 et 50 μg d'ADN dans une réaction PCR ce qui est techniquement difficile, voire impossible actuellement. En cytométrie, une sensibilité de 10^{-6} nécessite une acquisition minimale de 20 millions de cellules voire beaucoup plus si l'on souhaite atteindre une sensibilité de 10^{-7} . Une telle sensibilité ne peut être atteinte en pratique en raison des limites liées à un problème de volume d'échantillon et de mémoire des ordinateurs d'acquisition.

Dans la globalité, la CMF et le NGS présentent des profils de sensibilité et de spécificité similaires et une bonne concordance entre les résultats, de l'ordre de 70% (à un seuil de sensibilité de 10^{-5}) (124). Aucune différence significative n'a été trouvée dans l'évaluation du nombre de plasmocytes malins entre le NGS et la CMF. Le choix peut donc se porter sur l'une ou sur l'autre de ces techniques, et il a été décidé au laboratoire d'évaluer la maladie résiduelle dans le myélome multiple par technique de cytométrie en flux.

Une ancienne technique de cytométrie était déjà utilisée en routine au laboratoire, mais certains problèmes, comme un mauvais choix de fluorochrome pour le CD38 entraînant des difficultés de réglages/compensations et l'émergence de l'immunothérapie, justifiaient la mise en place d'une nouvelle technique. De plus, devant la variabilité des méthodes en fonction des pratiques de chaque laboratoire, ce changement de technique a pour but de suivre les dernières recommandations et directives, du traitement de l'échantillon jusqu'à l'analyse.

La difficulté à analyser les plasmocytes dans la moelle osseuse et la faible fréquence des plasmocytes malins dans le sang présentent des défis pour la surveillance de la MRD dans le myélome. En parallèle des différentes techniques d'enrichissement cellulaire évoquées dans ce travail, une utilisation combinée d'une méthode d'enrichissement des CPTC par des billes immunomagnétiques et de la cytométrie en flux pourrait augmenter la sensibilité et la reproductibilité du test. Wang et al. (125) ont utilisé des anticorps anti-CD138 (APC) et anti-CD38 (APC) simultanément pour enrichir ces CPTC, suivi par l'ajout du CD138-PE et du CD38-FITC à leur panel d'analyse en CMF. La sensibilité du test a ainsi été multipliée par 10 (de l'ordre de 10^{-5}) avec une augmentation du taux de détection de ces cellules. Toutefois, l'étape d'enrichissement introduit une difficulté pour la quantification exacte des plasmocytes.

L'utilisation combinée du marqueur CD38, ainsi que les chaînes légères kappa et lambda permet d'identifier les plasmocytes du reste des autres cellules. Le CD138, très largement utilisé dans les panels de cytométrie, est aussi un marqueur de gating essentiel. Néanmoins, c'est un marqueur très labile, et l'émergence de CART-cells dirigés contre le CD138 ou d'anticorps anti-CD138 comme l'indatuximab (qui arrivera très prochainement en France en plus du daratumumab), nécessite l'utilisation d'autres marqueurs précédemment cités dans ce travail. Ces marqueurs pourraient très prochainement remplacer le CD38 et le CD138 des panels en ignorant toutefois, actuellement, si le seuil de sensibilité requis peut être atteint.

Il serait également intéressant de rechercher un antigène CD38 par un marquage intracytoplasmique, avec un anticorps qui cible un épitope différent du daratumumab. En effet, lorsque le CD38 se lie au daratumumab, il peut subir une étape d'endocytose par un processus d'internalisation indépendante des voies de transduction du signal. Une fraction presque constante (60%) de la quantité totale de molécules de surface est internalisée (126). Ceci permettrait de conserver cet anticorps de gating essentiel à la reconnaissance des plasmocytes.

On pourrait également combiner un panel d'évaluation de la maladie résiduelle dans le myélome avec une évaluation de la prolifération des plasmocytes incorporant le BrdU (bromodésoxyuridine) ou le ki67 (antigène exprimé pendant la division cellulaire), afin de détecter les plasmocytes en phase S uniquement ou sur plusieurs phases du cycle cellulaire. En combinant ces deux techniques, cela permettrait d'identifier des patients à risque de rechute lors du suivi d'une maladie résiduelle, et donc d'adapter la prise en charge du patient. Requirand (127) a constaté que chez les patients atteints de myélome, une prolifération cellulaire supérieure à 1.42% (en utilisant le BrdU) ou supérieure à 1.1% (en utilisant le ki67) était corrélée à une rechute plus rapide. De plus, l'évaluation de la prolifération cellulaire des plasmocytes peut être utile, dans les essais cliniques, pour comparer les effets d'un nouveau traitement sur cette prolifération. Néanmoins, un grand nombre d'événements est nécessaire pour suivre la variation du pourcentage de prolifération de ces cellules.

Enfin, comme mentionné précédemment, les différences dans le rendu d'un résultat sont essentiellement dues à l'interprétation des données par l'opérateur. La distinction entre les plasmocytes malins et les plasmocytes normaux/réactionnels est difficile, en raison de l'expression hétérogène des marqueurs, qui peut entraîner un chevauchement immunophénotypique entre ces deux populations cellulaires. L'existence de ce chevauchement dans un contexte de MRD, où le clone malin est en proportion faible rend encore plus difficile cette distinction. De plus, l'émergence de l'immunothérapie, entraînant des changements dans l'expression de l'antigène, complique davantage les analyses. Il serait alors intéressant de comparer notre analyse manuelle avec une analyse réalisée par des logiciels d'analyse non supervisée, qui comportent des algorithmes afin d'automatiser l'identification de l'immunophénotype des plasmocytes malins. Par exemple, le consortium EuroFlow a évalué la MRD dans le myélome en utilisant le logiciel Infinicyt, basé sur l'analyse en composantes principales (PCA) et en appliquant le paramètre de fonction de séparation automatisée.

Un autre logiciel, comme FlowSOM, déjà utilisé au laboratoire dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aigües myéloïdes, pourrait faire l'objet d'un développement spécifique afin de l'adapter à la MRD dans le myélome. Toutefois, on ignore si le seuil de sensibilité de 10^{-5} peut être atteint avec ces stratégies automatisées.

CONCLUSION

La maladie résiduelle est actuellement considérée comme un facteur pronostique fiable en termes de rechute et de survie dans toutes les hémopathies, telles que le myélome, et représentera probablement le principal moteur des stratégies de traitement dans un avenir proche. Le séquençage de nouvelle génération reste la technique de référence mais possède quelques contraintes, notamment en termes de coût, de délai de rendu des résultats, et cette technique n'est pas disponible dans tous les laboratoires.

D'autres techniques comme la cytométrie en flux ont donc été développées, et les améliorations récentes de cette dernière ont permis d'obtenir des résultats comparables avec la biologie moléculaire, avec une concordance de l'ordre de 70%.

Ma présentation d'une technique d'évaluation de la MRD dans le myélome, basée sur la cytométrie en flux, s'inscrit dans un contexte de standardisation des techniques d'analyses, qui constitue un des problèmes majeurs en cytométrie. L'objectif est non seulement d'obtenir une bonne sensibilité, une bonne spécificité, d'être assez reproductible, de réduire le coût et le temps des analyses, mais également de pouvoir utiliser cette technique malgré l'émergence des nouveaux traitements comme l'immunothérapie, notamment avec le daratumumab ou l'indatuximab. L'étude de la MRD inclut le CD38 et le CD138, et ces traitements peuvent entraîner une perte d'expression de ces marqueurs, ce qui impacte les résultats de la MRD. Aucune approche récente n'a été évoquée pour remédier à ce problème majeur. Il était donc nécessaire d'établir une liste de nouveaux anticorps pouvant potentiellement répondre à cette limite à l'avenir.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* déc 2016;43(6):676-81.
2. Blimark CH, Turesson I, Genell A, Ahlberg L, Björkstrand B, Carlson K, et al. Outcome and survival of myeloma patients diagnosed 2008-2015. Real-world data on 4904 patients from the Swedish Myeloma Registry. *Haematologica.* 2018;103(3):506-13.
3. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* janv 2003;78(1):21-33.
4. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer.* 1 déc 2004;101(11):2667-74.
5. Turesson I, Björkholm M, Blimark CH, Kristinsson S, Velez R, Landgren O. Rapidly changing myeloma epidemiology in the general population: Increased incidence, older patients, and longer survival. *Eur J Haematol.* 2018;101(2):237-44.
6. Alexander DD, Mink PJ, Adami H-O, Cole P, Mandel JS, Oken MM, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 2007;120 Suppl 12:40-61.
7. Zingone A, Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. *Semin Hematol.* janv 2011;48(1):4-12.
8. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst.* 3 oct 2001;93(19):1479-83.
9. Melton LJ, Kyle RA, Achenbach SJ, Oberg AL, Rajkumar SV. Fracture risk with multiple myeloma: a population-based study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* mars 2005;20(3):487-93.
10. Saad F, Lipton A, Cook R, Chen Y-M, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer.* 15 oct 2007;110(8):1860-7.
11. Moumas E, Sirac C, Delbès S, Desport E, Plaisier E, Jaccard A, et al. Renal involvement in multiple myeloma and monoclonal gammopathies. *Hématologie.* 1 nov 2011;17(5):342-56.
12. Richardson PG, Delforge M, Beksac M, Wen P, Jongen JL, Sezer O, et al. Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma. *Leukemia.* avr 2012;26(4):595-608.
13. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist U-H, Landgren O, Björkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica.* 1 janv 2015;100(1):107-13.

14. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* juin 2003;121(5):749-57.
15. Azais I, Debiais F. Imagerie des lésions osseuses du myélome. *Rev Rhum Monogr.* 1 avr 2017;84(2):187-95.
16. Waheed S, Mitchell A, Usmani S, Epstein J, Yaccoby S, Nair B, et al. Standard and novel imaging methods for multiple myeloma: correlates with prognostic laboratory variables including gene expression profiling data. *Haematologica.* janv 2013;98(1):71-8.
17. Bouayadi O, Bensalah M, Rahmani N, Assoufi S, Choukri M. [Serum protein electrophoresis: study of 410 electrophoretic profiles]. *Pan Afr Med J.* 2019;32:161.
18. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia.* févr 2009;23(2):215-24.
19. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 1 nov 2014;15(12):e538-48.
20. Wirk B. Renal failure in multiple myeloma: a medical emergency. *Bone Marrow Transplant.* juin 2011;46(6):771-83.
21. Oyajobi BO. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S4.
22. Bladé J, Rosiñol L. Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 1 déc 2005;18(4):635-52.
23. Dumas G, Merceron S, Zafrani L, Canet E, Lemiale V, Kouatchet A, et al. Syndrome d'hyperviscosité plasmatique. *Rev Médecine Interne.* 1 sept 2015;36(9):588-95.
24. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphologie.* 1 juin 2015;99(325):38-62.
25. Leleu X, Genevieve F, Guieze R, Duhamel A, Andrieux J, Berthon C, et al. Irregular nuclear shape of bone marrow plasma cells defines a multiple myeloma subgroup related to hypodiploidy and to short survival. *Leuk Res.* 1 juin 2005;29(6):665-71.
26. Pantanowitz L, Tranovich V, Ballesteros E. Flaming plasma cells. *Arch Pathol Lab Med.* oct 2001;125(10):1394-5.
27. Paiva B, Vidriales M-B, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica.* 1 nov 2009;94(11):1599-602.
28. 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.* 1 févr 1984;63(2):468-76.

29. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 15 janv 2000;95(2):388-92.
30. Al-Sahmani M, Trnavská I, Antošová M, Antošová L, Kissová J, Kaisarová B, et al. [Prognostic significance of morphology in multiple myeloma]. *Klin Onkol Cas Ceske Slov Onkol Spolecnosti*. 2012;25(2):103-9.
31. Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie B, Pileri A. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*. 1 août 1992;80(3):733-7.
32. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High Serum Lactate Dehydrogenase Level as a Marker for Drug Resistance and Short Survival in Multiple Myeloma. *Ann Intern Med*. 15 déc 1991;115(12):931-5.
33. 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*. 15 avr 2007;109(8):3489-95.
34. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2018;93(8):1091-110.
35. Maia C, Group on behalf of the PC, Puig N, Group on behalf of the PC, Cedena M-T, Group on behalf of the PC, et al. Biological and clinical significance of dysplastic hematopoiesis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 25 juin 2020;135(26):2375-87.
36. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. sept 1975;36(3):842-54.
37. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2005;23(15):3412-20.
38. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2015;33(26):2863-9.
39. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 21 juin 2007;356(25):2582-90.
40. Vrancken L, Muller J, Lejeune M, Gregoire C, Delens L, Jaspers A, et al. [What is new in the management of multiple myeloma]. *Rev Med Suisse*. 22 août 2018;14(615):1438-42.
41. Palumbo A, Sezer O, Kyle R, Miguel JS, Orłowski RZ, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. oct 2009;23(10):1716-30.
42. Korde N, Roschewski M, Zingone A, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, et al. Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *JAMA Oncol*. sept 2015;1(6):746-54.

43. Kumar S, Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL, Palumbo A, Bensinger W, et al. Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens. *Blood*. 27 août 2009;114(9):1729-35.
44. Moreau P, Facon T, Attal M, Hulin C, Michallet M, Maloisel F, 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 Myélome 9502 randomized trial. *Blood*. 2002;99(3):731-5.
45. Attal M, Harousseau J-L, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet J-G, et al. Single versus Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349(26):2495-502.
46. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L, et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 avr 2010;28(12):2077-84.
47. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, Bell SE, Szubert AJ, Brown JM, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood*. 5 janv 2012;119(1):7-15.
48. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, Richardson PG, Hulin C, Tosi P, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 oct 2017;35(29):3279-89.
49. Dimopoulos MA, Gay F, Schjesvold F, Beksac M, Hajek R, Weisel KC, et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 19 janv 2019;393(10168):253-64.
50. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 4 sept 2014;371(10):906-17.
51. O'Donnell EK, Laubach JP, Yee AJ, Chen T, Huff CA, Basile FG, et al. A phase 2 study of modified lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in transplant-ineligible multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2018;182(2):222-30.
52. Nwaj van de D, Pg R, F M. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood*. 8 nov 2017;131(1):13-29.
53. Mateos M-V, Cavo M, Bladé J, Dimopoulos MA, Suzuki K, Jakubowiak A, et al. Daratumumab Plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone Versus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone in Patients with Transplant-Ineligible Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Overall Survival in Alcyone. *Blood*. 13 nov 2019;134(Supplement_1):859-859.
54. Richardson PG, Attal M, Campana F, Le-Guenneec S, Hui A-M, Risse M-L, et al. Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncol Lond Engl*. mai 2018;14(11):1035-47.

55. Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mai 2008;14(9):2775-84.
56. Schönfeld K, Zuber C, Pinkas J, Häder T, Bernöster K, Uherek C. Indatuximab ravtansine (BT062) combination treatment in multiple myeloma: pre-clinical studies. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 11 janv 2017;10(1):13.
57. Lonial S, Lee HC, Badros A, Trudel S, Nooka AK, Chari A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 1 févr 2020;21(2):207-21.
58. Kapoor P, Gertz MA, Laplant B, Malave GC, Wolfe E, Muchtar E, et al. Phase 2 Trial of Daratumumab, Ixazomib, Lenalidomide and Modified Dose Dexamethasone in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Blood.* 13 nov 2019;134(Supplement_1):864-864.
59. Kumar SK, Kapoor P, Laplant B, Muchtar E, Buadi FK, Gonsalves WL, et al. Phase 2 Trial of Ixazomib, Lenalidomide, Dexamethasone and Daratumumab in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Blood.* 29 nov 2018;132(Supplement 1):304-304.
60. Landgren O, Hultcrantz M, Lesokhin AM, Mailankody S, Hassoun H, Smith EL, 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.* 13 nov 2019;134(Supplement_1):862-862.
61. Ghobrial IM, Weller E, Vij R, Munshi NC, Banwait R, Bagshaw M, et al. Weekly bortezomib in combination with temsirolimus in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, phase 1/2, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol.* mars 2011;12(3):263-72.
62. Gentile M, Martino M, Recchia AG, Vigna E, Morabito L, Morabito F. Sorafenib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Investig Drugs.* juin 2016;25(6):743-9.
63. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood.* 30 nov 2017;130(22):2401-9.
64. Vogl DT, Dingli D, Cornell RF, Huff CA, Jagannath S, Bhutani D, et al. Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 20 mars 2018;36(9):859-66.
65. Topp MS, Duell J, Zugmaier G, Attal M, Moreau P, Langer C, et al. Evaluation of AMG 420, an anti-BCMA bispecific T-cell engager (BiTE) immunotherapy, in R/R multiple myeloma (MM) patients: Updated results of a first-in-human (FIH) phase I dose escalation study. *J Clin Oncol.* 20 mai 2019;37(15_suppl):8007-8007.
66. Kyle R, Rajkumar S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK.* janv 2009;23(1):3-9.
67. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 1 août 2016;17(8):e328-46.

68. Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR, Weinstock DM. Targeting minimal residual disease: a path to cure? *Nat Rev Cancer*. avr 2018;18(4):255-63.
69. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 15 mai 2014;123(20):3073-9.
70. Paiva B, Puig N, Cedena M-T, Rosiñol L, Cordon L, Vidriales M-B, et al. Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 mars 2020;38(8):784-92.
71. Alonso R, Cedena M-T, Wong S, Shah N, Ríos-Tamayo R, Moraleda JM, et al. Prolonged lenalidomide maintenance therapy improves the depth of response in multiple myeloma. *Blood Adv*. 20 mai 2020;4(10):2163-71.
72. Kunacheewa C, Lin P, Manasanch EE. Minimal residual disease in multiple myeloma 2019. *Adv CELL GENE Ther*. 2020;3(1):e71.
73. Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. *Hématologie*. 1 juin 2019;25(2):3-16.
74. Accueil Plateau technique de cytométrie en flux [Internet]. Disponible sur: <https://www.univ-reims.fr/urcacyt/urcacyt-plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html>
75. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584-797.
76. Ocqueteau M, Orfao A, García-Sanz R, Almeida J, Gonzalez M, Miguel JFS. Expression of the CD117 antigen (C-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol*. 1996;95(3):489-93.
77. Flanders A, Stetler-Stevenson M, Landgren O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood*. 8 août 2013;122(6):1088-9.
78. Flores-Montero J, Tute R de, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):61-72.
79. Arana P, Paiva B, Cedena M-T, Puig N, Cordon L, Vidriales M-B, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. *Leukemia*. avr 2018;32(4):971-8.
80. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales M-B, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez 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. *J Clin Oncol*. 1 juin 2008;26(16):2737-44.
81. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol*. janv 1980;8(1):103-7.
82. Nadav L, Katz B-Z, Baron S, Yossipov L, Polliack A, Deutsch V, et al. Diverse niches within multiple myeloma bone marrow aspirates affect plasma cell enumeration. *Br J Haematol*. juin 2006;133(5):530-2.

83. Vagnoni D, Travaglini F, Pezzoni V, Ruggieri M, Bigazzi C, Dalsass A, et al. Circulating plasma cells in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma as a possible prognostic marker for patients with standard-risk cytogenetics. *Br J Haematol.* août 2015;170(4):523-31.
84. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Puig N, Contreras-Sanfeliciano T, Pontes R, Corral-Mateos A, et al. Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy. *Blood.* 12 déc 2019;134(24):2218-22.
85. Barnett D, Storie I, Wilson GA, Granger V, Reilly JT. Determination of leucocyte antibody binding capacity (ABC): the need for standardization. *Clin Lab Haematol.* 1998;20(3):155-64.
86. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M, Christophersen MK, Johnsson E, Turesson I, et al. Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood.* 27 févr 2014;123(9):1336-40.
87. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(1):26-30.
88. Einwallner E, Subasic A, Strasser A, Augustin D, Thalhammer R, Steiner I, et al. Lysis matters: Red cell lysis with FACS Lyse affects the flow cytometric enumeration of circulating leukemic blasts. *J Immunol Methods.* 30 avr 2013;390(1):127-32.
89. Morice WG, Hanson CA, Kumar S, Frederick LA, Lesnick CE, Greipp PR. Novel multi-parameter flow cytometry sensitively detects phenotypically distinct plasma cell subsets in plasma cell proliferative disorders. *Leukemia.* sept 2007;21(9):2043-6.
90. Genuardi E, Barbero D, Dogliotti I, Mantoan B, Drandi D, Gambella M, et al. Ficoll-hypaque separation vs whole blood lysis: Comparison of efficiency and impact on minimal residual disease analysis. *Int J Lab Hematol.* avr 2018;40(2):201-8.
91. Soh KT, Tario JD, Hahn TE, Hillengass J, McCarthy PL, Wallace PK. Methodological considerations for the high sensitivity detection of multiple myeloma measurable residual disease. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020;98(2):161-73.
92. Zelnickova P, Faldyna M, Stepanova H, Ondracek J, Kovaru F. Intracellular cytokine detection by flow cytometry in pigs: Fixation, permeabilization and cell surface staining. *J Immunol Methods.* 31 oct 2007;327(1):18-29.
93. Tembhare PR, Ghogale S, Tauro W, Badrinath Y, Deshpande N, Kedia S, et al. Evaluation of CD229 as a new alternative plasma cell gating marker in the flow cytometric immunophenotyping of monoclonal gammopathies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(3):509-19.
94. Dold SM, Riebl V, Wider D, Follo M, Pantic M, Ihorst G, et al. Validated single-tube multiparameter flow cytometry approach for the assessment of minimal residual disease in multiple myeloma. *Haematologica.* 2 avr 2020;105(10):e523-e523.
95. Spears MD, Olteanu H, Kroft SH, Harrington AM. The immunophenotypic stability of plasma cell myeloma by flow cytometry. *Int J Lab Hematol.* 1 oct 2011;33(5):483-91.

96. Cao W, Goolsby CL, Nelson BP, Singhal S, Mehta J, Peterson LC. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol.* juin 2008;129(6):926-33.
97. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 1 mars 2008;93(3):431-8.
98. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n -dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* sept 2012;26(9):1908-75.
99. Paiva B, Montalbán MA, Puig N, Cordon L, Martinez-Lopez J, Ocio EM, et al. Clinical Significance of Sensitive Flow-MRD Monitoring in Elderly Multiple Myeloma Patients on the Pethema/GEM2010MAS65 Trial. *Blood.* 6 déc 2014;124(21):3390-3390.
100. Ise T, Nagata S, Kreitman RJ, Wilson WH, Wayne AS, Stetler-Stevenson M, et al. Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma. *Leukemia.* janv 2007;21(1):169-74.
101. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* sept 2012;26(9):1908-75.
102. Takamatsu H, Yoroidaka T, Fujisawa M, Kobori K, Hanawa M, Yamashita T, et al. Correction to: Comparison of minimal residual disease detection in multiple myeloma by SRL 8-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube multiparameter flow cytometry. *Int J Hematol.* avr 2019;109(4):505.
103. Roshal M, Flores-Montero JA, Gao Q, Koeber M, Wardrope J, Durie BGM, et al. MRD detection in multiple myeloma: comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. *Blood Adv.* 9 mai 2017;1(12):728-32.
104. Carulli G, Tarasco A, Sammuri P, Ottaviano V, Domenichini C, Ciancia EM, et al. Assessment of response to therapy in multiple myeloma by multiparameter flow cytometry. Usefulness of an eight-color single tube with monoclonal antibodies in dried formulation. *Clin Ter.* oct 2019;170(5):e352-6.
105. Oberle A, Brandt A, Alawi M, Langebrake C, Janjetovic S, Wolschke C, et al. Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection. *Haematologica.* sept 2017;102(9):e368-70.
106. Banham AH, Turley H, Pulford K, Gatter K, Mason DY. The plasma cell associated antigen detectable by antibody VS38 is the p63 rough endoplasmic reticulum protein. *J Clin Pathol.* juin 1997;50(6):485-9.
107. Courville EL, Yohe S, Shivers P, 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.* 2 janv 2020;153(2):221-8.
108. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity.* 1 août 2006;25(2):225-36.

109. Shaffer AL, Emre NCT, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, et al. IRF4 Addiction in Multiple Myeloma. *Nature*. 10 juill 2008;454(7201):226-31.
110. Wang H-W, Lin P. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis in the Diagnosis and Prognostication of Plasma Cell Neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(5):338-50.
111. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol*. 2017;8:1603.
112. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep PR*. févr 2009;61(1):22-32.
113. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Pérez JJ, Puig N, Paiva B, 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.
114. 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*. 5 oct 2020;
115. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. mars 2008;93(3):431-8.
116. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 1 nov 2002;100(9):3095-100.
117. Landgren O, Gormley N, Turley D, Owen RG, Rawstron A, Paiva B, et al. Flow cytometry detection of minimal residual disease in multiple myeloma: Lessons learned at FDA-NCI roundtable symposium. *Am J Hematol*. 2014;89(12):1159-60.
118. Roshal M. Measurable disease evaluation in patients with myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 1 mars 2020;33(1):101154.
119. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):31-9.
120. Oldaker TA, Wallace PK, Barnett D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. janv 2016;90(1):40-6.
121. Keeney M, Wood BL, Hedley BD, DiGiuseppe JA, Stetler-Stevenson M, Paietta E, et al. A QA Program for MRD Testing Demonstrates That Systematic Education Can Reduce Discordance Among Experienced Interpreters. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(2):239-49.
122. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. oct 2017;31(10):2094-103.
123. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. janv 2016;90(1):31-9.

124. Kriegsmann K, Hundemer M, Hofmeister-Mielke N, Reichert P, Manta C, Awwad M, et al. Comparison of NGS and MFC Methods: Key Metrics in Multiple Myeloma MRD Assessment. *Cancers*. 18 août 2020;12:2322.
125. Wang N, Tesfaluul N, Li J, Gao X, Liu S, Yue B. Enrichment of circulating myeloma cells by immunomagnetic beads combined with flow cytometry for monitoring minimal residual disease and relapse in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*. déc 2019;98(12):2769-80.
126. Ghose J, Viola D, Terrazas C, Caserta E, Troadec E, Khalife J, et al. Daratumumab induces CD38 internalization and impairs myeloma cell adhesion. *Oncolmmunology*. 3 oct 2018;7(10):e1486948.
127. Requirand G, Robert N, Boireau S, Vincent L, Seckinger A, Bouhya S, et al. BrdU incorporation in multiparameter flow cytometry: A new cell cycle assessment approach in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. mai 2019;96(3):209-14.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2019/2020

Nom : BOUCHEZ
Prénom : Geoffrey

**Titre de la thèse : ETAT DE L'ART DU SUIVI DE LA MALADIE RESIDUELLE DANS
LE MYELOME MULTIPLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE**

Mots-clés : Myélome multiple – Maladie résiduelle – Cytométrie en flux

Résumé : Le suivi de la maladie résiduelle dans les hémopathies comme le myélome multiple représente un outil intéressant permettant d'évaluer l'efficacité thérapeutique, de prédire le risque de rechute et commence à être utilisé dans la stratification thérapeutique. Les techniques disponibles doivent répondre à des exigences en termes de spécificité, de sensibilité et de rapidité de rendu des résultats. La méthode de référence est la biologie moléculaire mais c'est une technique qui reste assez coûteuse, n'est pas très rapide dans le rendu des résultats et n'est disponible que dans un nombre limité de laboratoire. L'objectif de ce travail est de présenter une technique de suivi de la MRD dans le myélome multiple par CMF multiparamétrique afin de la mettre en place par la suite en routine au laboratoire. Devant la variation des méthodologies constatée dans chaque laboratoire et surtout devant l'émergence de l'immunothérapie compliquant d'avantage l'étude la MRD, une recherche bibliographique sur l'ensemble des dernières directives publiées tout récemment a été faite à travers ce document. Enfin, afin de mettre en place cette technique au laboratoire, sa validation passe par un ensemble de tests à réaliser qui sont également détaillés.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH, CHRU de Lille

**Assesseur(s) : Madame le Professeur Agnès Charpentier, PH, GHICL
Monsieur le Docteur Salomon Manier, MCU-PH, CHRU de Lille**