HAL
open science

Traitement du myélome multiple par Daratumumab : interférence dans l'évaluation de la réponse biologique et apport de l'Hydrashift Sebia pour l'interprétation de l'immunofixation sérique

Florian Lussac-Sorton

To cite this version:

Florian Lussac-Sorton. Traitement du myélome multiple par Daratumumab : interférence dans l'évaluation de la réponse biologique et apport de l'Hydrashift Sebia pour l'interprétation de l'immunofixation sérique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02361129

HAL Id: dumas-02361129

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02361129

Submitted on 13 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2019 Thèse n°95

Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME d'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Mémoire du DIPLÔME d'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
de BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

par **LUSSAC-SORTON Florian**
né le 12/04/1990 à Tarbes

le 18/10/2019 à Bordeaux

Traitement du myélome multiple par Daratumumab : interférence dans l'évaluation de la réponse biologique et apport de l'Hydrashift Sebia pour l'interprétation de l'immunofixation sérique

Directeur de thèse

Docteur Anne SARRAT

Jury

Madame le Professeur Maria MAMANI-MATSUDA	PU	Présidente
Monsieur le Professeur Gérald MARIT	PU-PH	
Madame le Docteur Annie BERARD	MCU-PH	
Madame le Docteur Anne SARRAT	PH	

REMERCIEMENTS

À **Madame le Professeur Maria MAMANI-MATSUDA**, Professeur des Universités à l'UFR des Sciences pharmaceutiques de l'Université de Bordeaux : merci de me faire l'honneur et le plaisir de présider ce jury. Ce fut aussi un plaisir pour moi de recevoir votre enseignement durant mes études, et je garde un excellent souvenir des TP ainsi que de la préparation à l'internat, où vous nous avez transmis la formation en immunologie de manière toujours claire et attrayante. Merci de votre intérêt pour ce travail sur les immunoglobulines monoclonales, dont j'espère qu'il vous donnera satisfaction.

À **Monsieur le Professeur Gérald MARIT**, Professeur des Universités à l'UFR des Sciences médicales de l'Université de Bordeaux, et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux : merci de tout cœur pour votre aide et vos conseils tout au long de ce travail. Ce fut un vrai plaisir pour moi de collaborer avec vous à l'occasion de cette thèse, et j'ai toujours un vif intérêt à échanger avec les cliniciens qui m'apportent beaucoup pour appréhender la prise en charge des patients. Je me suis efforcé au travers de ce travail de me mettre au niveau des hématologues et de décrire avec justesse les aspects concrets de votre spécialité ; j'espère qu'il ne vous décevra pas. Je veux aussi vous dire toute mon admiration pour tout ce que vous avez toujours fait pour les patients atteints de myélome, dont je sais la reconnaissance qu'ils vous portent.

À **Madame le Docteur Annie BERARD**, Maître de Conférences des Universités à l'UFR des Sciences médicales de l'Université de Bordeaux, et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux : merci de tout cœur pour votre collaboration et votre aide depuis le début de ce projet. Ce fut un très grand plaisir de travailler avec vous à l'occasion de cette étude faisant interagir les laboratoires de Biochimie et d'Immunologie, et j'ai beaucoup apprécié la qualité de nos échanges. Je souhaite aussi vous remercier pour tout l'intérêt que vous portez à la formation des internes, et je garde un très bon souvenir de mon stage de biochimie parmi votre équipe. Merci enfin pour votre gentillesse constante et votre humanité, auxquelles je souhaite rendre un hommage appuyé.

À **Madame le Docteur Anne SARRAT**, Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux : merci infiniment de m'avoir accompagné et épaulé durant ce travail de thèse. Tu as toujours su me guider et me donner le cap, tout en me laissant la liberté et l'autonomie nécessaires au mûrissement de ce travail. Je te suis aussi très reconnaissant de ta très grande disponibilité ainsi que de la rapidité et de la clarté avec lesquelles tu as toujours répondu à mes nombreuses interrogations. J'ai eu un immense plaisir à travailler durant ces trois années en ta compagnie au cours de plusieurs projets successifs sur les dyscrasies plasmocytaires dans lesquels je vois une continuité, d'abord avec le plasmocytome puis le myélome et enfin l'interférence du Daratumumab. *In fine* je n'aurais pas pu imaginer meilleur directeur de thèse que toi.

À **Madame le Docteur Marie-Laure CURUTCHET-BURTIN**, Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier de la Côte Basque : je tiens à te remercier chaleureusement pour ta participation et ton intérêt pour ce travail bien que tu n'aies pas pu être présente pour le jury. Tu as été à l'initiative de ce projet en me suggérant de travailler sur l'interférence du Daratumumab et je t'en remercie. J'ai pris un très grand plaisir à travailler avec toi parmi l'équipe de l'hôpital de Bayonne, et je voudrais à travers ces lignes te remercier pour ta bonne humeur constante, ainsi que pour m'avoir donné le goût de l'Assurance Qualité et m'avoir amené à participer au DU de l'université Paris Descartes qui fut pour moi une excellente expérience.

À tous les biologistes qui ont participé et contribué à ma formation au cours de cet internat.
Une mention particulière pour : Jérôme Darreye, Franck Trimoreau, Véronique Dubois, Philippe Lehours, Julien Goret, Samir Mesli, Benoit Rucheton, Jean-François Moreau, ainsi que Mamy Ralazamahaleo et Jonathan Visentin.
Un très grand merci à toute l'équipe des biologistes du Centre Hospitalier de la Côte Basque, avec qui j'ai passé l'un de mes meilleurs semestres : Anne-Christine Jaouen, David Leyssene, Fanny Ménard-Deroure, Aguirre Mimoun, Yohan Benard, Marie-Laure Curutchet-Burtin, et Rémi Segues.

À Claudine Quentin-Noury, l'enseignante la plus inspirante qui m'ait instruit durant mes études, et sans qui je ne serais sans doute pas biologiste aujourd'hui.
« Faire ce qu'on aime, aimer ce qu'on fait »

À tous les techniciens de laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mon internat.
Un très grand remerciement en particulier à toute l'équipe d'Immunologie humorale, qui m'a permis de réaliser les tests pour cette étude : Johanna, Valérie, Émilie, Marie-Hélène, et Patricia.
Et un clin d'œil particulier à mes amies Kelly, Charlène, ainsi qu'au trio de choc d'Immunologie cellulaire (Myriam, Jean-Claude, et Kamal).

À tous mes cointernes et amis qui m'ont accompagné et soutenu durant cet internat. Je tiens à vous témoigner ici à quel point votre amitié compte à mes yeux.
Mention spéciale à : Camille (ma première cointerne et symbiote de parasitologie !) ; la formidable équipe d'hématologie de Limoges, avec Alice, Thibault, et Marine D, qui me sont très chers tous les trois ; l'équipe de bactériologie, avec nos Niveau 2 Célia (même si je n'étais pas ton externe préféré, je te remercie de tout cœur de me coacher comme tu le fais depuis toujours !), Laurent, Cécile J, et Muriel, et bien sûr mes super amis Marion et Ismaël, avec qui tout a commencé en se serrant les coudes en garde ! ainsi que ma fidèle amie ultra-marine Elvina ; mes cointernes de biochimie avec Alexandre, Tania, Émilie, et Élodie (compagne de mes aventures parisiennes en DU !) ; la géniale équipe d'immunologie, avec Cyrielle, Alexis, Julien, Lucie, Louis, Jean-Madeleine, et Peretz ; ainsi que mes amis d'hématologie-bis Jessica, Maxime, Cécile G, Aurélie, et Céline.

À tous ceux avec qui je n'ai jamais été cointerne mais qui n'en sont pas moins de très bons amis de l'hôpital : Jérémie, Pierre-Élian, Marine J, Charly, Paola, Florence, et Damien.
À tous mes amis de l'internat de Limoges enfin, avec qui j'ai fait mes débuts.

Aux cavaliers :
À mon groupe des éthologues, qui me tient beaucoup à cœur. Merci de tous les bons moments passés en votre compagnie, que ce soit en cours ou ailleurs (qui a dit apéro théorie ?). Mes remerciements les plus chaleureux à mes amies Marie, Juliette, Sophie, Isabelle, Agnès, Laura, Hélène, et Valérie ; ainsi qu'à Pascale, qui m'a fait connaître le club d'Espelette.

À tous les moniteurs qui ont m'ont formé au cours de mon parcours équestre, en particulier à Johanna et Maddi.

À mon maître Nathalie : milesker pour toute la formation que tu me dispenses depuis des années, que ce soit en technique équestre ou en connaissance du cheval. Bien que l'expérience ait montré à de nombreuses reprises que tu fusses une monitrice sadique, je tiens malgré tout à travers ces lignes à rendre hommage à tes grandes qualités pédagogiques. Merci Nat de ton amitié, de la considération que tu portes à tes élèves, et de tout ce que tu as fait et fais encore pour notre groupe.
Merci également au reste de la famille Larrarte : à Anne pour l'excellence intellectuelle de nos débats et discussions du dimanche, et à Frédérique pour ses conseils en matière de thèses.

À Jean-Christophe Comet : merci de m'avoir inculqué à travers votre école le goût de l'excellence, de la rigueur technique et de la performance. Merci de tout ce que vous avez toujours fait pour le club de Biarritz.

Aux escrimeurs de l'Anglet Olympique Escrime, pour leur accueil chaleureux.

À mon préparateur physique Jean-David, qui m'a permis de décompresser cette année grâce à la pratique sportive, et qui ce faisant a joué un rôle essentiel dans la réalisation de ce travail. Merci de m'avoir permis de me défouler en boxant à chaque fois que je m'énervais un peu trop sur cette rédaction !

À Sébastien, fidèle complice et confident, merci de ton soutien sans faille depuis des années et ce en dépit de la distance qui nous sépare. Nos échanges au cours desquels je peux tout te raconter revêtent une très grande importance à mes yeux. Merci pour ta patience, toi qui essuie tous mes questionnements et moments de doute, et merci pour ton amitié qui dure depuis près de 10 ans.

À Marc, merci de tout ce que tu m'as appris et du rôle que tu as joué dans mon parcours. J'espère pouvoir continuer à passer ces bons moments avec toi pendant encore longtemps.

Au père Pierre Dulon : merci de me permettre à travers nos échanges et nos débats d'élargir mes horizons hors du quotidien hospitalier. Merci pour votre regard toujours affuté sur les questions d'actualité et de société, ainsi que pour votre inentamable sens de l'humour. Merci enfin pour votre patience dans l'attente de cette soutenance de thèse, dont j'espère qu'elle vous donnera pleine satisfaction.

À mes parents, qui ont toujours tout fait pour que matériellement je ne manque de rien, je mesure les sacrifices qu'ils ont faits pour leurs enfants.

À mes sœurs, inénarrables acolytes et partenaires des univers virtuels.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 9

LISTE DES FIGURES 13

LISTE DES TABLEAUX 15

AVANT-PROPOS 16

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 18

A. Physiologie de la lignée lymphoïde B et des immunoglobulines 18
1) Hématopoïèse 18
2) Lymphopoïèse B 20
3) Activation dépendante de l'antigène 21
4) Structure, fonctions, et diversité des immunoglobulines 25

B. Les dyscrasies plasmocytaires 30
1) Stades asymptomatiques : MGUS et myélome multiple indolent 31
a) Dysglobulinémie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) non-IgM 31
b) Myélome multiple indolent (« smoldering ») 32
2) Myélome multiple 33
a) Épidémiologie 33
b) Physiopathologie 34
c) Manifestations cliniques 37
d) Critères diagnostiques 41
e) Pronostic 43
3) Autres dyscrasies plasmocytaires 45
a) Plasmocytome 45
b) Amylose AL 46
c) Syndrome POEMS 48
d) Leucémie à plasmocytes 49

C. Place des examens biologiques dans le diagnostic, pronostic, et le suivi du myélome 50
1) Examens biologiques à visée diagnostique 51
a) Myélogramme 51
1. Analyse cytomorphologique 51
2. Immunophénotypage par cytofluorométrie en flux 54
b) Électrophorèse des protéines sériques 57
c) Immunofixation sérique 59
d) Électrophorèse des protéines et immunofixation urinaires 61
e) Dosage des chaînes légères libres sériques 63
f) Hémogramme 64
g) Créatininémie 66
h) Calcémie 66
2) Examens biologiques à visée pronostique 67
a) International Staging System (ISS) : β_2-microglobuline et albumine 67
b) Lactate déshydrogénase (LDH) 67
c) Dosage des chaînes légères libres sériques 68
d) Examens cytogénétiques 68

3) Examens biologiques de suivi 70
a) Électrophorèse et immunofixation des protéines sériques 72
b) Électrophorèse et immunofixation des protéines urinaires 73
c) Dosage des chaînes légères libres sériques 74
d) Myélogramme 74
1. Analyse cytomorpholgique 74
2. MRD 75
a. Cytofluorométrie en flux 75
b. Séquençage de nouvelle génération 76
e) Hémoglobine, créatininémie, calcémie 77

D. Traitement du myélome et Daratumumab 77
1) Stratégies thérapeutiques dans le myélome 77
2) Le Daratumumab dans le traitement du myélome 81
a) Historique des essais cliniques 82
b) Présentation 84
c) Mécanisme d'action 84
d) Propriétés pharmacocinétiques 86
e) Effets indésirables 87
f) Administration 88
3) Interférences du Daratumumab sur les examens biologiques 90
a) Interférence sur l'EPS et l'IF sérique 90
b) Interférence sur la CMF multiparamétrique 91
c) Interférence sur les tests pré-transfusionnels d'immuno-hématologie 93

II. MATERIELS ET METHODES 96

A. Test Hydrashift 2/4 Daratumumab® 96
1) Historique : test DIRA 96
2) Principe de l'Hydrashift 98
3) Mode opératoire 99
4) Performances analytiques 101

B. Patients étudiés 102

C. Échantillons biologiques 104

D. Interprétation des profils 105

III. RESULTATS 106

IV. DISCUSSION 111

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 120

ANNEXE 126

Liste des abréviations

Ac : anticorps

ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*

ADCP : *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*

Ag : antigène

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASCT : *Autologous Stem Cell Transplantation*

BCMA : *B-Cell Maturation Antigen*

BCR : *B Cell Receptor*

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

BPCO : BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

CD : Cluster de Différenciation

CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément

CDR : *Complementary Determining Region*

CFU-GEMM : *Colony-Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte*

CGH-Array : *Comparative Genomic Hybridization-Array*

CHO : *Chinese Hamster Ovary*

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLL : Chaîne Légère Libre

CMF : cytométrie en flux

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRP : *C-Reactive Protein*

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

DIRA : *Daratumumab-specific Immunofixation electrophoresis Reflex Assay*

DTT : DiThioThréitol

EPS : Électrophorèse des Protéines Sériques

EPU : Électrophorèse des Protéines Urinaires

ESI-TOF : *ElectroSpray Ionization-Time Of Flight*

Fab : *Fragment Antigen Binding*

Fc : *Fragment Crystallizable*

FDA : *Food and Drug Administration*

FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*

G-CSF : *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GEP : *Gene Expression Profiling*

GFCH : Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GVH : *Graft Versus Host*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

IF : immunofixation

IFM : Intergroupe Francophone du Myélome

Ig : immunoglobuline

IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor-1*

IL : interleukine

IMiDs : *immunomodulatory imide drugs*, immunomodulateurs

IMWG : *International Myeloma Working Group*

IP : Inhibiteur du Protéasome

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

ISS : *International Staging System*

IV : IntraVeineux

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDH : Lactate DésHydrogénase

MALDI-TOF : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*

MALT : *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*

M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

MGG : May-Grünwald Giemsa

MGUS : *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MIP-1α : *Macrophage Inflammatory Protein-1α*

MRD : *Minimal Residual Disease*

MP : Maladie en Progression

MS : Maladie Stable

NCAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*

NFS : Numération-Formule Sanguine

NGF : *Next Generation Flow*

NGS : *Next Generation Sequencing*

OAF : *Osteoclasts Activating Factors*

PTH : *ParaThyroid Hormone*, parathormone

RAI : Recherche d'Anticorps Irréguliers

RANK-L : *Receptor Activator of NFκB-Ligand*

RBP : *Retinol Binding Protein*

RC : Réponse Complète

RCs : Réponse Complète stricte

RLP : Réactions Liées à la Perfusion

RM : Réponse Minimale

RP : Réponse Partielle

SAA : protéine Sérique Amyloïde A

SC : Sous-Cutané

SCF : *Stem Cell Factor*

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SIH : Système d'Information Hospitalier

SIL : Système d'Information du Laboratoire

SNP-Array : *Single Nucleotide Polymorphism-Array*

SPD : Somme des Produits des 2 plus grands Diamètres perpendiculaires

SSC : Surface Sous la Courbe

SSP : Survie Sans Progression

SUV : *Standard Uptake Value*

TBRP : Très Bonne Réponse Partielle

TDM : TomoDensitoMétrie

TdT : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TMDD : *Target-Mediated Drug Disposition*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VHB : Virus de l'Hépatite B

VS : Vitesse de Sédimentation

VZV : *Varicella-Zoster Virus*

<u>Protocoles de chimiothérapie</u> :

Vd = Bortézomib (VELCADE®) + Dexaméthasone

Kd = Carfilzomib (KYPROLIS®) + Dexaméthasone

Td = Thalidomide + Dexaméthasone

Rd = Lénalidomide (REVLIMID®) + Dexaméthasone

Pd = Pomalidomide + Dexaméthasone

VTd = Bortézomib (VELCADE®) + Thalidomide + Dexaméthasone

VRd = Bortézomib (VELCADE®) + Lénalidomide (REVLIMID) + Dexaméthasone

VPd = Bortézomib (VELCADE®) + Pomalidomide + Dexaméthasone

VCd = Bortézomib (VELCADE®) + Cyclophosphamide + Dexaméthasone

KRd = Carfilzomib (KYPROLIS®) + Lénalidomide (REVLIMID®) + Dexaméthasone

KPd = Carfilzomib (KYPROLIS®) + Pomalidomide + Dexaméthasone

KCd = Carfilzomib (KYPROLIS®) + Cyclophosphamide + Dexaméthasone

IRd = Ixazomib + Lénalidomide (REVLIMID®) + Dexaméthasone

RCd = Lénalidomide (REVLIMID®) + Cyclophosphamide + Dexaméthasone

PCd = Pomalidomide + Cyclophosphamide + Dexaméthasone

MP = Melphalan + Prednisone

VMP = Bortézomib (VELCADE®) + Melphalan + Prednisone

MPT = Melphalan + Prednisone + Thalidomide

DVd = Daratumumab + Bortézomib (VELCADE®) + Dexaméthasone

DRd = Daratumumab + Lénalidomide (REVLIMID®) + Dexaméthasone

DPd = Daratumumab + Pomalidomide + Dexaméthasone

D-VTD = Daratumumab + Bortézomib (VELCADE®) + Thalidomide + Dexaméthasone

D-VMP = Daratumumab + Bortézomib (VELCADE®) + Melphalan + Prednisone

ERd = Élotuzumab + Lénalidomide (REVLIMID®) + Dexaméthasone

DCEP = Dexaméthasone + Cyclophosphamide + Étoposide + Cisplatine

VDT-PACE = Bortézomib (VELCADE®) + Dexaméthasone + Thalidomide + Cisplatine + Doxorubicine (Adriamycine) + Cyclophosphamide + Étoposide

VAD = Vincristine + Doxorubicine (Adriamycine) + Dexaméthasone

PAD = Bortézomib + Doxorubicine (Adriamycine) + Dexaméthasone

Liste des figures

Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse

Figure 2 : Étapes de la lymphopoïèse B et évolution du phénotype

Figure 3 : Coopération Lymphocyte T CD4-Lymphocyte B

Figure 4 : Réaction du centre germinatif

Figure 5 : Structure d'une immunoglobuline

Figure 6 : Réarrangement des gènes des chaînes lourdes d'Ig

Figure 7 : Physiopathologie du myélome multiple

Figure 8 : Lésions osseuses du myélome

Figure 9 : Rein myélomateux sur biopsie rénale, coloration PAS

Figure 10 : Amylose sur biopsie rénale colorée au rouge Congo, avec biréfringence en lumière polarisée

Figure 11 : Infiltrat médullaire de plasmocytes matures de morphologie normale au cours du myélome multiple

Figure 12 : Variant lymphoplasmocytoïde

Figure 13 : Dystrophies nucléaires (associées à la malignité)

Figure 14 : Variations cytoplasmiques, non spécifiques du myélome

Figure 15 : Immunophénotypage des plasmocytes dans le myélome

Figure 16 : Électrophorèse des protéines sériques (gels et électrophorégrammes)

Figure 17 : Immunofixation sérique dans un myélome à Ig entière

Figure 18 : Électrophorèse des protéines et immunofixation urinaires associées sur un même gel, et électrophorégramme correspondant

Figure 19 : Épitope ciblé lors du dosage des CLL sériques

Figure 20 : Rouleaux d'hématies sur le frottis sanguin lors d'un myélome

Figure 21 : FISH interphasique sur plasmocytes myélomateux montrant une t(4 ;14)

Figure 22 : Critères IMWG d'évaluation de la réponse

Figure 23 : Stratégies thérapeutiques pour le traitement du myélome en 1ère ligne

Figure 24 : Évolution du myélome sous traitement avec alternance de rémissions et rechutes

Figure 25 : Stratégies thérapeutiques pour le traitement du myélome en rechute/réfractaire

Figure 26 : Mécanismes d'action du Daratumumab

Figure 27 : Profil pharmacocinétique du Daratumumab

Figure 28 : Influence du Daratumumab sur la détection des plasmocytes en CMF

Figure 29 : Interférence du Daratumumab sur le test de Coombs indirect

Figure 30 : DIRA, exemples de tests positif et négatif

Figure 31 : Principe de l'Hydrashift 2/4 Daratumumab®

Figure 32 : Préparation des applicateurs gris et verts et disposition dans l'automate Hydrasys 2

Figure 33 : Dates de prélèvement des sérums de l'étude cinétique en fonction de la séquence thérapeutique du patient

Figure 34 : Exemples de profils après Hydrashift

Figure 35 : Gels d'Hydrashift des 20 patients testés

Figure 36 : Gel avec comparaison Hydragel IF/Hydrashift

Figure 37 : Gels d'Hydragel IF de l'étude cinétique

Figure 38 : Gels d'Hydrashift de l'étude cinétique

Figure 39 : Algorithme d'utilisation de l'Hydrashift en routine

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anomalies cytogénétiques et stratification du risque dans le myélome

Tableau 2 : Classification ISS révisée (R-ISS)

Tableau 3 : Historique des essais cliniques évaluant le Daratumumab dans le myélome

Tableau 4 : Résultats des tests d'Hydrashift sur 20 sérums de patients

Tableau 5 : Ac monoclonaux thérapeutiques et risque d'interférence sur l'EPS et l'IF sérique

Avant-propos

Le myélome multiple figure parmi les plus fréquents des cancers hématologiques, et siège à la deuxième place des hémopathies après les lymphomes non hodgkiniens. Maladie du sujet âgé, il concerne un nombre croissant de patients avec le vieillissement de la population. Son retentissement clinique, à la fois rhumatologique, hématologique, néphrologique s'avère très invalidant et impacte fortement la qualité de vie des malades. Le myélome se distingue au sein des hémopathies malignes en ce qu'il n'existe toujours à l'heure actuelle aucun traitement curatif de la maladie ; après une alternance de phases de rémission et d'évolution, l'échappement de la maladie aux thérapeutiques anticancéreuses est presque toujours inéluctable et l'issue fatale pour le sujet.

L'objectif pour le médecin hématologue sera donc d'amener le patient à la meilleure Réponse Complète (RC) possible, et de la maintenir le plus longtemps possible en retardant les rechutes. L'attente est forte du côté des patients pour de nouveaux traitements, dans l'espoir un jour d'une guérison totale de la maladie. La prise en charge thérapeutique a déjà beaucoup évolué depuis le début des années 2000, avec l'utilisation des immunomodulateurs (IMiDs) et la découverte des inhibiteurs du protéasome, allongeant de façon notable l'espérance de vie des malades (pouvant atteindre plus de 10 ans) et améliorant leur qualité de vie. Mais depuis 2013, c'est l'utilisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques dans le myélome qui suscite un nouvel engouement ; en effet, le premier anti-CD38 baptisé Daratumumab a montré une efficacité chez les patients en rechute et réfractaires aux traitements conventionnels, d'abord en monothérapie, puis a fortiori en association avec les traitements classiques. Initialement approuvé pour les patients ayant déjà reçu d'autres lignes de traitement, ses indications s'élargissent actuellement vers une utilisation de plus en plus précoce en première intention.

Mais face à cette utilisation croissante, l'emploi du Daratumumab pose aussi certains problèmes. Il interfère en effet dans l'interprétation de plusieurs examens de biologie médicale, nécessaires au suivi de la maladie, à l'évaluation de la réponse thérapeutique, ou à la prise en charge transfusionnelle du patient. De par sa nature même d'anticorps monoclonal de type IgG κ, il est susceptible d'apparaître sur l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines sériques, au même titre que l'immunoglobuline monoclonale pathologique dont la présence doit être recherchée et le taux évalué. Dans certains cas, le Daratumumab peut être confondu avec cette immunoglobuline pathologique, et sa détection sur ces tests peut alors

conduire à une surestimation de la maladie, voire à la méconnaissance d'une authentique Réponse Complète. Or le clinicien a besoin d'évaluer de façon la plus fine et la plus précise possible la réponse du patient au traitement afin d'adapter sa prise en charge. Par ailleurs, le Daratumumab peut aussi perturber l'immunophénotypage en cytométrie en flux qui trouve son utilité dans l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD), causant à l'inverse une sous-estimation du niveau de la maladie. Enfin il interfère aussi dans le bilan pré-transfusionnel, à l'occasion de la Recherche d'Anticorps Irréguliers (RAI), en masquant la présence de potentiels allo-anticorps, engendrant de fait un risque de réaction transfusionnelle grave.

Ces interférences biologiques du Daratumumab doivent être connues, et des moyens ont été recherchés pour permettre de s'en affranchir. Concernant l'immunofixation sérique (objet de ce travail), des tests ont été mis au point visant à déplacer le Daratumumab de sa position, de telle sorte qu'il ne gêne plus la lecture et ne puisse être confondu avec l'immunoglobuline pathologique. Expérimentale dans un premier temps avec le DIRA (*Daratumumab-specific Immunofixation electrophoresis Reflex Assay*), la technique a évolué vers un test automatisable standardisé et facile à mettre en œuvre, commercialisé par la société Sebia sous le nom d'Hydrashift 2/4 Daratumumab®. L'objet de cette thèse et mémoire de DES a été de tester le kit Hydrashift au CHU de Bordeaux sur une cohorte de patients atteints de myélome du service d'Hématologie clinique, et d'analyser ces résultats afin d'envisager une utilisation en routine et d'en déterminer les conditions (algorithme d'utilisation).

Dans une première partie de synthèse bibliographique, nous présenterons le sujet en évoquant les origines physiologiques des immunoglobulines et des plasmocytes, ainsi que la place du myélome multiple parmi les dyscrasies plasmocytaires. Nous détaillerons ensuite les examens biologiques nécessaires au diagnostic, au pronostic, et au suivi de la maladie et leur place respective dans la prise en charge. Enfin, nous évoquerons les stratégies thérapeutiques du myélome en insistant sur la place nouvelle du Daratumumab et les difficultés d'interprétation liées à ces interférences.

Dans une deuxième partie nous présenterons les matériels et les méthodes de l'étude menée au CHU de Bordeaux, à savoir la cohorte de patients atteints de myélome et le kit Hydrashift. La troisième partie exposera les résultats de l'étude. Enfin dans une dernière partie nous discuterons de la place de l'Hydrashift et de son utilité dans la prise en charge des patients traités par Daratumumab, de ses intérêts et limites, et statuerons sur les conditions de son utilisation en routine au CHU de Bordeaux.

I. Synthèse bibliographique

A. Physiologie de la lignée lymphoïde B et des immunoglobulines

En pathologie humaine, la production d'une immunoglobuline (Ig) de nature monoclonale est une singularité propre aux syndromes lymphoprolifératifs. Cette protéine anormale trouve sa source dans un variant clonal de la cellule physiologique qu'est le plasmocyte. Il constitue la différenciation terminale de la lignée lymphocytaire B qui débute avec l'hématopoïèse dans la moelle osseuse puis se poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires par la rencontre avec l'antigène (Ag) et la maturation en cellule productrice d'anticorps (Ac), capables de jouer le rôle d'effecteurs de la réponse immunitaire humorale.

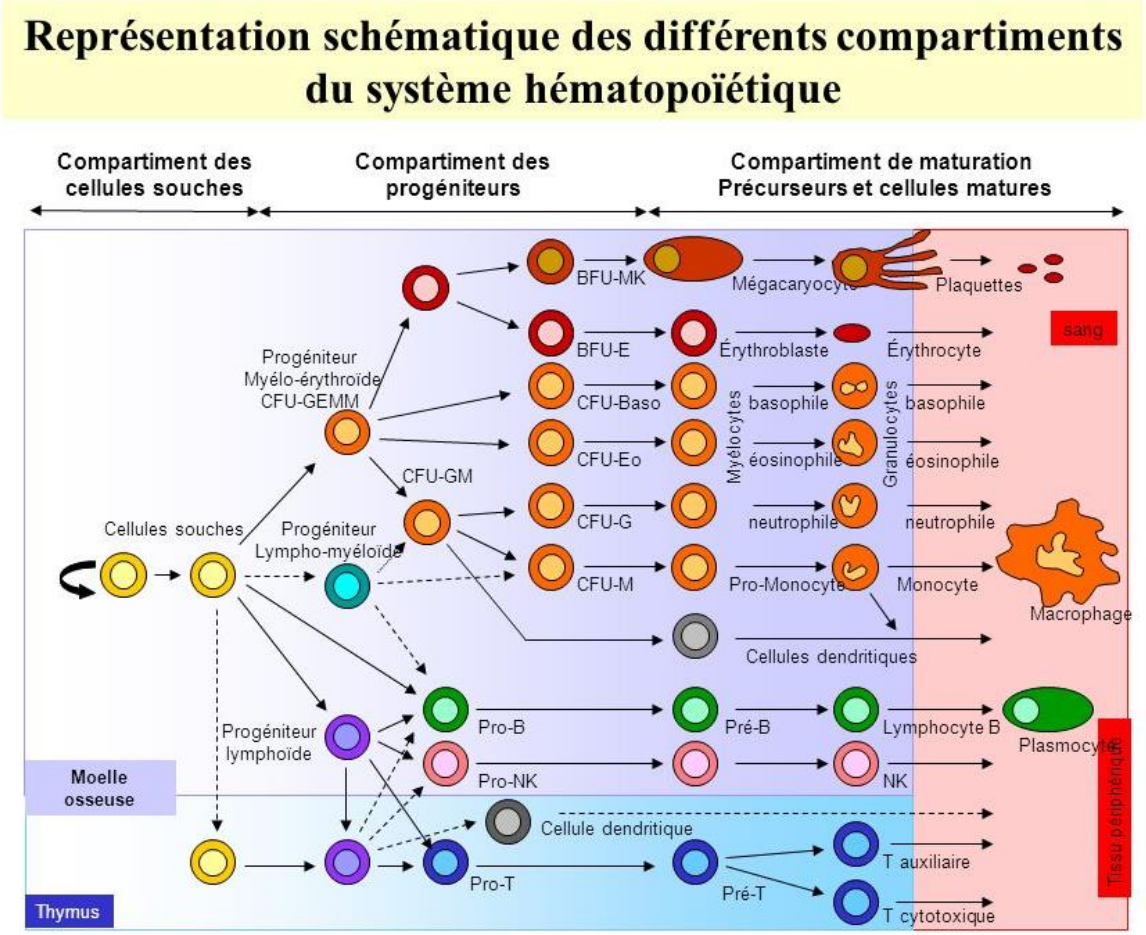
1) Hématopoïèse

L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique. À l'origine hépatique et splénique durant la vie fœtale, elle est de localisation exclusivement médullaire après la naissance, située dans les os courts et plats. Elle met en jeu plusieurs acteurs :

- les **cellules souches hématopoïétiques** (**CSH**) : douées de plusieurs propriétés :
  - auto-renouvellement
  - multipotence : peuvent donner naissance à toutes les cellules de l'hématopoïèse
  - capacité d'entrée en différenciation
- le **microenvironnement médullaire** : en interaction avec les CSH. Il est composé des cellules stromales (fibroblastes, cellules mésenchymateuses, cellules endothéliales des capillaires sinusoïdes, adipocytes…) et de la matrice extracellulaire.
- des **facteurs de croissance** : plus ou moins spécifiques de lignées selon qu'ils agissent précocement ou tardivement dans la différenciation. Les principaux sont : SCF (*Stem Cell Factor*), FLT3-L (*Fms-Like Tyrosine kinase 3-Ligand*), IL-3, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), IL-5, érythropoïétine, et thrombopoïétine[1].

La cellule souche hématopoïétique multipotente donne naissance à des progéniteurs, engagés en différenciation dans deux lignées distinctes :

- un **progéniteur commun myéloïde** (aussi appelé CFU-GEMM, *Colony-Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte*) : à l'origine de toutes les cellules de la lignée myéloïde, à savoir granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles, monocytes, érythrocytes, et thrombocytes
- un **progéniteur lymphoïde commun** : à l'origine de toutes les cellules de la lignée lymphoïde, c'est-à-dire les lymphocytes T, lymphocytes B, lymphocytes NK (*Natural Killer*), et certaines cellules dendritiques



<u>Figure 1</u> : Schéma général de l'hématopoïèse (d'après Fichelson, 2004)

Nous nous intéresserons exclusivement ici à la lignée lymphoïde, et plus particulièrement à la lignée lymphocytaire B, dont l'aboutissement est le plasmocyte producteur d'immunoglobulines.

2) Lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B se définit comme la production à partir d'une CSH de lymphocytes B qui vont exprimer à leur surface des immunoglobulines jouant le rôle de récepteur spécifique d'antigène, le **BCR** (*B Cell Receptor*). Cette production de lymphocytes B (encore naïfs avant toute rencontre avec l'antigène) a lieu dans la moelle osseuse, qui constitue à ce titre un **organe lymphoïde primaire** (tout comme le thymus pour les lymphocytes T).

La différenciation lymphocytaire B démarre à partir d'un progéniteur lymphoïde commun, capable de reconstituer toute la lignée lymphoïde (T, B, et NK). Puis à partir de ce progéniteur commun vont se séparer un progéniteur lymphoïde T qui va migrer vers le thymus, et un progéniteur lymphoïde B qui reste dans la moelle osseuse.

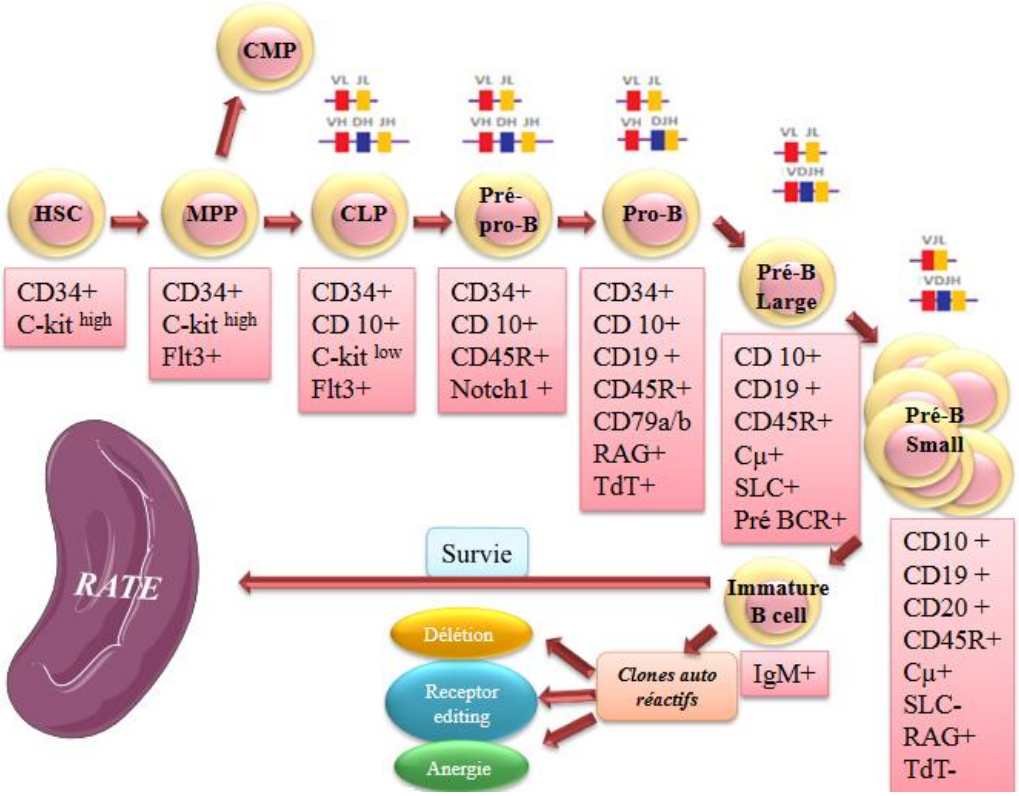
Plusieurs stades de développement de la lignée B vont alors se succéder[2] :

- le stade de **lymphocyte pré-pro B** : les gènes des immunoglobulines sont encore en configuration germinale, mais la cellule exprime déjà le CD79a (Cluster de Différenciation) sous forme intracytoplasmique.
- le stade de **lymphocyte pro-B** : débute le réarrangement des gènes IGH des chaînes lourdes d'immunoglobulines, aboutissant à l'expression de la chaîne lourde μ des IgM en intracytoplasmique. Le CD19 apparaît à ce stade.
- le stade de **lymphocyte pré-B** : expression membranaire d'un pré-BCR, composé des chaînes lourdes μ réarrangées et de pseudo-chaînes légères ψCL (Vpré-B/λ5). Ce pré-BCR joue un rôle essentiel dans la survie de la cellule et le passage au stade ultérieur, en protégeant de l'apoptose les lymphocytes ayant réussi le réarrangement de leurs chaînes lourdes. Le pré-BCR est également responsable des mécanismes de l'exclusion allélique (cf. infra). Le réarrangement des gènes des chaînes légères débute à ce stade.
- enfin le stade de **lymphocyte B naïf** : exprimant un BCR complet, fait de deux chaînes lourdes μ ou δ (ces lymphocytes co-expriment donc des IgM et des IgD membranaires) et de deux chaînes légères. Il est associé à un hétérodimère Igα/Igβ (CD79a/CD79b), qui sert d'unité de transduction du signal du BCR.

  Les lymphocytes B sont alors sujets à un processus de sélection négative, visant à éliminer par apoptose les cellules auto-réactives ayant une spécificité contre les

antigènes du Soi. Cette sélection ayant lieu alors qu'ils sont encore dans la moelle osseuse, on parle de tolérance centrale.

Les lymphocytes B ayant survécu à la sélection quittent alors la moelle osseuse pour circuler dans la périphérie et vont gagner les organes lymphoïdes secondaires où se déroulent les étapes suivantes de leur maturation.



<u>Figure 2</u> : Étapes de la lymphopoïèse B et évolution du phénotype (d'après Louail, 2013)

3) Activation dépendante de l'antigène

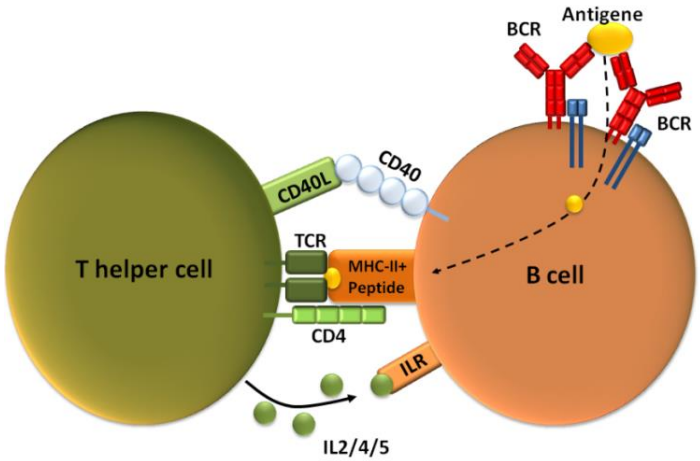
Les lymphocytes B néoformés dans la moelle osseuse doivent subir une maturation dans les **organes lymphoïdes secondaires** (**ganglions lymphatiques**, pulpe blanche de la **rate**, et **MALT** *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*), afin de devenir des effecteurs de la réponse immune humorale de forte affinité. Ces effecteurs terminaux seront soit des plasmocytes, soit des lymphocytes B mémoires.

Bien qu'étant localisés sur des sites anatomiques distincts, les organes lymphoïdes secondaires partagent tous une structure histologique sensiblement équivalente, faite d'une

organisation en follicules. Au sein de ces follicules, suite à la rencontre du lymphocyte B avec l'antigène complémentaire et à l'interaction avec un lymphocyte T de même spécificité vont se développer des structures particulières appelées **centres germinatifs**, siège de la maturation des cellules B. Cette étape est dépendante de l'antigène, mais également de la collaboration avec des lymphocytes T : on parle de **réponse immune T-dépendante**.

La rencontre du lymphocyte B avec l'antigène complémentaire aura lieu soit dans les tissus périphériques, suivie d'une migration vers l'organe lymphoïde secondaire, ou bien directement dans cet organe lymphoïde, l'antigène ayant été phagocyté et apporté par une **Cellule Présentatrice d'Antigène** (CPA) : cellule dendritique ou macrophage.

Ceci engendre l'activation du BCR du lymphocyte B ; mais cette activation ne sera complète que si un contact et une collaboration sont établis avec un **lymphocyte T CD4** de même spécificité antigénique. Le lymphocyte B internalise l'Ag puis l'apprête sur son CMH de classe II, afin de le présenter à son tour au lymphocyte T sur son TCR. Cette coopération est rendue possible par la liaison de plusieurs couples de ligands/récepteurs permettant une costimulation. Les plus importants sont l'interaction du CD28 du lymphocyte T avec les molécules B7 (CD80 et CD86) de la cellule B présentatrice, et l'interaction du CD40 du lymphocyte B avec le CD40L du lymphocyte T.



<u>Figure 3</u> : Coopération Lymphocyte T CD4-Lymphocyte B (d'après Ireland *et al.*, 2014)

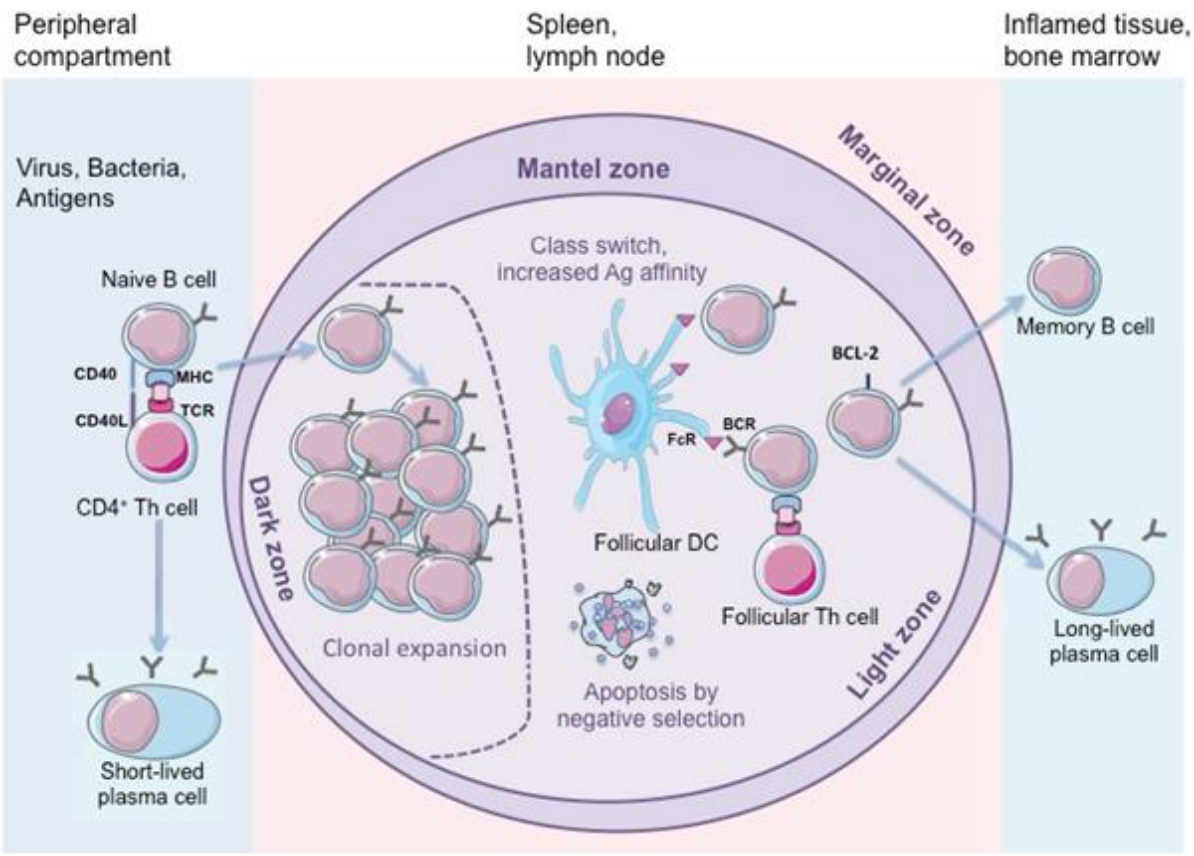
Après ce contact, certains lymphocytes B vont se différencier sur place en **plasmocytes à IgM**, à courte durée de vie et faible affinité. Il s'agit de la réponse immune humorale primaire. D'autres en revanche vont migrer vers le follicule comportant un centre germinatif. Cette structure est faite de deux zones séparées :

- une **zone sombre** : les lymphocytes B, prenant ici le nom de **centroblastes**, vont subir d'intenses mutations sur les régions variables des gènes de leur immunoglobuline ; ce phénomène est appelé **hypermutation somatique**. Il permet une modulation de l'affinité de l'Ig pour l'antigène, de manière aléatoire, et donc pour certains lymphocytes une augmentation de cette affinité.
- une **zone claire** : les lymphocytes B, devenus des **centrocytes**, vont interagir après la fin de l'hypermutation somatique avec des cellules dendritiques folliculaires leur présentant l'antigène. Ne seront alors sélectionnés que les lymphocytes ayant acquis une haute affinité pour l'antigène ; les autres (affinité inchangée ou diminuée) seront éliminés par apoptose.

  Puis une nouvelle interaction avec des lymphocytes T CD4 appelés T folliculaires *helper* (Tfh) a lieu dans cette zone claire, à l'origine du phénomène de **commutation isotypique** ou « *switch* ». Les gènes de la chaîne lourde d'Ig sont réarrangés avec un segment constant autre que μ, aboutissant au remplacement de l'IgM par une IgG, IgA, ou IgE. Ceci correspond à la réponse immune humorale secondaire, médiée donc par des IgG, IgA et IgE hyperaffines.

À la sortie du centre germinatif, les lymphocytes se différencient finalement soit en **lymphocytes B mémoires**, cellules à très longue durée de vie (jusqu'à plusieurs dizaines d'années) demeurant quiescentes mais capables de répondre très rapidement en cas de nouveau contact avec l'antigène, soit en **plasmocytes**, capables de sécréter des immunoglobulines solubles à l'extérieur de la cellule. Ces derniers sont donc à l'origine de toutes les immunoglobulines circulantes, caractérisées par la diversité de leur répertoire et leur hétérogénéité.

Dans les deux cas (différenciation en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes), les cellules dorénavant activées vont quitter l'organe lymphoïde secondaire pour recirculer, les plasmocytes ayant un tropisme préférentiel pour la moelle osseuse et les tissus inflammés[3].



<u>Figure 4</u> : Réaction du centre germinatif (d'après Aqrawi, 2014)

Les plasmocytes présentent au niveau de leurs antigènes de surface un phénotype caractéristique, avec l'expression combinée du CD38 et du CD138 :

- le **CD38** est une ecto-enzyme (ADP-ribosyl cyclase) impliquée dans la régulation du calcium intracellulaire. Il est largement répandu dans les différentes lignées hématopoïétiques (lignées myéloïdes, précurseurs lymphoïdes, et lymphocytes activés), mais présente la particularité d'être exprimé sur les plasmocytes de façon beaucoup plus intense.
- le **CD138** correspond au Syndécan-1, protéoglycane de la famille des héparanes sulfates servant à des fonctions d'adhésion. Il est totalement spécifique des plasmocytes au sein des lignées hématopoïétiques (mais peut cependant être retrouvé sur d'autres cellules extra-hématopoïétiques).

En plus de ces deux marqueurs, les plasmocytes conservent comme antigènes de la lignée lymphocytaire B le **CD19** et le **CD81** (qui sont des éléments du corécepteur du BCR). Ils

partagent également avec les lymphocytes B mémoires l'expression du **CD27**. Les plasmocytes expriment enfin de façon non spécifique le **CD45**, qui est un marqueur panleucocytaire.

4) Structure, fonctions, et diversité des immunoglobulines

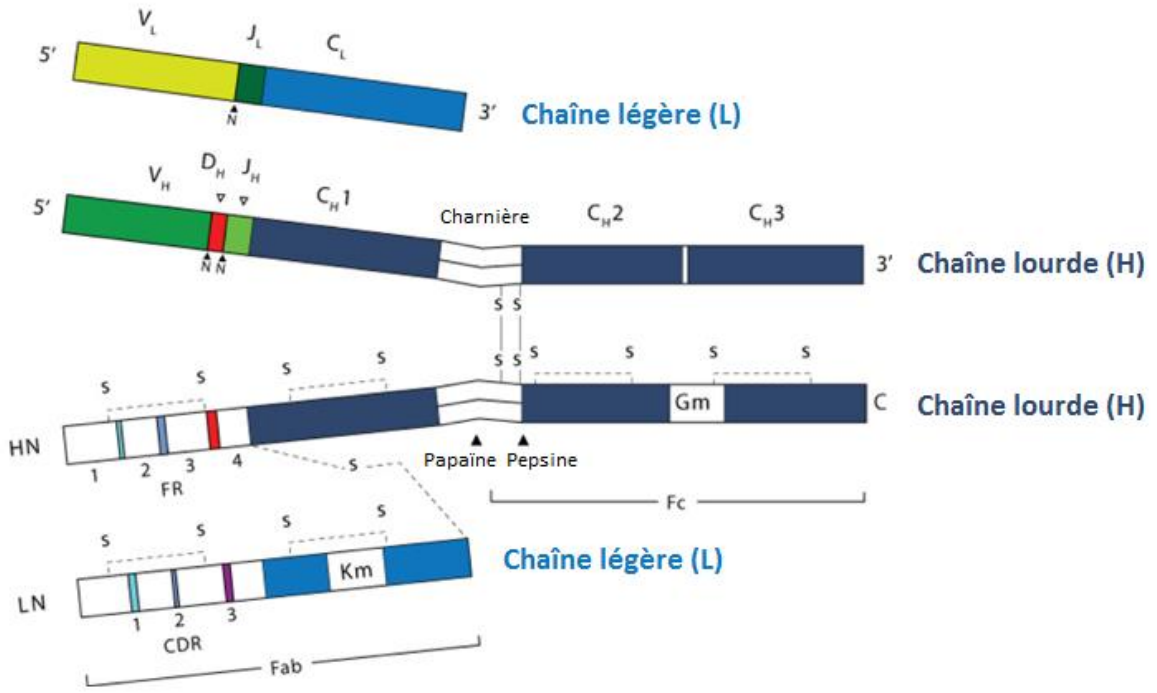
Les immunoglobulines, exprimées à la surface des lymphocytes B au sein du BCR puis sécrétées en grande quantité par les plasmocytes, constituent les effecteurs solubles de la réponse immune humorale. Ce sont des glycoprotéines possédant une activité anticorps à l'égard d'antigènes spécifiques, portée par un site de la molécule de nature variable appelé **paratope**.

Au plan structural, les immunoglobulines sont des molécules symétriques composées de 2 paires de chaînes homologues : **2 chaînes lourdes H** (*Heavy*), et **2 chaînes légères L** (*Light*), reliées par des ponts disulfures. Ces chaînes lourdes et légères sont subdivisées en plusieurs domaines : 4 ou 5 pour les chaînes lourdes (suivant l'isotype), et 2 pour les chaînes légères plus courtes[4].

Les Ig peuvent également être décomposées en une partie amino-terminale caractérisée par son extrême variabilité d'un anticorps à l'autre : domaines V_L (*Variable Light*) et V_H (*Variable Heavy*), et une partie à l'inverse très constante et conservée d'un anticorps à l'autre composée des domaines C_L (*Constant Light*) et C_H1, C_H2, C_H3 voire C_H4 (*Constant Heavy*).

Pour aller plus loin dans la structure, les domaines variables V_L et V_H des Ig sont en fait une alternance de régions peu variables dites charpentes (*framework*), et de régions hypervariables qui vont déterminer la complémentarité de liaison à l'antigène (appelées donc **CDR**, *Complementary Determining Regions*).

Le clivage enzymatique d'une molécule d'immunoglobuline donne les fragments suivants : 2 fragments **Fab** identiques servant pour la liaison à l'antigène (*Fragment Antigen Binding*), et un fragment cristallisable **Fc** (*Fragment Crystallizable*) qui est responsable des fonctions effectrices de la molécule[4]. Les fragments Fab sont composés des domaines V_L et C_L de la chaîne légère et V_H et C_H1 de la chaîne lourde, tandis que le fragment Fc est fait des domaines restants des chaînes lourdes C_H2, C_H3 voire C_H4.



<u>Figure 5</u> : Structure d'une immunoglobuline (d'après Schroeder et Cavacini, 2010)

La nature de la partie constante des chaînes lourdes d'immunoglobulines va définir 5 classes d'Ig appelées **isotypes** :

- les **IgG** : monomériques, elles constituent l'essentiel des immunoglobulines plasmatiques et la classe majoritaire de la réponse humorale secondaire. Elles se subdivisent en 4 sous-classes IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4, qui se différencient par leur taux plasmatique mais aussi par leur spécificité antigénique (IgG1 et IgG3 : antigènes bactériens et viraux protéiques, IgG2 : antigènes polysaccharidiques). Les sous-classes IgG1, IgG2, et IgG3 ont également la capacité de fixer le complément.
- les **IgA** : elles représentent la deuxième classe en abondance dans le plasma mais sont majoritaires dans les sécrétions muqueuses (salive, larmes, colostrum, lait, sécrétions bronchiques et uro-génitales). Elles sont monomériques ou bien dimériques (forme majoritaire dans les sécrétions), reliées alors par une chaîne de jonction J. Les dimères d'IgA sécrétoires sont synthétisés par les plasmocytes sous-épithéliaux, et sont associés à la pièce sécrétoire qui permet leur transport au travers de la barrière épithéliale et les protège de la protéolyse. Les IgA se subdivisent en 2 sous-classes, les IgA1 (majoritaires dans le plasma) et les IgA2 (majoritaires dans les sécrétions).

- les **IgM** : elles sont exprimées à la surface des lymphocytes B naïfs non commutés au sein du BCR, et sous forme sécrétée constituent la classe majoritaire de la réponse humorale primaire. Elles ont une structure pentamérique, et sont reliées entre elles par la chaîne J. Leurs chaînes lourdes comportent 4 domaines constants. Les IgM fixent également le complément.
- les **IgD** : elles sont fréquemment retrouvées comme les IgM à la surface des lymphocytes B naïfs, et sous forme sécrétée représentent moins de 1 % des immunoglobulines plasmatiques. Ce sont des monomères, dont la fonction biologique exacte n'est pas connue à l'heure actuelle.
- les **IgE** : monomères dont la chaîne lourde comporte 4 domaines constants. Dans le plasma elles ne sont présentes qu'à l'état de traces, mais sont surtout fixées à la surface des mastocytes et polynucléaires basophiles via un récepteur de haute affinité (FcεRI). Elles sont impliquées dans l'immunité antiparasitaire contre les helminthes et sont responsables des réactions allergiques d'hypersensibilité immédiate.

Associés à ces 5 isotypes de chaînes lourdes n'existent que 2 types possibles de chaînes légères : **κ** (**kappa**) ou **λ** (**lambda**). Les chaînes légères κ sont plus abondantes que les λ, avec un rapport de 2/1.

Les anticorps exercent des fonctions effectrices par plusieurs mécanismes. Leur action peut passer par le fragment Fab, permettant la **neutralisation** des agents infectieux (blocage des protéines microbiennes ne pouvant plus interagir avec les récepteurs de l'hôte). Mais elle est aussi principalement médiée par le fragment Fc :

- **opsonisation** : phagocytose facilitée d'antigènes par les polynucléaires et les monocytes/macrophages lorsqu'ils sont recouverts d'anticorps
- **cytotoxicité dépendante du complément (CDC)** : activation de la voie classique du complément lorsque des anticorps sont fixés sur un antigène cellulaire, aboutissant à la formation du Complexe d'Attaque Membranaire et à la lyse cellulaire
- **cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)** : lorsque des anticorps sont fixés à des antigènes cellulaires, liaison par leur fragment Fc au récepteur FcR des lymphocytes NK, polynucléaires, et monocytes/macrophages (exemple : IgG et FcγRIII = CD16), aboutissant à la lyse de la cellule par des facteurs cytotoxiques (exemple : perforine-granzyme)

Les immunoglobulines se caractérisent par la diversité de leur répertoire ; en effet il est nécessaire d'avoir une couverture la plus large possible face à l'hétérogénéité des antigènes susceptibles d'être rencontrés. Des mécanismes génétiques survenant durant la lymphopoïèse B permettent d'obtenir cette diversité du répertoire des immunoglobulines (théoriquement, jusqu'à 10^9 Ig différentes), à partir d'un nombre restreint de gènes à l'origine.

Le locus des gènes codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGH) est situé sur le **chromosome 14**. Ce locus comprend des gènes de trois types : $\mathbf{V_H}$ (Variable), $\mathbf{D_H}$ (Diversité), et $\mathbf{J_H}$ (Jonction), ainsi que 9 gènes constants C_H définissant les 9 classes et sous-classes des Ig (γ1, γ2, γ3, γ4, α1, α2, μ, δ, ε). Pour les chaînes légères, le locus des gènes codant pour les chaînes légères κ (IGK) est situé sur le **chromosome 2**, celui des chaînes légères λ (IGL) sur le **chromosome 22**. La succession des gènes est similaire sauf qu'il n'y a pas de gènes D de diversité, uniquement des gènes $\mathbf{V_L}$ et $\mathbf{J_L}$.

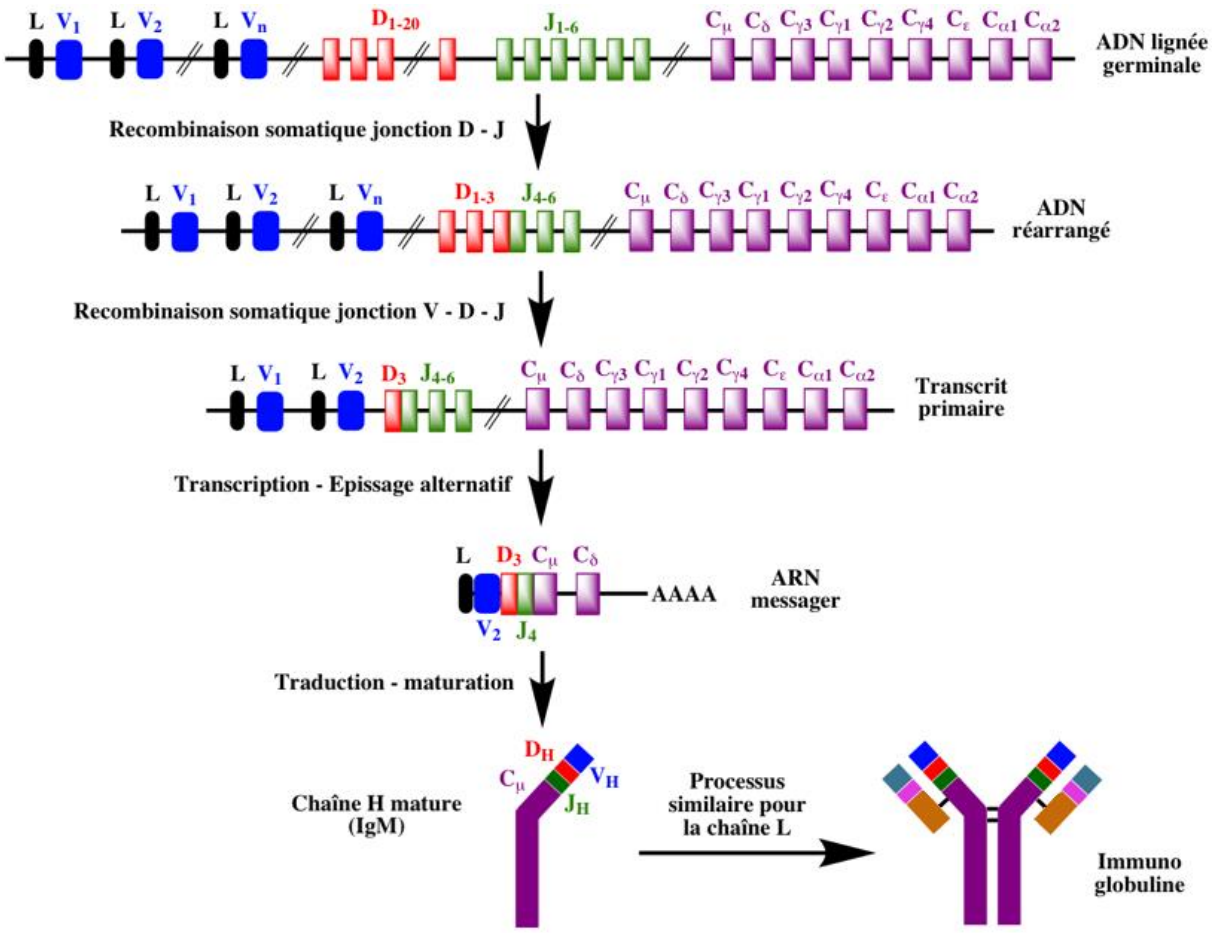
Des réarrangements génomiques aléatoires ont lieu au cours de la lymphopoïèse B, avec formation de boucles entre des gènes lointains et excision de l'ADN intermédiaire, visant à sélectionner une seule combinaison de gènes de variabilité parmi tout l'éventail offert. On parle de **diversité combinatoire**. Les gènes de la chaîne lourde sur le chromosome 14 sont réarrangés en premier. Une première étape permet de rapprocher un gène J_H d'un gène D_H. Puis dans un second temps, le segment DJ est rapproché d'un gène V_H, ceci aboutissant à la transcription d'un segment VDJ associé au gène constant Cμ. La chaîne lourde entière est ainsi synthétisée. Elle est associée initialement au niveau membranaire du lymphocyte B à une pseudo-chaîne légère ψCL, formée des gènes Vpré-B et λ5, ceci constituant le pré-BCR nécessaire à la survie de la cellule.

Puis débute le réarrangement des chaînes légères : d'abord sur le chromosome 2 pour la chaîne κ, avec le rapprochement d'un gène J_L et d'un gène V_L et transcription avec le gène constant associé. Si le réarrangement de κ est productif (2/3 des cas), la synthèse s'arrête là ; sinon s'il est avorté (1/3 des cas) débute alors le réarrangement de la chaîne λ sur le chromosome 22, selon le même mécanisme. Il ne peut donc jamais y avoir en même temps une chaîne légère κ et une chaîne légère λ (exclusion isotypique), et ceci explique qu'il y ait 2 fois plus de chaînes κ que de chaînes λ.

Ces rapprochements de gènes font appel au plan moléculaire à des **recombinases** RAG1 et RAG2. Ces enzymes ne peuvent travailler que sur un seul allèle des chromosomes 14 et des chromosomes 2 ou 22. On parle d'**exclusion allélique**. Les réarrangements (chaînes lourdes

puis légères) sont tentés sur un premier allèle, s'ils réussissent et sont productifs le mécanisme s'arrête là, s'ils échouent c'est seulement alors que le deuxième allèle sera utilisé. Ce mécanisme interdit donc qu'un lymphocyte B exprime une double spécificité antigénique. Si tous les réarrangements échouent, alors la cellule meurt par apoptose.

Un autre mécanisme permet d'ajouter une diversité supplémentaire : il s'agit de la **diversité jonctionnelle**[4]. Ceci consiste en une insertion ou délétion de quelques nucléotides au niveau des jonctions entre gènes des régions variables des Ig. Est impliquée dans ce mécanisme une enzyme appelée **TdT** (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), qui n'est exprimée que durant les stades précoces de la lymphopoïèse B.



<u>Figure 6</u> : Réarrangement des gènes des chaînes lourdes d'Ig (d'après Jaspard, 2014)

Les immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes se caractérisent donc par leur diversité en situation physiologique. Cependant, suite à des anomalies génétiques survenant lors des étapes de maturation du lymphocyte B, un clone de plasmocytes peut émerger et proliférer aux dépens des autres. Ces erreurs génétiques entraînent des réarrangements chromosomiques, dont l'expression est une évolution vers la malignité, aboutissant à diverses pathologies néoplasiques appelées dyscrasies plasmocytaires.

B. Les dyscrasies plasmocytaires

Les néoplasies plasmocytaires constituent un spectre de pathologies dont le point commun est l'existence d'un clone de cellules B au stade terminal de leur différenciation (plasmocytes) productrices d'immunoglobulines commutées, et qui vont sécréter une unique immunoglobuline homogène dite **Ig monoclonale** (aussi appelée paraprotéine, ou protéine M). L'Ig monoclonale se caractérise par une identité structurale au niveau de l'isotype (mêmes chaînes lourdes et chaînes légères) et de l'idiotype (même paratope et donc spécificité Ac), se traduisant par une homogénéité de charge électrique.

Parmi ces hémopathies malignes, le myélome multiple constitue la plus fréquente. Il trouve son origine dans un état précancéreux non malin appelé dysglobulinémie monoclonale de signification indéterminée ou **MGUS** (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), susceptible d'évoluer vers la malignité dans un faible pourcentage de cas[5]. Même après une transformation néoplasique, la maladie peut ne pas s'accompagner de symptômes initialement et avoir une croissance très lente : on parle de **myélome multiple indolent** ou asymptomatique (« *smoldering* »). Le dernier stade de la maladie représente le **myélome multiple** actif devenu symptomatique (ou à fort risque de le devenir), qui requiert impérativement un traitement. On observe donc un continuum dans l'évolution de la maladie entre ces différents stades : MGUS/myélome multiple indolent/myélome multiple.

D'autres néoplasies plasmocytaires que le myélome sont moins fréquemment retrouvées : il s'agit notamment du plasmocytome (osseux ou extraosseux), des maladies de dépôts d'Ig monoclonales telles que l'amylose AL, du syndrome POEMS, ou de la leucémie à plasmocytes.

1) Stades asymptomatiques : MGUS et myélome multiple indolent

a) Dysglobulinémie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) non-IgM

Les MGUS non-IgM correspondent à une production par un clone plasmocytaire (contrairement à la majorité des MGUS à IgM qui proviennent d'un clone lymphoïde/lymphoplasmocytaire) d'une Ig monoclonale d'isotype IgG ou IgA, rarement IgD ou IgE, ou bien d'une chaîne légère libre (CLL) monoclonale, modérée en intensité et sans aucune répercussion clinique ni atteinte d'organe. Ceci est considéré comme un **état prénéoplasique** bénin, qui ne progresse pas vers la malignité dans la majorité des cas.

Rare chez le sujet jeune de moins de 40 ans, la MGUS devient un désordre fréquent à partir de 50 ans, rencontré chez 3-4 % de la population. Passé 70 ans, plus de 5 % des individus sont susceptibles d'être concernés[6].

Les patients n'ont aucun symptôme, aucune anomalie radiographique ni aucune anomalie biologique en dehors de la présence de l'Ig monoclonale, qui est souvent découverte fortuitement.

La MGUS à Ig entière non-IgM se définit selon les critères suivants (révisés en 2014 par l'IMWG, *International Myeloma Working Group*) : présence d'une **Ig monoclonale sérique de concentration < 30 g/L**, ET **plasmocytose médullaire < 10 %**, ET **absence d'atteinte d'organes** (c'est-à-dire critères CRAB : hyperCalcémie, insuffisance Rénale, Anémie, et lésions osseuses « *Bones* ») **ou d'amylose** attribuables à la prolifération plasmocytaire[5]. L'immunoglobuline monoclonale est dans environ 60 % des cas d'isotype IgG, dans 15 % des cas une IgA, dans moins de 1 % des cas une IgD ou une IgE, et elle est biclonale dans 3 % des cas[7].

Dans 20 % des cas restants, il s'agit d'une MGUS à CLL, qui se définit selon les critères IMWG 2014 suivants : **ratio des CLL sériques anormal avec taux augmenté de la chaîne légère impliquée**, ET **absence de chaîne lourde** à l'immunofixation, ET **CLL monoclonale urinaire < 500 mg/24h**, ET **plasmocytose médullaire < 10 %**, ET **absence d'atteinte d'organes** (critères CRAB) **ou d'amylose AL** attribuables à la prolifération plasmocytaire[5].

Dans la plupart des cas, les MGUS restent à niveau stable sans progression, mais dans une minorité de cas il peut y avoir évolution en néoplasies plasmocytaires malignes. Pour les

MGUS à Ig entières non-IgM, le taux d'évolution est de **1 % par an**, vers le myélome multiple ou bien le plasmocytome ou l'amylose. Cependant, il convient de nuancer ce risque en fonction de plusieurs paramètres ; Kyle et Rajkumar (2006) ont ainsi proposé de retenir trois facteurs de risque accru d'évolution vers la malignité : **concentration sérique d'Ig monoclonale ≥ 15 g/L, isotype non-IgG, et ratio des CLL sériques anormal**. Pour les MGUS à CLL, le taux d'évolution plus faible est de **0,3 % par an** vers le myélome à CLL ou l'amylose AL[7].

b) Myélome multiple indolent (« smoldering »)

Certains patients présentent une plasmocytose clonale patente au myélogramme et/ou une immunoglobuline monoclonale dans le sérum à taux assez élevé pour parler de myélome, mais n'ont cependant aucun signe clinique de la maladie (et ne présentent pas de biomarqueurs de malignité évocateurs de fort risque d'évolution) : il s'agit d'une forme à croissance lente de la pathologie appelée myélome multiple indolent ou asymptomatique. Environ 10 % des patients atteints de myélome sont découverts à ce stade asymptomatique[8].

Les critères définissant cette forme de la maladie, révisés par l'IMWG en 2014, sont : **Ig monoclonale sérique (IgG ou IgA) de concentration ≥ 30 g/L**, ou **protéine monoclonale urinaire ≥ 500 mg/24h**, et/ou **plasmocytose médullaire ≥ 10 % mais < 60 %** ; ET **absence d'évènements définissant le myélome** (critères cliniques CRAB ou biomarqueurs de malignité) ou d'amylose[5].

La maladie peut rester stable chez certains patients, mais elle est susceptible d'évoluer (beaucoup plus fréquemment qu'une MGUS) vers le myélome multiple symptomatique ou l'amylose. Le risque d'évolution est de **10 % par an durant les 5 premières années**, puis **3 % par an pendant les 5 années suivantes**, et enfin **1 % par an** passé 10 ans[8].

2) Myélome multiple

Le myélome multiple (anciennement appelé maladie de Kahler) est une prolifération tumorale de plasmocytes localisée dans la moelle osseuse et à caractère multifocal (**dissémination médullaire**). Une immunoglobuline monoclonale sérique et/ou urinaire est très fréquemment associée (sauf dans les rares myélomes non sécrétants). La prolifération plasmocytaire ainsi que la protéine monoclonale engendrent des atteintes d'organes responsables de la symptomatologie de la maladie.

a) Épidémiologie

Le myélome multiple représente 1 % des cancers, mais 10-15 % des néoplasies hématologiques ; il occupe la 2ème place des hémopathies malignes après les lymphomes non hodgkiniens[9]. L'incidence en France, en augmentation, est d'environ 7 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants[10].

On observe une légère prédominance masculine, avec un *sex ratio* de 1,1/1. L'incidence est deux fois plus élevée chez les populations afro-américaines par rapport aux caucasiens, et elle est à l'inverse plus faible chez les populations asiatiques, faisant évoquer des facteurs génétiques[11]. Les facteurs environnementaux pouvant favoriser le myélome restent mal connus ; ont été avancés comme facteurs de risque l'exposition à des toxiques tels que des pesticides, à des rayonnements ionisants, ou bien une stimulation antigénique prolongée (infections chroniques), mais les données épidémiologiques à ce sujet s'avèrent contradictoires[12].

Le myélome multiple est une maladie dont l'incidence augmente avec l'âge ; exceptionnelle avant 30 ans, elle touche dans 90 % des cas des **adultes de plus de 50 ans**, avec un âge médian au diagnostic d'environ 70 ans[10,11].

b) Physiopathologie

Le stade de la lignée lymphocytaire B auquel surviennent les anomalies génétiques à l'origine du myélome reste peu connu à l'heure actuelle. Il est vraisemblablement centrogerminatif ou post-centrogerminatif, c'est-à-dire postérieur aux hypermutations somatiques et à la commutation isotypique (puisque le myélome concerne dans la majorité des cas un plasmocyte commuté à IgG ou IgA). La cellule à l'origine de la maladie subit des anomalies génomiques responsables de l'émergence d'un clone, mais reste apte à migrer vers la moelle osseuse après différenciation en plasmocyte. Pour la majorité sinon la totalité des patients, on observe alors d'abord un état clonal bénin correspondant à la MGUS. Les mécanismes responsables de la transition ultérieure de la MGUS vers le myélome multiple indolent puis symptomatique sont peu connus ; ils impliqueraient de nouvelles anomalies génétiques secondaires (notamment sur le locus *MYC* et les gènes *RAS*) à l'origine de la prolifération cellulaire et de l'expression symptomatique de la maladie.

L'oncogenèse du myélome est par ailleurs caractérisée par une **évolution clonale** au cours du temps : en effet chez un même patient coexistent au sein de la même tumeur de multiples sous-clones, génétiquement hétérogènes et en compétition les uns avec les autres. La sélection de certains sous-clones dominants, notamment sous la pression du microenvironnement médullaire et des traitements administrés, est un mécanisme clé de la progression de la maladie et de la survenue des rechutes[13].

Les anomalies du génome plasmocytaire sont quasi-constantes dans le myélome (retrouvées chez plus de 90 % des patients au diagnostic[14]). Il s'agit d'anomalies cytogénétiques, numériques et/ou structurales, caractérisées par leur nombre élevé et leur complexité (ce qui les rapproche des cancers solides non hématopoïétiques) : un patient peut ainsi cumuler jusqu'à une quinzaine d'anomalies. En revanche, il n'a été mis en évidence parmi elles aucune anomalie récurrente qui soit spécifique ou constante dans le myélome. On distingue parmi les patients un groupe hyperdiploïde, représentant la majorité des myélomes et caractérisé par la présence de **trisomies** sur les chromosomes impairs : 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ; ainsi qu'un groupe non hyperdiploïde dont l'anomalie la plus courante correspond à des **translocations impliquant le locus IGH sur le chromosome 14** (position 14q32)**.** Les loci chromosomiques partenaires les plus fréquents de ces translocations sont les 5 suivants :

chromosomes 4, 6, 11, 16, et 20. Les autres anomalies génétiques rencontrées, survenant souvent secondairement au décours de la maladie, comprennent : la délétion/monosomie du chromosome 13, la délétion 17p (gène *TP53*), des anomalies sur le chromosome 1 (délétion 1p et gain 1q), des réarrangements du locus *MYC*, et des mutations des gènes *RAS*.

Conjointement aux anomalies génomiques plasmocytaires, on va retrouver des anomalies d'**interaction avec le microenvironnement médullair**e, à l'origine de l'expression clinique de la maladie. Ces interactions réciproques entre les plasmocytes tumoraux et les cellules de la niche hématopoïétique, sous forme de boucles cytokiniques autocrines et paracrines, jouent un rôle majeur dans la prolifération cancéreuse et dans l'ostéopathie associée au myélome.

Les cellules stromales produisent des facteurs de croissance dont le principal est l'**IL-6**, qui est responsable de la prolifération des plasmocytes et de leur survie. La production de cette cytokine est surtout paracrine par les cellules du microenvironnement, mais peut aussi être autocrine par les plasmocytes tumoraux eux-mêmes. Un autre facteur de croissance important des plasmocytes est l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*), qui les protège de l'apoptose[15].

Le myélome s'accompagne d'une maladie osseuse faite de lésions lytiques, dont le mécanisme est lié à une **hyperrésorption osseuse par les ostéoclastes**. Cette activation est causée par un ensemble de multiples cytokines produites par les plasmocytes malins, rassemblées sous le nom d'**OAF** (*Osteoclasts Activating Factors*). Parmi les plus importants de ces facteurs, on note la production de l'IL-6, une hypersécrétion du RANK-L (*Receptor Activator of NFκB-Ligand*) qui active les ostéoclastes, et une diminution de la synthèse d'ostéoprotégérine (OPG, qui complexe le RANK-L). On observe ainsi un déséquilibre caractéristique de la balance RANK-L/OPG[16]. D'autres molécules participent à ce phénomène, telles que MIP-1α (*Macrophage Inflammatory Protein*), l'IL-1β, ou le TNFα[17].

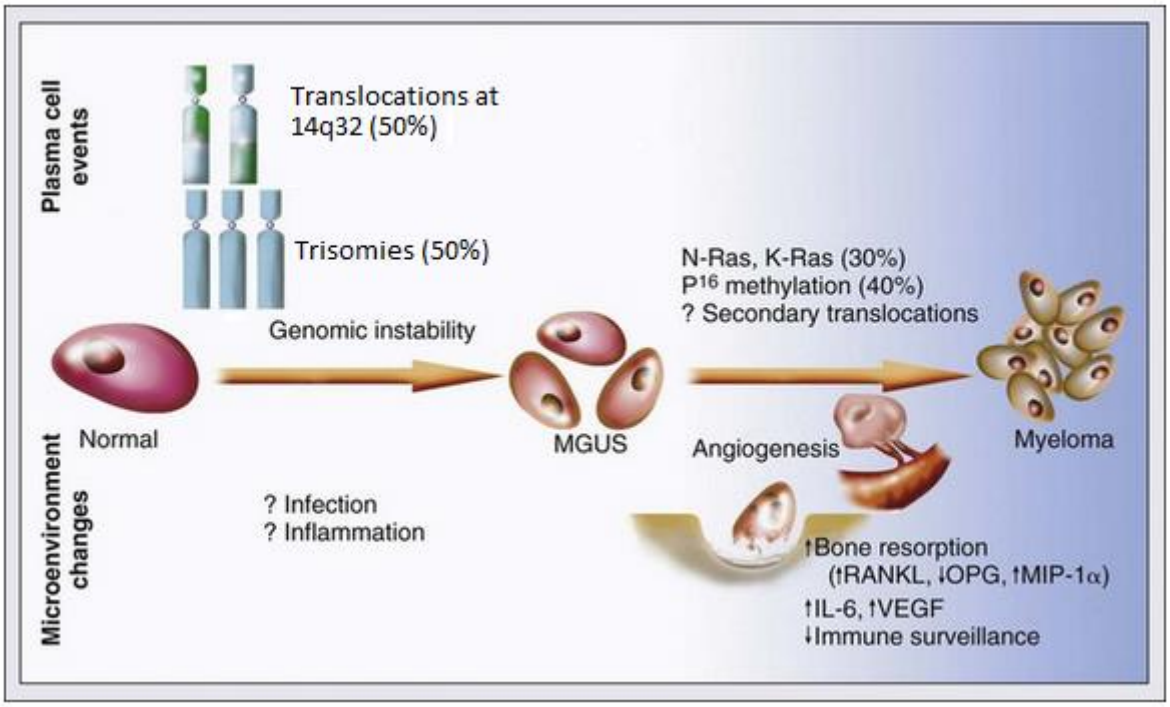
En parallèle de l'hyperrésorption ostéoclastique, on observe à l'inverse une **diminution de la formation osseuse** par les ostéoblastes. Les mécanismes en cause sont la production de la protéine DKK1 (inhibitrice de la voie Wnt de l'ostéogénèse), la sécrétion d'IL-3 et d'IL-7, et une inhibition du facteur RUNX2[17].

Le microenvironnement médullaire étant hypoxique à des degrés divers, il s'ensuit une sécrétion de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par les plasmocytes malins et les

cellules stromales permettant une **néoangiogénèse**, qui joue un rôle clé dans la croissance de la tumeur[15].

L'envahissement de la moelle par les plasmocytes engendre une diminution de l'hématopoïèse physiologique, se traduisant par des cytopénies sur les lignées sanguines dont la plus fréquente manifestation est l'**anémie**. D'autre part, on assiste aussi à une inhibition de la lymphopoïèse B physiologique, avec une répression de la synthèse des Ig polyclonales responsable d'une **hypogammaglobulinémie**.

Enfin, la synthèse même de l'Ig monoclonale par les plasmocytes tumoraux en quantité parfois massive va pouvoir être à l'origine d'une surcharge protéique dans le plasma, aboutissant dans certains cas à une **hyperviscosité**. Quant aux CLL produites en excès, elles vont être à l'origine d'une **néphrotoxicité** sur les tubules rénaux par précipitation intra-tubulaire.



<u>Figure 7</u> : Physiopathologie du myélome multiple (d'après Rajkumar, 2005)

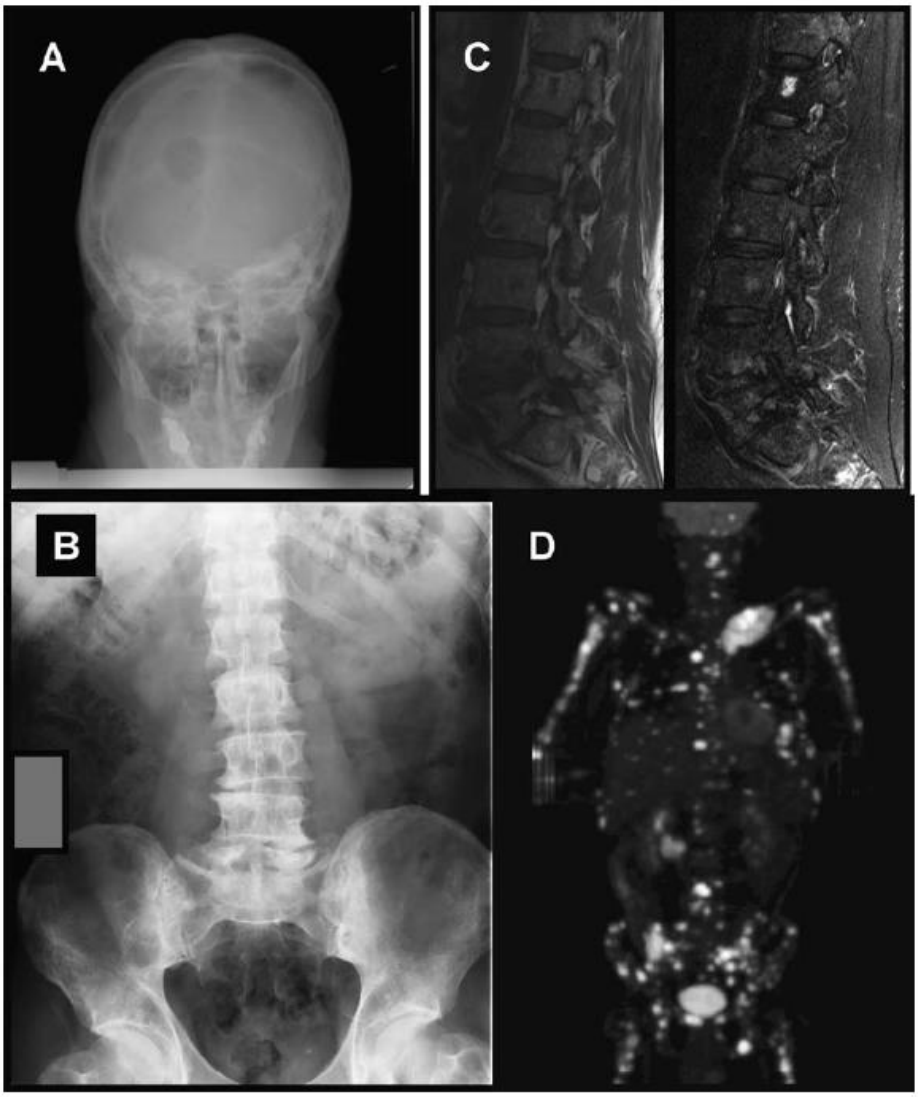
c) *Manifestations cliniques*

- **Signes généraux** : altération de l'état général (AEG), asthénie, pâleur, plus rarement perte de poids[11]. Ces symptômes sont la conséquence de l'**anémie**, présente dans environ deux-tiers des cas au diagnostic mais qui finit par s'installer chez quasiment tous les patients avec l'évolution de la maladie[18]. Elle est normocytaire normochrome arégénérative, et liée à l'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux inhibant l'hématopoïèse, mais aussi à un déficit en érythropoïétine consécutif à l'insuffisance rénale.

- **Atteinte osseuse** : la symptomatologie du myélome est dominée par la maladie osseuse ; environ 60 % des patients au diagnostic souffrent de douleurs osseuses persistantes et souvent sévères, tandis que l'imagerie objective des lésions osseuses chez près de 80 % d'entre eux [11]. Ces atteintes correspondent à des **lésions ostéolytiques** sous forme de lacunes « à l'emporte-pièce » ou géodes. Ces lésions peuvent s'accompagner d'ostéoporose, de fractures spontanées ou de tassements vertébraux. En revanche les aspects d'ostéocondensation sont à l'inverse très rares.

  L'ostéolyse concerne principalement le squelette axial et appendiculaire proximal, les principaux sites touchés étant les vertèbres, les côtes, le sternum, le crâne, la ceinture scapulaire, le bassin, et les os longs proximaux (humérus et fémur)[18]. Ceci correspond aux zones où l'hématopoïèse est la plus active.

  La **radiographie du squelette conventionnelle** est la technique historique de référence d'évaluation des lésions osseuses. Depuis la révision des critères diagnostiques du myélome en 2014 par l'IMWG, d'autres techniques d'imagerie modernes sont également recommandées en première intention pour évaluer l'atteinte osseuse et l'envahissement médullaire : il s'agit du **scanner** ou tomodensitométrie (TDM) corps entier faibles doses, du **TEP-scanner** (Tomographie par Émission de Positons), et de l'Imagerie par Résonnance Magnétique (**IRM**). Ces techniques sont plus sensibles que la radiographie conventionnelle, et peuvent mettre en évidence des lésions lytiques chez des patients présentant des douleurs osseuses qui seraient passées inaperçues sur la radiographie[5].



<u>Figure 8</u> : Lésions osseuses du myélome (d'après Dispenzieri et Kyle, 2005)

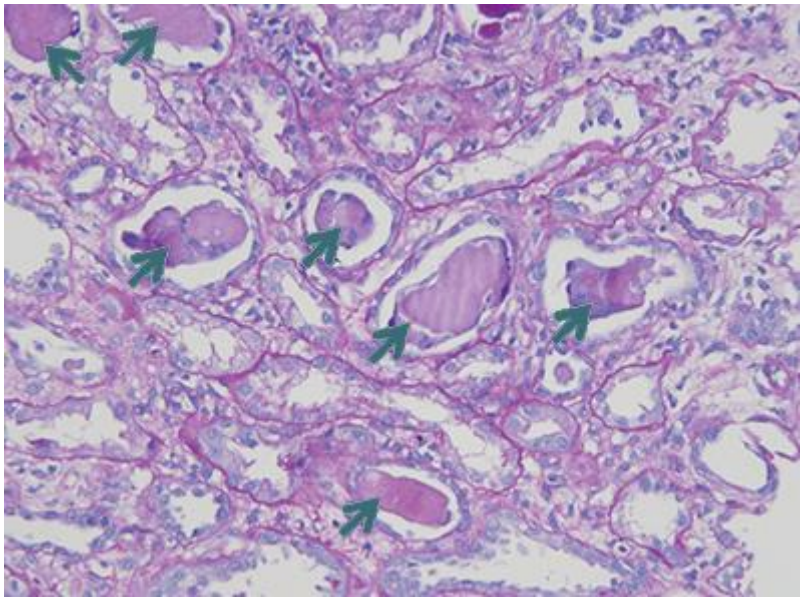
(A) Lésion lytique du crâne sur la radiographie ; (B) Lésions osseuses lytiques diffuses et tassements vertébraux sur la radiographie ; (C) Lésions osseuses à l'IRM, hyposignal T1, hypersignal T2 ; (D) Atteintes diffuses au TEP-Scan

- **Atteinte rénale** : au diagnostic, environ la moitié des patients atteints de myélome présentent une élévation de leur créatininémie au-dessus des valeurs normales, et 20 % d'entre eux ont un taux supérieur à 177 µmol/L (soit 20 mg/L)[11].

  La néphropathie caractéristique du myélome, appelée « **rein myélomateux** », est liée à l'excès de chaînes légères libres monoclonales produit en grandes quantités par les plasmocytes tumoraux (CLL d'accompagnement des myélomes à Ig entière, ou directement myélome à CLL ne produisant aucune chaîne lourde). En situation

physiologique, l'excès de CLL est métabolisé par le rein, filtré par le glomérule mais tout de suite réabsorbé par les tubules proximaux. Or dans le myélome la concentration plasmatique de CLL monoclonale est telle que le seuil de réabsorption tubulaire est dépassé (protéinurie de surcharge) ; la CLL passe dans les tubules distaux et collecteurs et précipite dans la lumière sous forme de cylindres hyalins (associée à la protéine de Tamm-Horsfall)[19], qui vont réaliser une obstruction des tubules et engendrer une réaction inflammatoire. Cette élimination dans l'urine de CLL monoclonales, autrefois appelée protéinurie de Bence Jones, va donc s'accompagner de lésions tubulo-interstitielles à l'origine d'une insuffisance rénale. La précipitation intra-tubulaire des CLL est favorisée par divers facteurs déclenchants, tels que la déshydratation, l'hypercalcémie, les infections, ou la prise de médicaments néphrotoxiques (AINS, aminosides, produits de contraste iodés…).

Les autres causes d'atteinte rénale au décours de l'évolution du myélome regroupent l'amylose AL, les maladies de dépôts d'Ig non amyloïdes (maladie de Randall), ou encore le syndrome de Fanconi acquis (anomalies du transport tubulaire proximal) associé aux CLL du myélome.



<u>Figure 9</u> : Rein myélomateux sur biopsie rénale, coloration PAS (d'après Lusco *et al.*, 2016)

Cylindres intra-tubulaires (flèches) et réaction inflammatoire cellulaire tubulo-interstitielle

- **Hypercalcémie** : il s'agit de la plus fréquente complication métabolique du myélome, retrouvée chez environ un tiers des patients[20]. Le mécanisme de l'hypercalcémie est lié à l'hyperrésorption osseuse par les ostéoclastes. Son expression clinique englobe des signes digestifs à type d'anorexie, de nausées et vomissements ou de constipation, des signes rénaux représentés par un syndrome polyuro-polydipsique (diabète insipide néphrogénique par résistance à l'ADH), des signes neuro-psychiques tels que confusion, fatigabilité musculaire, ou dépression, et des signes cardiaques avec des troubles du rythme marqués par un raccourcissement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme[20]. Elle est définie par un taux de calcium plasmatique > 2,75 mmol/L ou supérieur de plus de 0,25 mmol/L à la limite haute de la normale[5].

- **Hyperviscosité** : elle est retrouvée beaucoup plus rarement dans le myélome que dans la macroglobulinémie de Waldenström, chez seulement 2 à 6 % des patients[21]. Elle est plus fréquemment observée dans les myélomes à IgA que dans ceux à IgG, ceci pouvant s'expliquer par la capacité des IgA à polymériser. L'hyperviscosité plasmatique apparaît symptomatiquement lorsque la viscosité du plasma excède 4 ou 5 cP (pour une viscosité normale inférieure à 1,8 cP). Elle se manifeste par des signes généraux avec asthénie et dyspnée, des saignements cutanéo-muqueux, des signes ophtalmologiques avec baisse d'acuité visuelle (liés à une rétinopathie), des signes neurologiques tels que vertiges, céphalées, hypoacousie, et somnolence, et par une insuffisance cardiaque congestive liée à l'hypervolémie[21].

- **Manifestations neurologiques** : les signes neurologiques dans le myélome sont liés principalement à un mécanisme compressif consécutif aux fractures vertébrales, pouvant toucher les racines des nerfs rachidiens (compression radiculaire) ou la moelle épinière en elle-même (compression médullaire). La zone la plus fréquemment touchée est la moelle épinière thoracique. Les **compressions médullaires** concernent environ 5 % des patients, et se traduisent par des douleurs dorsales, une faiblesse voire une paralysie des membres inférieurs, et des troubles vésico-sphinctériens[22].

  Des neuropathies périphériques sont également retrouvées dans le myélome, le plus souvent causées par la toxicité des traitements (Thalidomide et Bortézomib) ou par des dépôts d'Ig en cas d'amylose AL coexistante.

Des symptômes neurologiques peuvent aussi être causés par les complications métaboliques du myélome comme l'hypercalcémie ou l'hyperviscosité.

- **Infections** : la survenue de maladies infectieuses récidivantes représente la principale cause de mortalité des patients atteints de myélome. Elle est liée au premier plan à l'hypogammaglobulinémie avec répression de la synthèse des Ig polyclonales, qui peut se compliquer d'une neutropénie suite à l'envahissement médullaire, auxquelles s'ajoute l'immunodépression liée aux traitements du myélome. Les infections sont surtout bactériennes ; tous les germes peuvent être en cause, les plus fréquents étant les bactéries encapsulées telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* (favorisées par le déficit de l'immunité humorale), ainsi que *Staphylococcus aureus* et les bacilles Gram négatif que sont les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. Les tableaux cliniques les plus courants correspondent à des pneumopathies et des pyélonéphrites, pouvant être le point de départ de septicémies.

  D'autre part, les nouvelles thérapeutiques et la pratique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques ont plus récemment favorisé l'émergence d'infections virales (réactivations d'*Herpesviridae*, viroses respiratoires) et fongiques (pneumocystose, aspergilloses invasives, candidoses) chez les patients traités.

d) Critères diagnostiques

Le diagnostic du myélome repose sur un faisceau d'arguments clinico-radio-biologiques. Les critères permettant de définir la maladie, énoncés par l'IMWG et révisés en 2014, font appel à des examens biologiques de laboratoire ainsi qu'à des techniques d'imagerie.

Les 2 critères suivants doivent être présents pour définir un myélome multiple :

- **plasmocytose médullaire clonale ≥ 10 %**, ou **plasmocytome** osseux ou extraosseux documenté sur biopsie

ET

- au moins un des évènements définissant le myélome suivants :

- ✓ au moins une atteinte d'organe attribuable à la prolifération plasmocytaire sous-jacente, à savoir (**critères CRAB**) :
  - hyper**C**alcémie : **calcium sérique > 2,75 mmol/L** (> 110 mg/L) ou **> de plus de 0,25 mmol/L** (10 mg/L) **à la limite haute des valeurs normales**
  - insuffisance **R**énale : **créatinine sérique > 177 µmol/L** (> 20 mg/L) ou **clairance de la créatinine < 40 mL/min**
  - **A**némie : **Hb < 10 g/dL** ou **< de plus de 2 g/dL à la limite basse des valeurs normales**
  - lésions osseuses (« ***B**one* ») : **au moins une lésion ostéolytique à la radiographie du squelette**, au **scanner**, ou au **TEP-scanner**

et/ou

- ✓ au moins un des **biomarqueurs de malignité** suivants :
  - **plasmocytose médullaire clonale ≥ 60 %**
  - **rapport des CLL sériques impliquée/non impliquée ≥ 100** (le taux de la CLL impliquée devant être ≥ 100 mg/L)
  - **plus d'une lésion focale à l'IRM** (d'au moins 5 mm de diamètre)

La révision des critères de 2014 se traduit par deux modifications principales dans le diagnostic du myélome multiple : tout d'abord l'actualisation des critères CRAB permet d'utiliser les techniques d'imagerie moderne (scanner, TEP-scanner, et IRM) pour définir l'atteinte osseuse et plus seulement la radiographie conventionnelle, ainsi que l'estimation du débit de filtration glomérulaire par la clairance de la créatinine pour définir l'atteinte rénale (car un même taux de créatininémie peut correspondre à des niveaux de dysfonction rénale très différents selon l'âge, le sexe, et le poids d'un patient), en excluant toute autre origine que le myélome aux atteintes d'organes observées.

D'autre part, l'instauration des nouveaux « biomarqueurs de malignité » a permis de reclasser en myélome des patients ne présentant encore aucun critère CRAB mais étant à très fort risque d'évolution vers le myélome symptomatique, et pour lesquels la mise en route d'un traitement ne peut être différée. Ceci traduit en fait l'hétérogénéité du groupe du myélome indolent, au sein duquel certains patients sont beaucoup plus proches de la MGUS alors que d'autres sont plus proches du myélome symptomatique[5].

e) Pronostic

Le myélome est à l'heure actuelle une maladie incurable d'évolution progressive, mais pour laquelle les nouveaux traitements ont significativement prolongé l'espérance de vie et amélioré la qualité de vie. Il s'agit d'une pathologie au **pronostic hétérogène**, la survie allant selon les patients de moins de 6 mois à plus de 10 ans (survie médiane d'environ 5 ans et demi[23]).

Différents biomarqueurs ont été utilisés afin de classer les myélomes en plusieurs catégories pronostiques. La classification de Salmon et Durie, élaborée il y a 40 ans, repose sur des paramètres radiologiques et biologiques simples facilement accessibles en pratique courante, qui reprennent les critères CRAB ainsi que le taux de protéine monoclonale sérique et urinaire ; elle n'est aujourd'hui plus utilisée. La **classification ISS** (*International Staging System*) qui lui a succédé exploite deux marqueurs biologiques : le taux de **β_2-microglobuline** sérique qui est le reflet de la masse tumorale (puisqu'elle est relarguée par les plasmocytes tumoraux), ainsi que le dosage de l'**albumine** sérique (reflet de l'inflammation causée par l'IL-6 produite par le microenvironnement médullaire).

Il existe d'autres biomarqueurs associés à un pronostic défavorable mais qui sont peu utilisés en regard de ceux de l'ISS : il s'agit de l'élévation de la LDH (lactate déshydrogénase, corrélée à la charge tumorale), de la CRP (protéine C réactive, reflet de l'inflammation due à l'IL-6), d'une morphologie plasmocytaire de type plasmoblastique, de la présence d'une plasmocytose sanguine, ou encore de l'index cinétique des plasmocytes (reflet de l'activité de la tumeur).

L'autre principal facteur pronostique correspond aux **anomalies cytogénétiques** retrouvées dans le myélome, recherchées par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence ou FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*). Selon les anomalies chromosomiques présentes, les patients peuvent être classés en groupes à risque standard, risque intermédiaire, et à haut risque. Cette stratification selon la cytogénétique influence également le choix des thérapeutiques. Elle est résumée dans le tableau suivant :

<u>Tableau 1</u> : Anomalies cytogénétiques et stratification du risque dans le myélome

(d'après Rajan et Rajkumar, 2015)

Risque standard	**Risque intermédiaire**	**Haut risque**
✓ translocations impliquant le locus IGH et les gènes des **Cyclines D** : - **t(6;14)** - **t(11;14)** ✓ **hyperdiploïdie** ✓ toutes les autres	✓ **t (4;14)** impliquant le locus IGH et les gènes **MMSET et FGFR3** (risque élevé mais sensibilité aux inhibiteurs du protéasome[24])	✓ **del 17p** (gène *TP53*) ✓ translocations impliquant le locus IGH et les gènes **MAF** : - **t(14;16)** - **t(14;20)** ✓ **anomalies du chromosome 1** (gain 1q et délétion 1p)
60 % des patients	20 % des patients	20 % des patients
Survie globale médiane : 8-10 ans	Survie globale médiane : 4-5 ans	Survie globale médiane : 3 ans

À noter que la délétion du chromosome 13, rencontrée chez près de la moitié des patients, n'est plus considérée aujourd'hui comme ayant une valeur pronostique intrinsèque[24].

Aux résultats de la cytogénétique s'ajoutent des anomalies dans les **profils d'expression des gènes** (*Gene Expression Profiling*, GEP), pour lesquels plusieurs profils à haut risque (expression accrue de gènes de prolifération) ont été définis[25].

Plusieurs études ont cherché à combiner ces différents facteurs pronostiques en faisant la synthèse entre l'ISS et les éléments génétiques, afin d'améliorer la classification des patients au sein des différents groupes de risque. Ainsi, Palumbo *et al.* ont publié en 2015 une **révision de l'ISS (R-ISS)**, qui incorpore à la fois les biomarqueurs de l'ISS historique (β_2-microglobuline et albumine), des anomalies cytogénétiques (del 17p, t(4;14) et t(14;16)), et le dosage de la LDH[26]. Les 3 stades ainsi définis sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Classification ISS révisée (R-ISS) (d'après Palumbo *et al.*, 2015)

Stade	**I**	**II**	**III**
Critères	**β_2-microglobuline sérique < 3,5 mg/L** Et **albuminémie ≥ 35 g/L** Et **absence d'anomalies cytogénétiques de haut risque** Et **LDH sériques normales**	**ni stade I** **ni stade III**	**β_2-microglobuline sérique ≥ 5,5 mg/L** Et **présence d'anomalies cytogénétiques de haut risque** : **del 17p** ou **t(4 ;14)** ou **t(14 ;16)** Ou **LDH sériques élevées**
Survie globale médiane	non atteinte	83 mois	43 mois

3) Autres dyscrasies plasmocytaires

a) Plasmocytome

Les plasmocytomes solitaires sont des **tumeurs localisées** faites de plasmocytes clonaux, qui ne présentent aucun des signes cliniques, biologiques et radiologiques de dissémination inhérents au myélome (pas de critères CRAB). Ils représentent 3 à 5 % des néoplasies plasmocytaires ; l'âge médian des patients au diagnostic est de 55 ans (10 ans plus jeune que le myélome). Le terme de plasmocytome recouvre deux pathologies différentes : les **plasmocytomes osseux** et les **plasmocytomes extra-osseux**, qui n'ont pas le même pronostic.

Le plasmocytome osseux touche les mêmes os que le myélome multiple (squelette axial et appendiculaire proximal) mais sous forme d'une lésion unique. La symptomatologie correspond alors à des douleurs ou des fractures restreintes à l'os touché. Les plasmocytomes extra-osseux sont des tumeurs pouvant affecter divers types de tissus mous, le plus souvent les muqueuses des voies aériennes supérieures, mais aussi le tractus gastro-intestinal, uro-génital,

la peau ou divers organes (thyroïde, ganglions lymphatiques, système nerveux central…). Le retentissement clinique est lié à la masse tumorale ; ainsi au niveau ORL les symptômes sont à type de rhinorrhée, épistaxis, ou obstruction nasale.

Le diagnostic est **histologique**, porté sur une biopsie de l'os ou des tissus mous concernés, et mettant en évidence un infiltrat plasmocytaire. Le caractère clonal est démontré par immunohistochimie, mettant en évidence une **monotypie** des chaînes légères de type κ ou λ. La maladie se caractérise par une absence de signes de dissémination et d'atteinte systémique ; ainsi l'étude médullaire par myélogramme ou BOM (Biopsie Ostéo-Médullaire) est normale (dans certains cas elle peut montrer un excès de plasmocytes mais n'atteignant pas le seuil de 10 %). Les critères CRAB sont absents : pas d'anémie, d'hypercalcémie, d'insuffisance rénale, et d'autres images d'ostéolyse en dehors de la lésion initiale. Une immunoglobuline monoclonale plasmatique peut être retrouvée mais de manière inconstante. L'immunophénotype et la cytogénétique des plasmocytes tumoraux sont par contre identiques à ceux du myélome. Pour les plasmocytomes extra-osseux, le diagnostic différentiel peut être délicat avec certains lymphomes du MALT, l'immunohistochimie permet alors de s'orienter vers une néoplasie plasmocytaire (absence d'expression du CD20, expression du CD56) plutôt que lymphomateuse.

Le traitement est essentiellement local par **radiothérapie** et/ou exérèse chirurgicale de la tumeur, et suffit le plus souvent à éradiquer les lésions. L'emploi d'une chimiothérapie adjuvante est actuellement non consensuel[27]. Le pronostic est sensiblement différent entre plasmocytomes osseux et extra-osseux : dans le premier cas l'**évolution en myélome multiple** est fréquente et survient chez 50 à 60 % des patients, en moins de 10 ans. Dans le plasmocytome extra-osseux l'évolution en myélome est rare, chez seulement 15 % des patients[18].

b) Amylose AL

L'amylose AL (ou amylose à chaînes légères, ou amylose immunoglobulinique) est causée par un clone plasmocytaire qui sécrète des **chaînes légères d'immunoglobulines anormales** (beaucoup plus rarement des chaînes lourdes : amylose AH), intactes ou sous forme de fragments, **formant des dépôts fibrillaires dans divers tissus avec une structure caractéristique en feuillets bêta plissés**. Elle est à discriminer d'autres types d'amyloses non

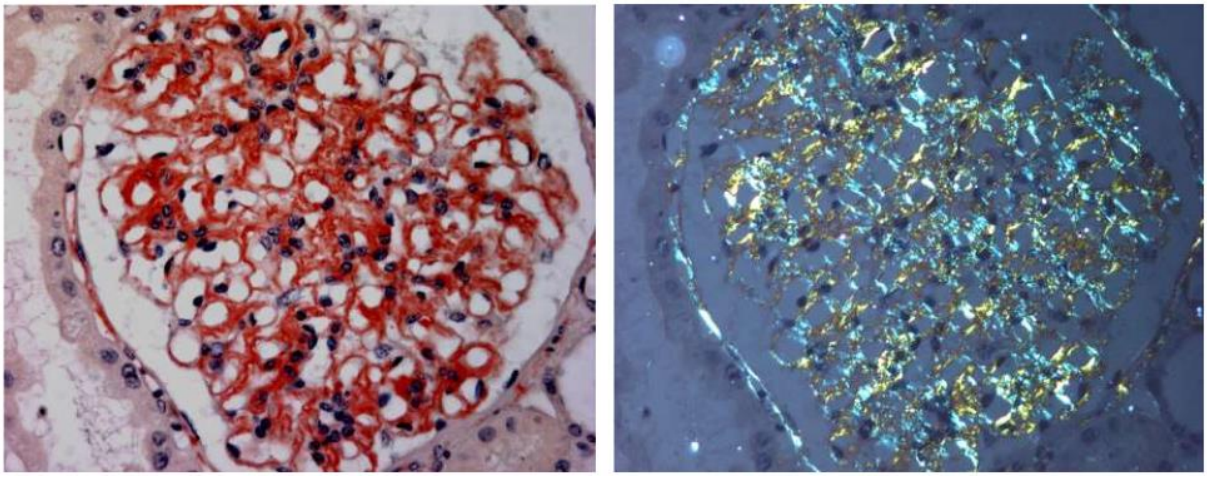
liées à des immunoglobulines, telles que l'amylose AA (causée par la protéine sérique amyloïde A ou SAA) ou l'amylose à transthyrétine.

C'est une maladie rare mais non exceptionnelle, survenant globalement aux mêmes âges que le myélome mais 5 à 10 fois moins fréquente (incidence d'environ 1 nouveau cas pour 100 000 habitants par an)[28]. À noter qu'environ 20 % des patients atteints d'amylose AL ont également un **myélome multiple associé**, l'amylose pouvant précéder le myélome ou au contraire survenir *a posteriori*.

Les chaînes légères peuvent se déposer dans de nombreux tissus différents à l'origine de dysfonctions d'organes : tissu adipeux sous-cutané, reins, cœur, foie, tractus gastro-intestinal, nerfs périphériques, et moelle osseuse. Les signes cliniques sont à rattacher à ces dépôts, les plus courants étant à type de **neuropathies périphériques**, syndrome du canal carpien, **syndrome néphrotique** (atteinte glomérulaire), **insuffisance cardiaque congestive**, hépatomégalie, macroglossie, et purpura péri-orbitaire[28].

La quasi-totalité des patients présentent une chaîne légère libre monoclonale circulante dans le plasma (et possiblement dans l'urine), qui peut être soit seule soit accompagnant une Ig monoclonale entière. Cette chaîne légère, de type λ dans 70 % des cas, est mise en évidence par immunofixation et par le dosage des CLL sériques.

Le diagnostic positif est uniquement **histologique sur biopsie**. On privilégie en première intention des biopsies peu invasives sur des sites facilement accessibles : la graisse sous-cutanée abdominale, ou les glandes salivaires accessoires ; mais en cas de négativité il sera nécessaire de biopsier directement l'organe atteint (biopsie rénale, hépatique, digestive…). Les dépôts de tous les types d'amyloses présentent pour caractéristique commune en microscopie optique d'être colorés en rouge-brique par la **coloration au rouge Congo** et d'apparaître avec une biréfringence vert-jaune sous la lumière polarisée. Pour affirmer une amylose AL, il conviendra de **typer le dépôt amyloïde** et de mettre en évidence sa nature immunoglobulinique, les techniques suivantes étant utilisables (classées par résolution croissante) : immunohistochimie en microscopie optique (restriction κ ou λ) ; immuno-microscopie électronique ; analyse protéomique en spectrométrie de masse.



<u>Figure 10</u> : Amylose sur biopsie rénale colorée au rouge Congo (à gauche), avec biréfringence en lumière polarisée (à droite) (d'après Javaugue, 2018)

Le pronostic de l'amylose AL est essentiellement déterminé par **l'étendue de l'atteinte cardiaque** (corrélée aux biomarqueurs cardiaques : troponine et BNP/NT-proBNP). Il s'est amélioré durant la dernière décennie mais reste sombre pour les patients avec une atteinte cardiaque avancée (30 % de décès la première année après le diagnostic). Les schémas thérapeutiques utilisés dépendent du niveau de risque des patients et font appel à des combinaisons basées sur le Bortézomib (VCD notamment, VELCADE®-Cyclophosphamide-Dexaméthasone) et/ou sur le Melphalan, ainsi que sur l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour les patients à faible risque éligibles. En cas d'amylose AL réfractaire en rechute peuvent être positionnés les immunomodulateurs IMiDs ou le Daratumumab[29].

c) Syndrome POEMS

Le syndrome POEMS est une maladie rare (représentant moins de 1 % des dyscrasies plasmocytaires), qui associe une prolifération clonale plasmocytaire à des **atteintes viscérales variées sur un mode paranéoplasique**. Le mécanisme physiopathologique de ces atteintes est encore mal connu mais semble relié à des niveaux élevés de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). L'acronyme POEMS désigne les **P**olyneuropathies, **O**rganomégalies, **E**ndocrinopathies, gammapathie **M**onoclonale, et signes cutanés (« ***S**kin changes* ») retrouvés dans la maladie, mais qui sont rarement tous présents en même temps.

Le diagnostic est posé sur l'association de plusieurs critères :

- 2 critères obligatoires :
  - **polyneuropathies** périphériques chroniques, typiquement démyélinisantes
  - **prolifération plasmocytaire monoclonale** : Ig monoclonale presque toujours à chaîne légère λ
- Au moins 1 des critères majeurs suivants :
  - **élévation du taux plasmatique de VEGF** : corrélé avec l'activité de la maladie
  - **lésions osseuses de type ostéocondensantes** : fibrose et sclérose des travées osseuses (contrairement aux lésions lytiques du myélome)
  - adénopathies de type histologique similaire à celui de la **maladie de Castleman**
- Au moins 1 des critères mineurs suivants :
  - **organomégalie** : hépatomégalie ou splénomégalie
  - **endocrinopathie** : le plus souvent dysthyroïdies ou hypogonadisme
  - **signes cutanés** : le plus souvent hyperpigmentation ou hypertrichose
  - **thrombocytose** ou polyglobulie
  - **œdème papillaire**
  - **surcharge du compartiment extravasculaire** : œdèmes, épanchements dans les séreuses

L'évolution est chronique avec une survie globale plus longue que pour les autres dyscrasies plasmocytaires (médiane d'environ 14 ans)[30]. Le traitement repose sur la radiothérapie pour les patients sans infiltration médullaire systémique, et pour les formes disséminées sur de la chimiothérapie par Lénalidomide ou Melphalan et Dexaméthasone, et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour les patients éligibles. Le Bortézomib et le Thalidomide doivent être évités du fait de leurs effets indésirables neurologiques pouvant majorer les neuropathies préexistantes[29].

d) Leucémie à plasmocytes

La leucémie à plasmocytes est une dyscrasie plasmocytaire rare et agressive qui contrairement au myélome présente une dissémination extramédullaire, et se définit par un taux de

plasmocytes clonaux dans le sang > 20 % des leucocytes totaux ou > **2 G/L** en valeur absolue. En plus de la moelle osseuse et du sang, les plasmocytes tumoraux infiltrent aussi fréquemment le foie, la rate, les séreuses, et le LCR (liquide céphalo-rachidien). Dans 60-70 % des cas la leucémie à plasmocytes est dite *de novo* ou **primitive**, survenant sans aucun antécédent de myélome ; à l'inverse dans 30-40 % des cas elle est **secondaire** et représente une transformation leucémique chez environ 1 % des patients atteints d'un myélome multiple préexistant et réfractaire au traitement[31].

Dans la leucémie à plasmocytes primitive, l'âge médian des patients au diagnostic est d'environ 10 ans plus jeune que pour les myélomes. Au plan clinique, les organomégalies (hépato-splénomégalie, adénopathies) et l'insuffisance rénale sont plus fréquentes que dans le myélome, alors que les atteintes osseuses sont au contraire plus rares. La présentation clinique et biologique est globalement plus sévère, avec une charge tumorale et un envahissement médullaire majeurs. L'isotype de l'Ig monoclonale est plus rarement une IgG ou IgA que dans le myélome, alors que les CLL, les IgD et les IgE sont plus représentées. À l'immunophénotypage, les leucémies à plasmocytes ont un profil antigénique similaire à ceux des myélomes, mais avec une plus fréquente expression du CD20 et une moins fréquente expression du CD56. Elles ont également un nombre plus élevé d'anomalies cytogénétiques (avec une surreprésentation de la t(11 ;14))[31].

La survie globale est courte même avec les nouvelles thérapeutiques (médiane d'1 à 2 ans chez les patients non greffés, 3 ans chez ceux greffés). Le traitement, similaire à celui du myélome, fait appel à des combinaisons trimédicamenteuses basées sur le Bortézomib, avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour tous les patients éligibles[29].

C. Place des examens biologiques dans le diagnostic, pronostic, et le suivi du myélome

La prise en charge du myélome multiple fait appel à plusieurs examens de biologie médicale nécessaires pour poser le diagnostic, évaluer le pronostic de la maladie et le risque de progression pour adapter le traitement en conséquence, ainsi que dans le suivi pour évaluer la réponse au traitement.

1) Examens biologiques à visée diagnostique

a) Myélogramme

Le myélome étant une pathologie d'origine médullaire, l'étude de la moelle osseuse constitue un examen essentiel pour poser le diagnostic. Elle est réalisée en première intention par myélogramme (aspiration médullaire, au niveau sternal ou iliaque), mais peut aussi être effectuée par Biopsie Ostéo-Médullaire (BOM) en alternative. En cas de discordance entre l'estimation de la plasmocytose par myélogramme et par BOM, la plus haute des deux valeurs devra être retenue[5].

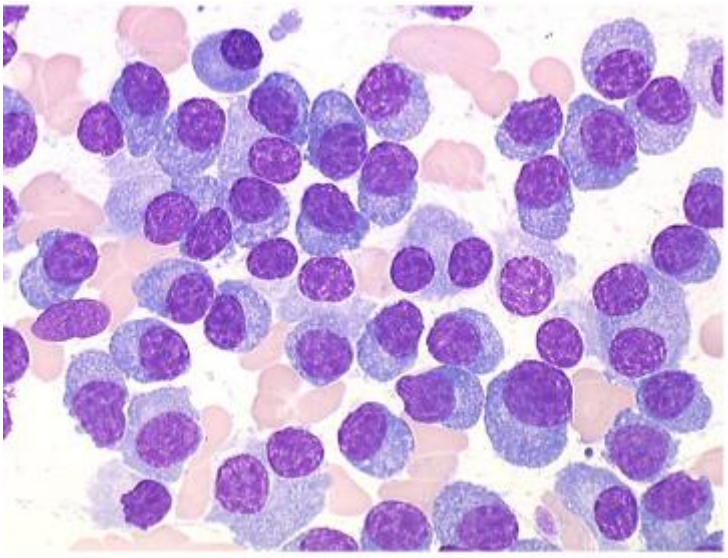
1. Analyse cytomorphologique

La densité cellulaire observée est le plus souvent normale ou bien légèrement diminuée. Elle peut apparaître augmentée si l'envahissement plasmocytaire est massif.

La principale caractéristique observée est la présence d'une **plasmocytose médullaire** anormale, dont le seuil fixé par l'IMWG comme critère diagnostique est **≥ 10 %** (la norme chez l'adulte sain étant d'environ 1 à 3 %). Cependant dans certains cas d'authentiques myélomes la plasmocytose estimée peut apparaître inférieure au seuil (voire même < 5 %) : ceci étant dû au fait que l'infiltration médullaire est volontiers hétérogène, les plasmocytes étant regroupés en amas (« îlots plasmocytaires »). Ceci requiert alors de répéter le myélogramme sur d'autres territoires osseux ou d'effectuer une BOM pour poser le diagnostic[18].

Les autres lignées hématopoïétiques peuvent apparaître diminuées selon le degré d'envahissement médullaire ; elles sont le plus souvent sans anomalie morphologique.

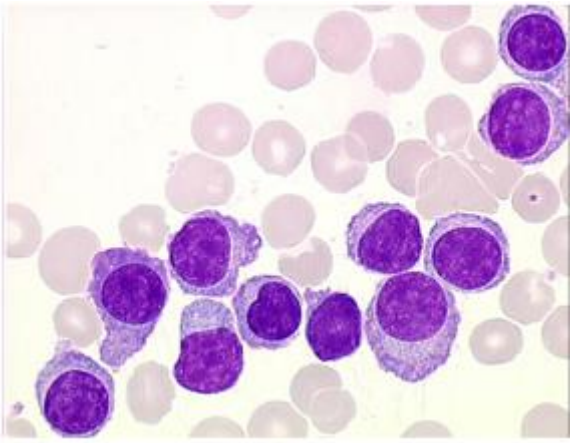
La morphologie plasmocytaire peut être normale dans 30 à 50 % des cas de myélomes[32] : il s'agit alors de cellules à noyau excentré et de petite taille, à chromatine dense et mottée (aspect en « rayons de roue » ou en « carapace de tortue »), à cytoplasme abondant et très basophile après coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa), et présentant un volumineux archoplasme correspondant à l'appareil de Golgi.



<u>Figure 11</u> : Infiltrat médullaire de plasmocytes matures de morphologie normale au cours du myélome multiple (d'après Ribourtout et Zandecki, 2015)

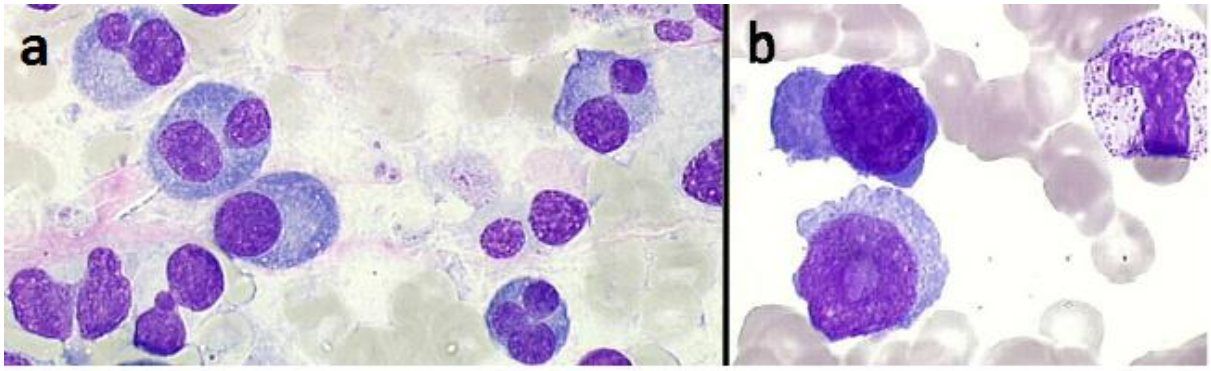
Dans les autres cas de figure, diverses anomalies morphologiques ou **dystrophies** seront retrouvées, de signification variable.

Dans 10-15 % des cas, les plasmocytes peuvent présenter un rapport nucléo-cytoplasmique augmenté avec une bande de cytoplasme réduite, tout en conservant une chromatine mature : on parle alors d'aspect « lymphoplasmocytoïde »[32].



<u>Figure 12</u> : Variant lymphoplasmocytoïde (d'après Ribourtout et Zandecki, 2015)

Les dystrophies portant sur le noyau sont toujours associées à la malignité (c'est-à-dire spécifiques du myélome). Il peut s'agir d'irrégularités nucléaires, à type de bourgeonnements ou de multilobulation (à noter en revanche que la présence de plusieurs noyaux séparés n'est pas associée à la malignité et peut être retrouvée dans les plasmocytoses réactionnelles). D'autres anomalies témoignent quant à elles d'une immaturité globale (et donc de l'agressivité) du clone plasmocytaire : chromatine affinée, présence d'un nucléole, position centrale du noyau avec rapport nucléo-cytoplasmique élevé, et disparition de l'archoplasme. Lorsque poussées à l'extrême et présentes conjointement, ces anomalies correspondent à la morphologie **plasmoblastique**, dont le pronostic est connu comme étant très péjoratif[32].

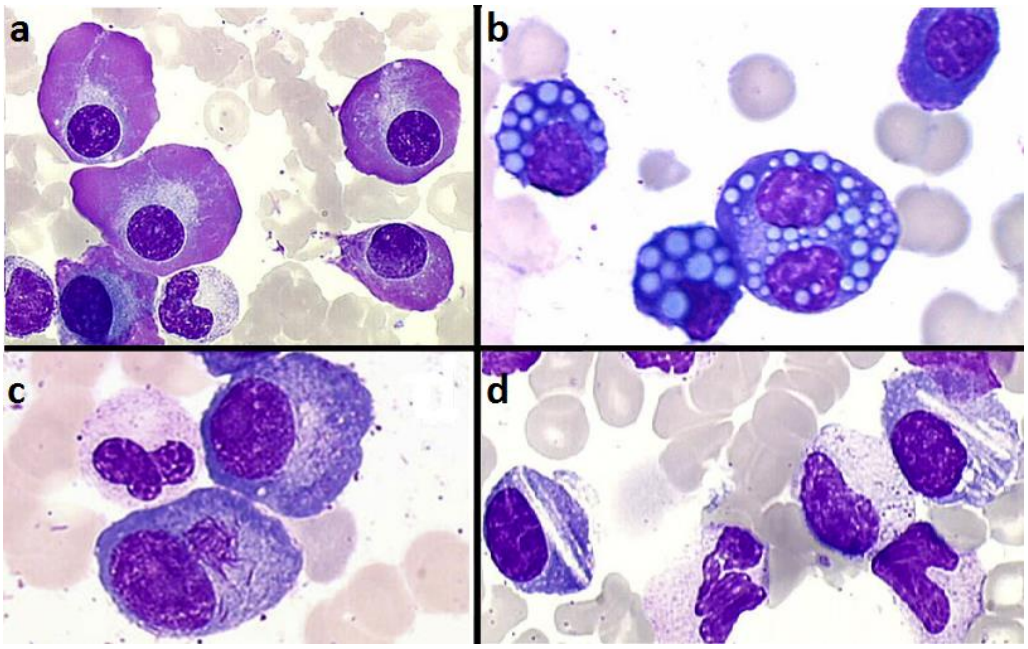


<u>Figure 13</u> : Dystrophies nucléaires (associées à la malignité)

(d'après Ribourtout et Zandecki, 2015)

(a) Irrégularités nucléaires ; (b) Plasmoblastes

Les anomalies cytoplasmiques à l'inverse ne sont pas spécifiques du myélome et peuvent être aussi bien rencontrées dans les MGUS que dans les plasmocytoses réactionnelles. Il peut s'agir d'une coloration éosinophile du cytoplasme donnant un aspect « flammé », ou de la présence d'inclusions telles que des vacuoles rondes (corps de Russell) qui lorsqu'assemblées en grappes forment des cellules de Mott, de bâtonnets azurophiles mimant des corps d'Auer, ou encore d'inclusions cristallines. Toutes ces variations cytoplasmiques témoignent d'anomalies de la synthèse, du trafic vésiculaire, ou de l'excrétion des immunoglobulines qui aboutissent à leur accumulation dans la cellule[32].



<u>Figure 14</u> : Variations cytoplasmiques, non spécifiques du myélome

(d'après Ribourtout et Zandecki, 2015)

(a) Plasmocytes « flammés » ; (b) Cellules de Mott ; (c) Bâtonnets mimant des corps d'Auer ; (d) Inclusions cristallines

2. Immunophénotypage par cytofluorométrie en flux

L'immunophénotypage médullaire par cytométrie en flux présente un intérêt important pour préciser le diagnostic, dans la mesure où il permet de discriminer les plasmocytes normaux (réactionnels) des plasmocytes myélomateux et d'établir leur **clonalité**.

Il n'est pas recommandé d'utiliser la cytométrie en flux (CMF) pour établir le décompte de la plasmocytose médullaire[5], car il est systématiquement sous-estimé par rapport à l'analyse morphologique en microscopie optique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les plasmocytes sont essentiellement contenus à l'intérieur des grains hématopoïétiques et donc libérés lors de la réalisation des frottis de moelle ; de plus le volume d'échantillon recueilli en tubes anticoagulés pour l'analyse en CMF est souvent davantage hémodilué par rapport aux premières gouttes de moelle qui elles sont réservées pour la confection des frottis[33].

En revanche l'immunophénotypage permet de distinguer les plasmocytes néoplasiques clonaux et les plasmocytes réactionnels (qui peuvent avoir la même morphologie en microscopie optique). Il est donc d'une grande utilité pour faire le diagnostic différentiel entre

plasmocytoses réactionnelles, MGUS (dans laquelle coexistent un contingent de plasmocytes clonaux et un contingent de plasmocytes normaux), et myélome multiple, ainsi qu'avec d'autres syndromes lymphoprolifératifs B de morphologie approchante (maladie de Waldenström en particulier) grâce aux divergences de profils antigéniques. De plus, l'affirmation de la clonalité par CMF est une caractéristique requise selon l'IMWG 2014 pour remplir le critère diagnostique de la plasmocytose médullaire ≥ 10 %.

Pour identifier et sélectionner les plasmocytes parmi les autres populations leucocytaires, on exploite la combinaison des marqueurs CD38 et CD138 avec le CD45 et les paramètres de diffusion lumineuse (marqueurs de repérage, « *gating* »)[34].

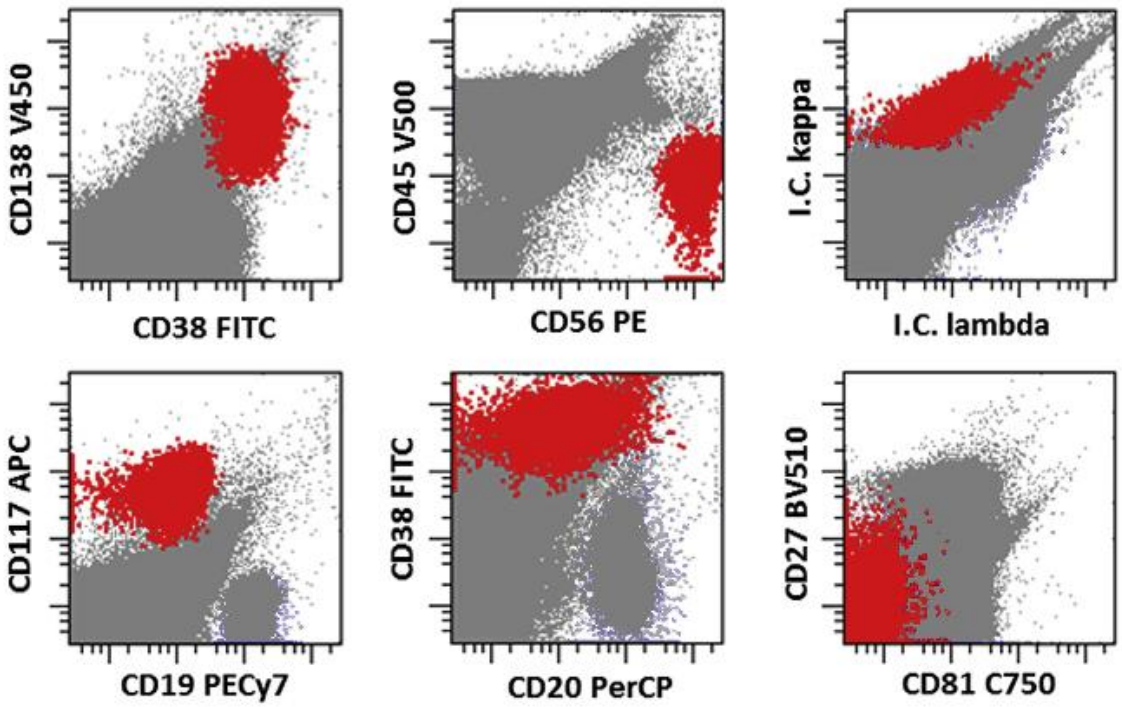
La clonalité des plasmocytes tumoraux est mise en évidence grâce à un marquage des Ig intracytoplasmiques (les plasmocytes n'exprimant jamais d'Ig membranaires), montrant une **restriction des chaînes légères cytoplasmiques** : monotypie κ ou monotypie λ.

D'autre part les plasmocytes myélomateux se distinguent également des plasmocytes normaux par l'**expression aberrante de marqueurs antigéniques**[34] :

- <u>sous-expression d'Ag plasmocytaires normaux</u> :
  - **CD38** : expression plus faible par rapport à celle (très intense) des plasmocytes normaux
  - **CD45** : absent ou très faiblement exprimé comparativement aux plasmocytes normaux
  - **CD19** : quasi-systématiquement perdu sur les plasmocytes myélomateux avec absence dans 95 % des cas, alors qu'il est normalement conservé à l'issue de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes
  - **CD27** : fréquemment absent ou de faible intensité dans plus de la moitié des cas sur les plasmocytes tumoraux, alors qu'il est intensément exprimé sur les plasmocytes normaux et les lymphocytes B mémoires
  - **CD81** : fréquemment absent sur les plasmocytes tumoraux, alors qu'il persiste normalement après différenciation des lymphocytes B en plasmocytes
- <u>surexpression d'Ag aberrants</u> :
  - **CD56** : il s'agit d'une molécule d'adhésion (NCAM, *Neural Cell Adhesion Molecule*) caractéristique des lymphocytes NK. Dans le myélome il est

exprimé de façon aberrante dans 70 % des cas ; il participe alors aux interactions avec le microenvironnement médullaire.

- **CD20** : marqueur des lymphocytes B qui (contrairement au CD19) est habituellement perdu lors de la différenciation en plasmocytes. À l'inverse, il peut être exprimé de façon anormale dans 20 % des cas de myélome.
- **CD28** : il s'agit normalement d'un marqueur des lymphocytes T qui permet la costimulation avec les cellules présentatrices d'antigènes. Dans le myélome il est porté par les plasmocytes tumoraux dans un tiers des cas. Son expression est de mauvais pronostic.
- **CD117** : il s'agit de l'antigène c-kit (récepteur du facteur de croissance SCF *Stem Cell Factor*), qui est normalement exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques et sur les mastocytes. Il est exprimé par les plasmocytes myélomateux de manière aberrante dans un tiers des cas. Son expression traduit un pronostic plus favorable.



<u>Figure 15</u> : Immunophénotypage des plasmocytes dans le myélome (d'après Olteanu, 2016)
CD38+, CD138+, CD45-, CD19-, CD56+, CD117+, CD20 positif partiel, CD27-, CD81-, et ici monotypie κ

b) Électrophorèse des protéines sériques

Dans la quasi-totalité des cas le myélome s'accompagne d'une production d'une protéine monoclonale circulant dans le plasma, à l'exception des très rares myélomes non excrétants (production d'Ig par les plasmocytes restant intracytoplasmique sans libération) voire non sécrétants (aucune synthèse d'Ig par les plasmocytes), qui ne représentent que 3 % des cas. Suite à la révision des critères diagnostiques de 2014 par l'IMWG, la **présence d'une protéine monoclonale dans le sérum ou les urines n'est plus indispensable pour affirmer le diagnostic** de myélome multiple, ceci justement afin de pouvoir tenir compte de ces formes rares non excrétantes/sécrétantes. Cependant sa mise en évidence et sa quantification restent des éléments incontournables du bilan initial au diagnostic, puisque l'évaluation de la réponse au traitement se fera sur la **décroissance du composant monoclonal par rapport à son taux de base**[35].

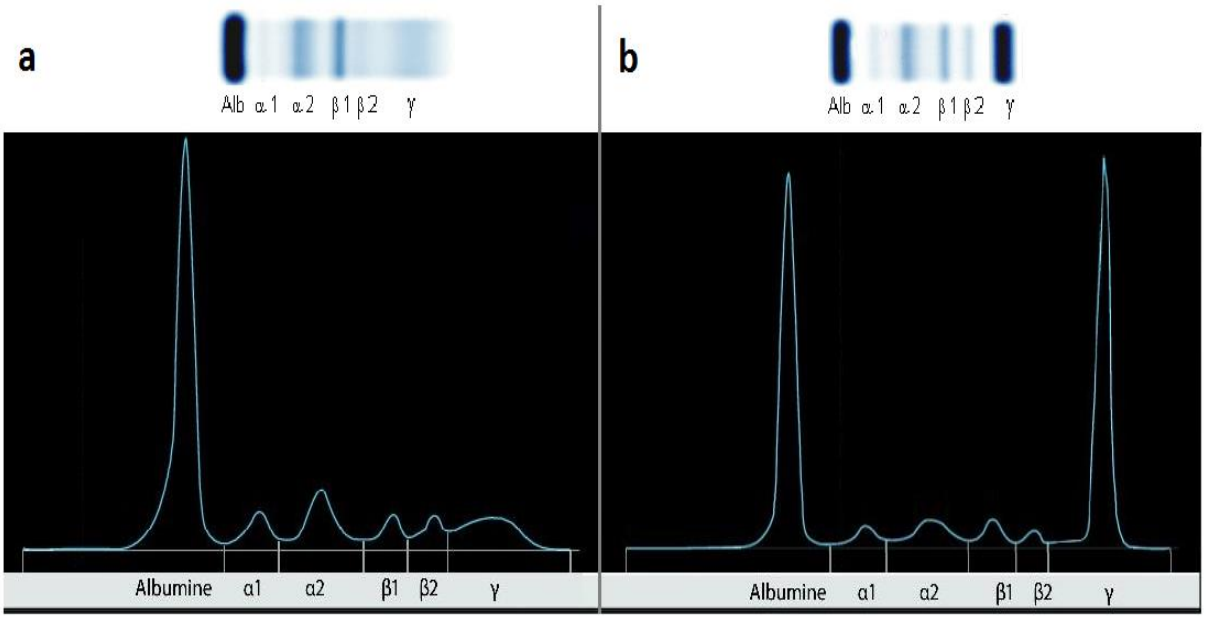
Étape préalable à la réalisation de l'électrophorèse, le dosage des protéines sériques totales met en évidence une fréquente **hyperprotidémie** dont l'importance est fonction du niveau du pic monoclonal ; elle peut atteindre jusqu'à 130 g/L et être à l'origine d'un syndrome d'hyperviscosité plasmatique. Cependant la protéinémie peut aussi être normale ou diminuée en cas de pic monoclonal de faible intensité ou de myélome à CLL.

L'électrophorèse des protéines sériques (EPS) permet une séparation des protéines en fonction de leur charge et de leur masse sous l'influence d'un champ électrique, et l'individualisation de plusieurs fractions protéiques : albumine, α1-globulines, α2-globulines, β1-globulines, β2-globulines, et γ-globulines. Deux techniques différentes sont disponibles et utilisables en routine : l'électrophorèse en gel d'agarose et l'électrophorèse capillaire.

La présence de l'immunoglobuline monoclonale sérique se traduit par l'individualisation d'un pic étroit sur le tracé dénommé **pic monoclonal**, de hauteur et de surface variables. Ce pic est la résultante de l'accumulation des Ig produites par les plasmocytes clonaux qui ont toutes la même mobilité électrophorétique du fait d'une homogénéité de charge électrique. Les pics monoclonaux migrent le plus souvent dans la fraction des γ-globulines, mais peuvent aussi être retrouvés plus occasionnellement dans les fractions β voire dans les α2-globulines.

La quantification du composant monoclonal est effectuée par l'intégration (mesure de la surface) du pic électrophorétique. Deux modalités d'intégration des pics sont possibles : le mode orthogonal (dit de « ligne de base »), ou le mode tangentiel (dit de « vallée à vallée »). Il n'y a actuellement pas de consensus en faveur de l'une ou l'autre des méthodes ; cependant l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) recommande le mode orthogonal pour tous les essais cliniques. Quelle que soit la méthode d'intégration choisie, le suivi d'un même patient devra toujours être effectué selon la même modalité.

La présence de l'Ig monoclonale s'accompagne également souvent dans le myélome d'une **hypogammaglobulinémie** résiduelle, traduisant la répression de la synthèse des Ig polyclonales secondaire à l'inhibition de la lymphopoïèse B physiologique. En cas de myélome à CLL, l'hypogammaglobulinémie peut même apparaître isolée, sans autre anomalie qualitative des γ-globulines détectable à l'EPS.



<u>Figure 16</u> : Électrophorèse des protéines sériques (gels et électrophorégrammes)

(d'après Albert *et al.*, 2010, et Murali)

(a) Profil normal ; (b) Pic monoclonal migrant en γ au cours d'un myélome

Le dosage pondéral des immunoglobulines d'isotypes IgG, IgA, et IgM, par immunonéphélémétrie ou immunoturbidimétrie, permet de mettre en évidence une **répression de synthèse des autres classes d'Ig (immunoparésie)**, observée chez 90 % des patients, et donc d'évaluer l'immunosuppression associée. Il est également nécessaire pour adapter les conditions techniques de l'étape ultérieure d'immunofixation (détermination des dilutions du sérum pour chacune des pistes)[35].

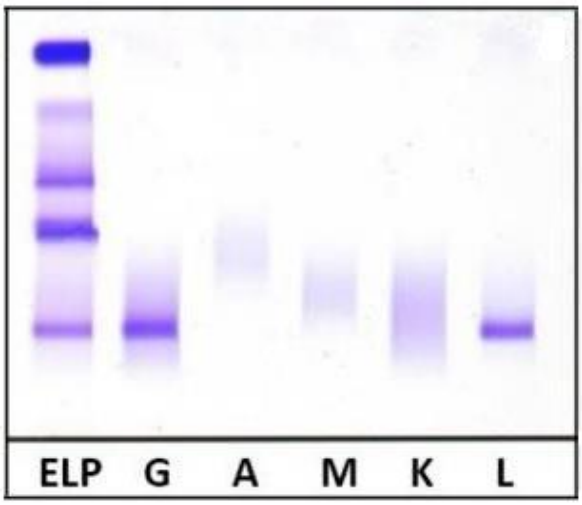
Cependant, le dosage pondéral des Ig ne doit pas servir à quantifier l'immunoglobuline monoclonale : son estimation par néphélémétrie/turbidimétrie peut en effet être erronée, en raison d'une réactivité différente de l'Ig monoclonale avec les immunsérums liée à ses propriétés physico-chimiques intrinsèques, d'un possible excès d'antigène pour des Ig monoclonales à taux élevé, et de la prise en compte des Ig polyclonales. La quantification du composant monoclonal par intégration du pic à l'électrophorèse doit lui être préférée[35]. La seule exception à cela est rencontrée lorsque le pic migre dans les fractions β ou α2 et se superpose à d'autres protéines sériques normales : auquel cas l'intégration du pic n'est pas fiable (car englobant ces protéines normales), et le dosage de l'isotype d'Ig impliqué (souvent IgA) par néphélémétrie/turbidimétrie est alors préférable pour suivre le patient[36].

c) Immunofixation sérique

Toute suspicion d'anomalie monoclonale à l'EPS doit donner lieu à une immunofixation qui permettra d'en confirmer le caractère monoclonal et d'effectuer son **typage immunologique**, en caractérisant l'isotype de la chaîne lourde et celui de la chaîne légère[35]. L'immunofixation (IF) est la technique de référence pour identifier un composant monoclonal ; elle est sensible (seuil de détection à partir de 120 mg/L), rapide, et semi-automatisée. Elle consiste en une immunoprécipitation en gel d'agarose des Ig sériques, au moyen d'antisérums spécifiques des isotypes de chaînes lourdes et de chaînes légères : anti-γ, anti-α, anti-μ, anti-κ totales (libres et liées), et anti-λ totales (libres et liées). En deuxième intention peuvent être utilisés des antisérums spécifiques des chaînes lourdes δ et ε, et des chaînes légères libres κ et λ.

La présence d'Ig monoclonale apparaît sur l'IF sous la forme d'une ou plusieurs bandes étroites. Dans le myélome multiple, les chaînes lourdes sont d'isotype **IgG** dans environ 50 % des cas, et d'isotype **IgA** dans environ 20 % des cas. Beaucoup plus rarement il s'agit d'IgD dans environ 2 % des cas, exceptionnellement d'IgE ou d'IgM dans moins de 1 % des cas, ou

bien de profils biclonaux dans 2 % des cas. Les chaînes légères quant à elles sont d'isotype κ dans 2/3 des cas et d'isotype λ dans 1/3 des cas (reflet de la physiologie des recombinaisons des chaînes légères, cf. supra). Dans environ 20 % des myélomes on ne retrouve qu'une **CLL monoclonale** sans chaîne lourde associée (myélome à CLL)[11]. D'autre part, une Ig monoclonale entière peut être assortie d'une CLL monoclonale excédentaire du même isotype, correspondant à une CLL d'accompagnement[35].



<u>Figure 17</u> : Immunofixation sérique dans un myélome à Ig entière (ici IgG λ)

(d'après Sabatino *et al.*, 2017)

Une technique alternative pour le typage du composant monoclonal est l'immunosoustraction, réalisable uniquement sur les automates d'électrophorèse capillaire. Rapide et totalement automatisée, elle ne peut cependant identifier que des Ig monoclonales dont le pic est bien individualisé sur l'EPS. Elle est ainsi inopérante en cas d'Ig monoclonale de faible concentration (limite de détection à 250 mg/L) ou de CLL monoclonale, qui sont souvent masquées sur l'électrophorégramme au sein d'une des fractions. De plus elle ne peut pas identifier les IgD et les IgE monoclonales (antisérums de ces isotypes non disponibles). Dans ces cas de figure ci, l'immunofixation (plus sensible) est la seule technique utilisable[35].

d) Électrophorèse des protéines et immunofixation urinaires

La recherche d'un composant monoclonal dans les urines n'est aujourd'hui plus recommandée en première intention en vue de dépister un myélome (l'association d'une EPS, d'une IF sérique, et du dosage des CLL sériques constituant en effet un panel suffisant pour dépister toutes les formes excrétantes de la maladie). Cependant, les explorations électrophorétiques urinaires restent indispensables dès lors que le diagnostic de myélome est posé et sont recommandées dans le bilan initial[37]. Elles présentent un effet un double intérêt : elles permettent d'évaluer l'atteinte rénale (qui concerne près d'un patient sur deux au diagnostic[11]) par le **typage de la protéinurie**, mais aussi de **rechercher et quantifier l'excrétion rénale du composant monoclonal**, constitué essentiellement de CLL monoclonales (autrefois appelées protéines de Bence-Jones), voire de l'Ig monoclonale entière en cas d'augmentation de la perméabilité glomérulaire. La connaissance de ce taux initial du composant monoclonal urinaire sert de **référence pour l'évaluation ultérieure de la réponse au traitement** qui s'appuie sur sa décroissance[35].

L'étape préalable à l'électrophorèse urinaire est le dosage de la protéinurie totale. Les recommandations préconisent un recueil des urines des 24h pour l'évaluation initiale au diagnostic, étant donné que l'excrétion urinaire des protéines est sujette à d'importantes variations nycthémérales. L'utilisation d'un échantillon sur miction est néanmoins acceptable en pratique, à condition d'indexer la protéinurie à la créatininurie (constante sur 24h). Ce dosage fait appel à des techniques colorimétriques ou bien turbidimétriques après précipitation, qui dans tous les cas présentent l'inconvénient d'une mauvaise reproductibilité intra- et inter-laboratoires[35]. Chez les patients atteints de myélome on objective dans plus de la moitié des cas une **protéinurie pathologique permanente** > 150 mg/24h, pouvant dans de rares cas excéder 10 g/24h, mais restant le plus souvent modérée sans dépasser 3 g/24h chez la majorité des patients.

L'électrophorèse des protéines urinaires (EPU) est généralement effectuée en gel d'agarose (électrophorèse capillaire peu pratiquée pour les urines en raison d'un traitement pré-analytique lourd), soit par des techniques sans dénaturation (migration en fonction de la charge électrique) qui sont de lecture difficile et nécessitent une concentration des urines, soit

en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) permettant une séparation en fonction de la masse moléculaire ce qui facilite la lecture et permet de travailler sur des urines pures[38].

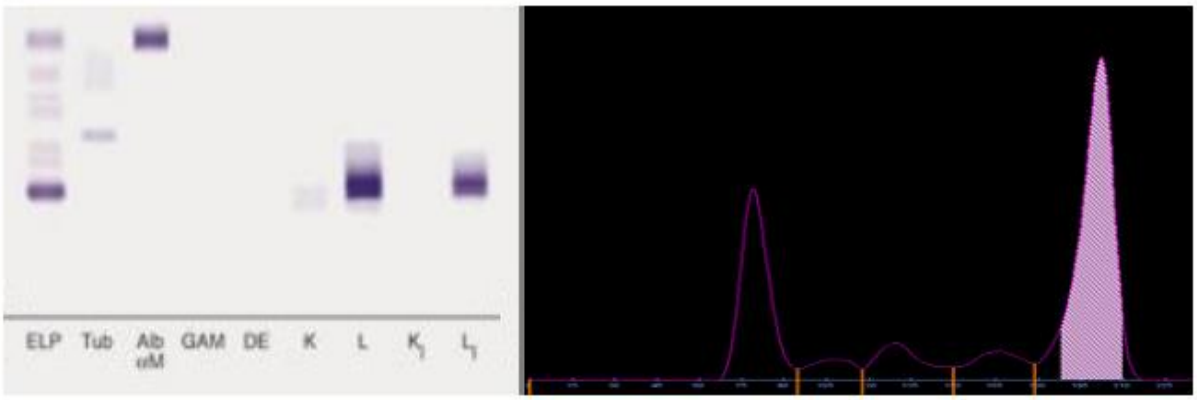
Chez la majorité des patients atteints de myélome, l'EPU objective une **protéinurie pré-rénale de surcharge**, constituée de CLL monoclonales dont la concentration plasmatique est telle que leur seuil de réabsorption tubulaire est dépassé, entraînant leur passage dans l'urine. Ceci se traduit sur l'électrophorégramme sous la forme d'un **pic monoclonal** étroit migrant dans les fractions γ, β, ou α2. Tout comme pour le sérum, ce pic doit être intégré suivant les mêmes modalités (la sommation de l'ensemble des anomalies monoclonales du tracé fournissant alors l'estimation du composant monoclonal urinaire[35]).

En plus de cela, l'EPU peut également montrer des protéinuries d'origine rénale lorsque surviennent les complications néphrologiques du myélome. Ainsi, la précipitation intra-tubulaire des CLL monoclonales sous forme de cylindres est à l'origine de la tubulopathie caractéristique du myélome (« rein myélomateux »), engendrant de ce fait une **protéinurie tubulaire,** faite de protéines de bas poids moléculaire : α1-microglobuline, *Retinol Binding Protein* RBP, β2-microglobuline, et CLL polyclonales. Plus rarement, l'atteinte tubulaire peut être rattachée au syndrome de Fanconi de l'adulte associé aux CLL du myélome. D'autre part, on peut aussi observer au décours de la maladie une **protéinurie glomérulaire**, faite de protéines de haut poids moléculaire : albumine, transferrine, et immunoglobulines entières polyclonales, au sein desquelles on peut retrouver l'Ig monoclonale complète. Une atteinte glomérulaire doit faire évoquer une maladie des dépôts, soit amyloïdes (amylose AL) soit non amyloïdes (maladie de Randall).

L'immunofixation urinaire permet l'identification du composant monoclonal. Elle utilise pour ce faire un antisérum constitué d'un mélange de 3 anticorps dirigés contre les chaînes lourdes γ, α, et μ, ainsi que plusieurs antisérums pour typer les chaînes légères : anti-κ totales (libres et liées), anti-λ totales (libres et liées), anti-κ libres, et anti-λ libres. L'IF urinaire retrouve une **CLL monoclonale** chez environ 80 % des patients atteints de myélome (κ dans 2/3 des cas, λ dans 1/3 des cas, cf. supra)[11]. Elle peut aussi montrer la présence associée de l'**Ig monoclonale entière** dès lors qu'une atteinte glomérulaire permet sa filtration.

Certaines techniques associent l'EPU et l'IF urinaire sur un seul et même gel d'agarose : en plus des 5 antisérums ciblant les isotypes de chaînes lourdes et de chaînes légères d'Ig, elles

utilisent 2 antisérums respectivement anti-protéines glomérulaires et anti-protéines tubulaires. Ces techniques combinées permettent de réaliser en une seule étape un profil urinaire complet (typage d'atteinte rénale et caractérisation et quantification du composant monoclonal) et présentent une grande sensibilité.



<u>Figure 18</u> : Électrophorèse des protéines et immunofixation urinaires associées sur un même gel, et électrophorégramme correspondant

(d'après Boulard, 2015)

Ici protéinurie mixte (glomérulaire sélective et tubulaire) avec présence d'une CLL monoclonale de type λ

e) Dosage des chaînes légères libres sériques

Le dosage des CLL sériques par des techniques immunonéphélémétriques, disponible depuis 2001, s'est révélé être la technique la plus sensible pour mettre en évidence une CLL monoclonale, devant les immunofixations et les électrophorèses sériques et urinaires. Il s'agit donc de la technique de choix pour dépister des myélomes à CLL dont le niveau du composant monoclonal peut être trop faible pour apparaître sur l'immunofixation. Le dosage des CLL sériques a ainsi permis de reclasser une grande part des myélomes anciennement considérés comme non excrétants (car ayant des électrophorèses et IF sériques et urinaires négatives) en **myélomes oligosécrétants**[39]. Les recommandations de l'IMWG stipulent que **l'association du dosage des CLL sériques avec une EPS et une IF sérique constitue un panel suffisant en vue du dépistage** de toutes les formes excrétantes de myélomes[40].

De plus, la révision des critères diagnostiques du myélome par l'IMWG en 2014 intègre le dosage des CLL sériques comme un des **nouveaux biomarqueurs de malignité** : ainsi, un

rapport de CLL impliquée/non impliquée ≥ 100 (avec une concentration de la CLL impliquée ≥ 100 mg/L) permet de définir d'emblée un myélome multiple actif pour tout patient ayant une plasmocytose médullaire au seuil mais pas encore de critère CRAB[5].

Le dosage des CLL sériques par immunonéphélémétrie cible un épitope de chaîne légère masqué lorsqu'elle est liée à la chaîne lourde, mais qui devient accessible uniquement lorsque la chaîne légère est libre. Ce dosage montre un **rapport entre les CLL κ et les CLL λ anormal** dans environ 90 % des myélomes à Ig entières (ceci étant dû à l'excédent de CLL produites par le clone), et dans 100 % des myélomes à CLL, y compris oligosécrétants[41].

Deux réactifs de néphélémétrie sont commercialisés, Freelite® du fournisseur Binding Site et N Latex FLC® du fournisseur Siemens, dont les performances sont globalement concordantes avec un seuil de détection des CLL < 0,5 mg/L, leurs domaines de mesure étant les suivants :

- Freelite® : 0,4 à 180 000 mg/L pour les CLL κ ; 0,45 à 165 000 mg/L pour les CLL λ
- N Latex FLC® : 0,17 à 2 000 mg/L pour les CLL κ ; 0,47 à 6 000 mg/L pour les CLL λ

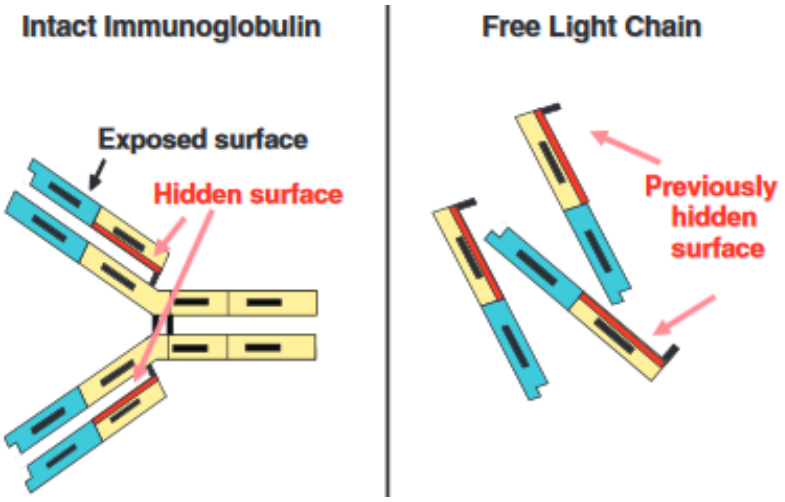


Figure 19 : Épitope ciblé lors du dosage des CLL sériques (d'après Dispenzieri *et al.*, 2008)

f) Hémogramme

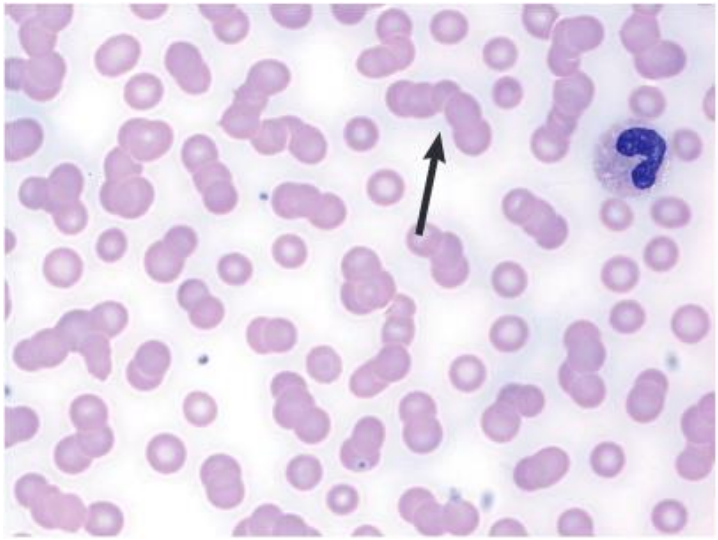
La réalisation d'un hémogramme ou Numération-Formule Sanguine (NFS) permet de rechercher l'un des critères diagnostiques d'atteinte d'organes, le **critère CRAB d'Anémie**. Il se définit selon l'IMWG comme un taux d'**hémoglobine inférieur à 10 g/dL ou inférieur de plus de 2 g/dL à la limite basse des valeurs normales**, et attribuable au myélome[5].

La NFS retrouve une anémie au diagnostic chez environ 70 % des patients (le plus souvent modérée, rarement en deçà de 8 g/dL). Elle est normocytaire, normochrome, et arégénérative, due à une inhibition de l'érythropoïèse consécutive à la fois à l'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux et au déficit en érythropoïétine associé à l'insuffisance rénale[11].

Plus rarement, la NFS peut montrer une **leucopénie** (à type de neutropénie et/ou lymphopénie) ou une **thrombopénie**, surtout dans les formes évoluées de la maladie avec un fort degré d'infiltration médullaire.

L'examen du frottis sanguin peut occasionnellement retrouver **quelques plasmocytes circulants**, ne représentant habituellement pas plus de 1 à 3 % de la formule leucocytaire. Si leur taux excède 20 % des leucocytes ou 2 G/L, on parle alors de leucémie à plasmocytes (cf. supra).

Enfin, le frottis sanguin montre fréquemment une morphologie érythrocytaire en **rouleaux d'hématies**, leur empilement étant lié à l'adsorption de l'Ig monoclonale à leur surface, qui entraîne une diminution du potentiel ζ maintenant normalement les hématies à distance. Ce phénomène explique également l'**accélération de la Vitesse de Sédimentation** (VS).



<u>Figure 20</u> : Rouleaux d'hématies sur le frottis sanguin lors d'un myélome

(d'après Kang *et al.*, 2015)

g) Créatininémie

L'évaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et surtout de la créatinine plasmatiques ou sériques permet de rechercher le **critère CRAB d'insuffisance Rénale**. Il se définit selon l'IMWG comme un taux de **créatinine supérieur à 177 µmol/L** (20 mg/L) **ou une clairance de la créatinine inférieure à 40 mL/min**, attribuables au myélome[5].

Une élévation de la créatininémie au-dessus des valeurs normales est observée chez près de la moitié des patients au moment du diagnostic, tandis que 20 % d'entre eux ont un taux supérieur à 177 µmol/L[11]. Cette insuffisance rénale, aussi bien aigüe que chronique, est causée le plus fréquemment par la précipitation intra-tubulaire des CLL monoclonales sous forme de cylindres (« rein myélomateux », cf. supra), qui est la seule des atteintes rénales associées au myélome qui soit spécifique de la maladie. Pour cette raison, seule une insuffisance rénale **imputable à une néphropathie à cylindres** peut remplir le critère diagnostique CRAB selon l'IMWG. En cas de doute (et en particulier si le taux de CLL sériques est < 500 mg/L), le recours à une biopsie rénale est recommandé pour clarifier la cause sous-jacente de l'insuffisance rénale[5].

h) Calcémie

Le dosage du calcium plasmatique ou sérique permet de rechercher la présence du **critère CRAB d'hyperCalcémie**. Il est défini par l'IMWG comme un taux de **calcium supérieur à 2,75 mmol/L** (110 mg/L) **ou supérieur de plus de 0,25 mmol/L** (10 mg/L) **à la limite haute des valeurs normales**, et attribuable au myélome[5].

L'hypercalcémie est présente chez 15 à 20 % des patients lors du diagnostic initial[18]. Ses taux peuvent aller de moins de 3 mmol/L (peu ou pas symptomatique) à exceptionnellement plus de 4 mmol/L (« crise hypercalcémique » potentiellement mortelle). En l'absence de lésions osseuses typiques, la découverte d'une hypercalcémie doit donner lieu à des investigations complémentaires en vue d'écarter une origine autre que le myélome, telle qu'une hyperparathyroïdie primitive à explorer par un dosage sanguin de la parathormone (PTH)[5].

2) Examens biologiques à visée pronostique

a) International Staging System (ISS) : β_2-microglobuline et albumine

La classification ISS élaborée en 2005 (cf. supra) s'est imposée comme un outil essentiel de stratification du niveau de risque, de par la robustesse, la fiabilité et la simplicité de dosage de ses deux biomarqueurs ; leur détermination est recommandée par l'IMWG pour tout patient atteint de myélome au diagnostic.

La β_2-microglobuline, qui correspond à la chaîne légère du HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I, est retrouvée à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Sa synthèse est accrue au cours de plusieurs affections oncologiques et plus particulièrement dans les syndromes lymphoprolifératifs B dont le myélome ; l'élévation de sa concentration plasmatique reflète l'importance de la masse tumorale. La principale limite de ce marqueur réside dans l'augmentation de sa concentration également dans l'insuffisance rénale (puisqu'elle est physiologiquement filtrée par le glomérule puis réabsorbée par les tubules proximaux).

L'albumine, protéine majoritaire en abondance dans le plasma, est une protéine négative de la réaction inflammatoire, dont la synthèse hépatique est diminuée aux dépens des protéines positives. Or dans le myélome, l'IL-6 qui constitue le principal facteur de croissance des plasmocytes tumoraux est synthétisée en abondance par les cellules stromales et les plasmocytes eux-mêmes ; étant également une cytokine inflammatoire, elle entraîne donc la diminution de la concentration d'albumine.

b) Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la conversion réversible du pyruvate en lactate. Elle est présente dans la plupart cellules de l'organisme, et sa concentration plasmatique augmente donc au cours des lyses cellulaires et souffrances d'organes mais aussi dans les affections néoplasiques où elle est corrélée à la charge tumorale. La LDH est ainsi proposée comme marqueur pronostique dans plusieurs hémopathies malignes dont le myélome. Dans la révision de l'ISS (R-ISS) de 2015, son dosage est

préconisé en association avec la β_2-microglobuline, l'albumine, et la détermination des anomalies cytogénétiques[26].

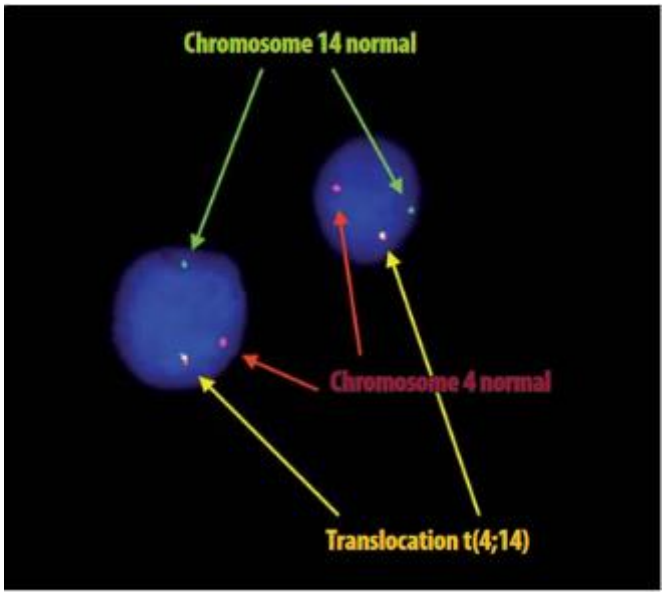
c) Dosage des chaînes légères libres sériques

Le dosage des CLL sériques possède une valeur pronostique au diagnostic du myélome multiple ainsi que pour plusieurs autres dyscrasies plasmocytaires (MGUS, myélome indolent, plasmocytome, amylose AL)[40]. En effet, le niveau de base du rapport des CLL sériques est bien corrélé avec les biomarqueurs de l'ISS (β2-microglobuline et albumine), avec l'élévation de la LDH et de la créatininémie, et avec le degré d'envahissement médullaire. Il est ainsi le reflet de la charge tumorale, et peut être associé à l'ISS afin d'estimer le niveau de risque ainsi que la durée de la survie. L'IMWG recommande donc que le dosage des CLL sériques soit effectué chez tout patient atteint de myélome au diagnostic[40].

d) Examens cytogénétiques

La recherche des anomalies chromosomiques dans le myélome est devenue un outil majeur et incontournable dans l'évaluation pronostique et pour adapter le choix thérapeutique. Historiquement, la réalisation d'analyses cytogénétiques dans le myélome a présenté des **difficultés techniques de réalisation** et manquait de sensibilité, pour deux raisons principales : tout d'abord à cause d'une « dilution » des plasmocytes dans l'échantillon, dans la mesure où l'infiltration médullaire par les plasmocytes dans le myélome est souvent partielle, et leur répartition hétérogène (agrégation en « îlots plasmocytaires »). D'autre part, l'index mitotique des plasmocytes tumoraux est faible, avec une réponse variable aux agents mitogènes utilisés. Ces limites techniques ont pu être dépassées grâce au recours systématique à un système de purification par **tri sur billes magnétiques**. Les plasmocytes sont mis au contact de billes magnétiques porteuses d'Ac anti-CD138 auxquelles ils vont se lier, puis sont retenus et séparés des autres cellules médullaires par passage sur une colonne magnétique. De plus l'emploi de techniques moléculaires sur noyaux en interphase permet de s'affranchir de la nécessité d'obtenir des métaphases en culture.

La technique cytogénétique à utiliser en première intention est la **FISH** (Hybridation *in situ* en fluorescence) sur plasmocytes triés en interphase. Elle permet au moyen de sondes fluorescentes de mettre en évidence les différentes anomalies chromosomiques recherchées, locus par locus. Le Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH) recommande de rechercher au diagnostic au minimum les anomalies suivantes : **t(4;14)**, **del 17p**, et anomalies du chromosome 1 (**gain 1q** et **del 1p**)[24]. La recherche des autres anomalies (hyperdiploïdies, autres translocations impliquant le locus IGH, et del 13q) est facultative.



<u>Figure 21</u> : FISH interphasique sur plasmocytes myélomateux montrant une t(4 ;14)

(d'après Avet-Loiseau, 2007)

L'emploi du caryotype conventionnel est devenu optionnel : en effet il n'est informatif que dans 30 % des cas, l'obtention de métaphases n'étant possible que lorsque la moelle est déjà très envahie et les plasmocytes très proliférants[24].

Plusieurs techniques moléculaires innovantes basées sur des puces à ADN et de très haute résolution permettent de mieux préciser le pronostic du myélome. Il s'agit des techniques pangénomiques de **CGH-Array** (*Comparative Genomic Hybridization*) et de **SNP-Array** (*Single Nucleotide Polymorphism*) qui détectent des anomalies du nombre de copies d'un gène ; ainsi que de la technique transcriptomique de **GEP** (*Gene Expression Profiling*) qui s'intéresse aux ARN messagers et permet d'évaluer la surexpression d'oncogènes.

3) Examens biologiques de suivi

Plusieurs examens biologiques participent au suivi de la maladie et permettent d'établir le degré de réponse au traitement. Ils visent à évaluer le taux de la protéine monoclonale (pour les formes excrétantes de myélome) ainsi que la plasmocytose médullaire, reflets de la charge tumorale. Par ailleurs, d'autres techniques plus sensibles ont été récemment développées afin de rechercher la persistance de cellules tumorales à bas bruit, en-dessous du seuil de détection des techniques conventionnelles : il s'agit des techniques permettant d'étudier la maladie résiduelle minimale ou MRD (*Minimal Residual Disease*). Enfin, d'autres examens visent à surveiller le retentissement clinique du myélome et l'évolution des atteintes d'organes : monitoring des taux d'hémoglobine, de créatinine, et de calcium sanguins.

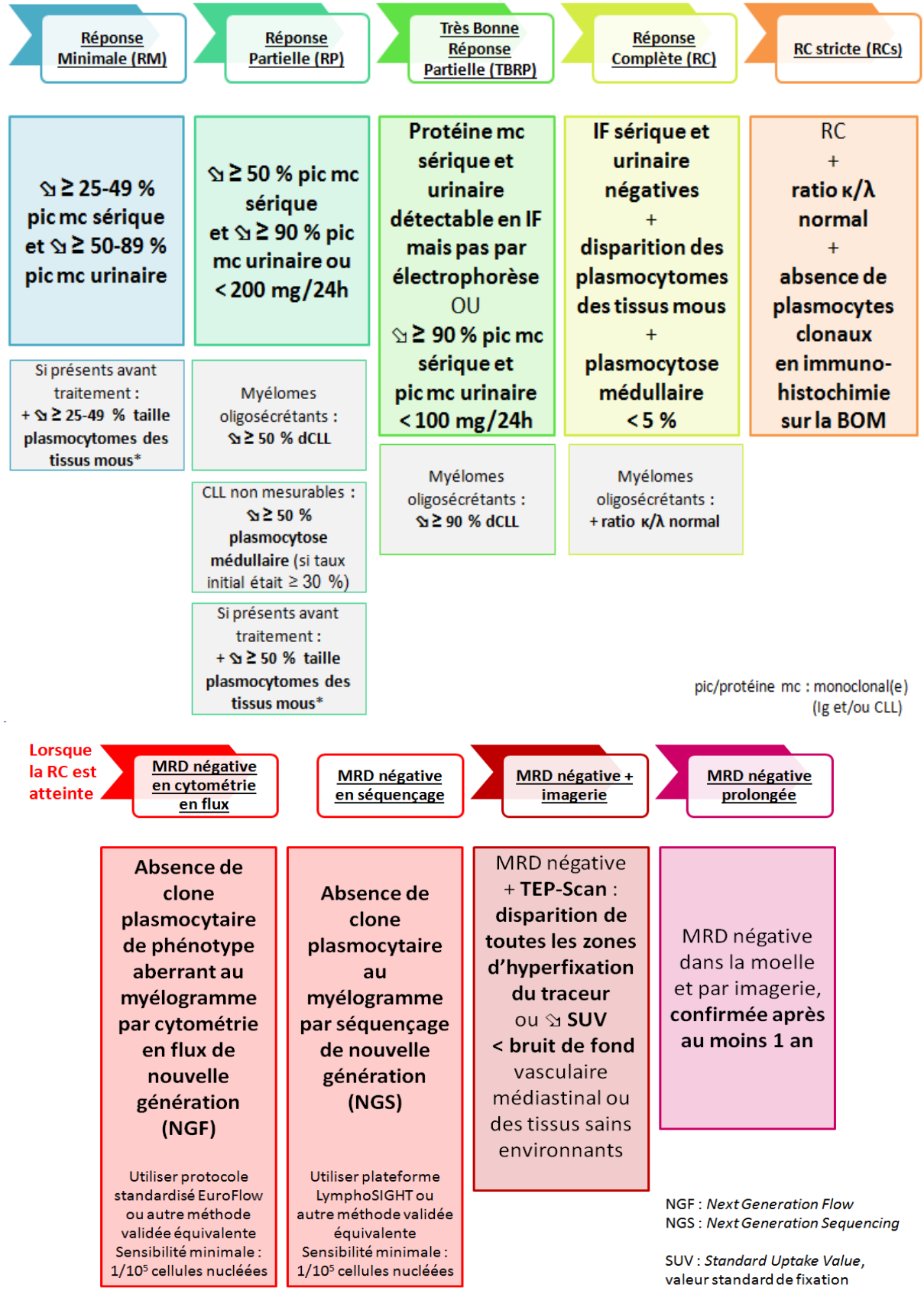
Concernant la quantification du composant monoclonal, le choix des examens à mettre en œuvre pour le suivi va dépendre des critères de « **maladie mesurable** », définis au diagnostic selon l'IMWG par les taux initiaux suivants :

- **Ig monoclonale sérique ≥ 10 g/L**
- **protéine monoclonale urinaire ≥ 200 mg/24h**
- **CLL sérique impliquée ≥ 100 mg/L avec un rapport κ/λ anormal**

Ainsi, pour les patients ayant un pic monoclonal mesurable à la fois dans le sérum et dans l'urine, le suivi devra être effectué sur l'EPS et l'EPU simultanément. Les patients ayant un pic monoclonal mesurable seulement dans le sérum doivent être suivis uniquement par EPS ; ceux ayant un pic monoclonal mesurable seulement dans l'urine (cas des myélomes à CLL avec excrétion rénale) doivent être suivis sur l'EPU. Enfin pour les patients n'ayant pas de composant monoclonal mesurable par électrophorèse ni dans le sérum ni dans l'urine, correspondant aux cas de myélomes oligosécrétants, le suivi se fera par le dosage des CLL sériques, le critère d'évaluation de la réponse étant la différence entre le taux de CLL impliquée et celui de CLL non impliquée (désigné comme la dCLL)[35].

L'IMWG a défini des catégories de niveau de réponse au traitement, qui sont basées sur des critères standardisés actualisés en 2016, incluant notamment des critères pour la MRD. Ils

sont présentés dans la figure ci-dessous. À noter que pour chaque catégorie, l'affirmation de la réponse nécessite une confirmation sur un 2ème prélèvement (sauf pour les évaluations médullaires qui n'ont pas besoin d'être confirmées)[42].



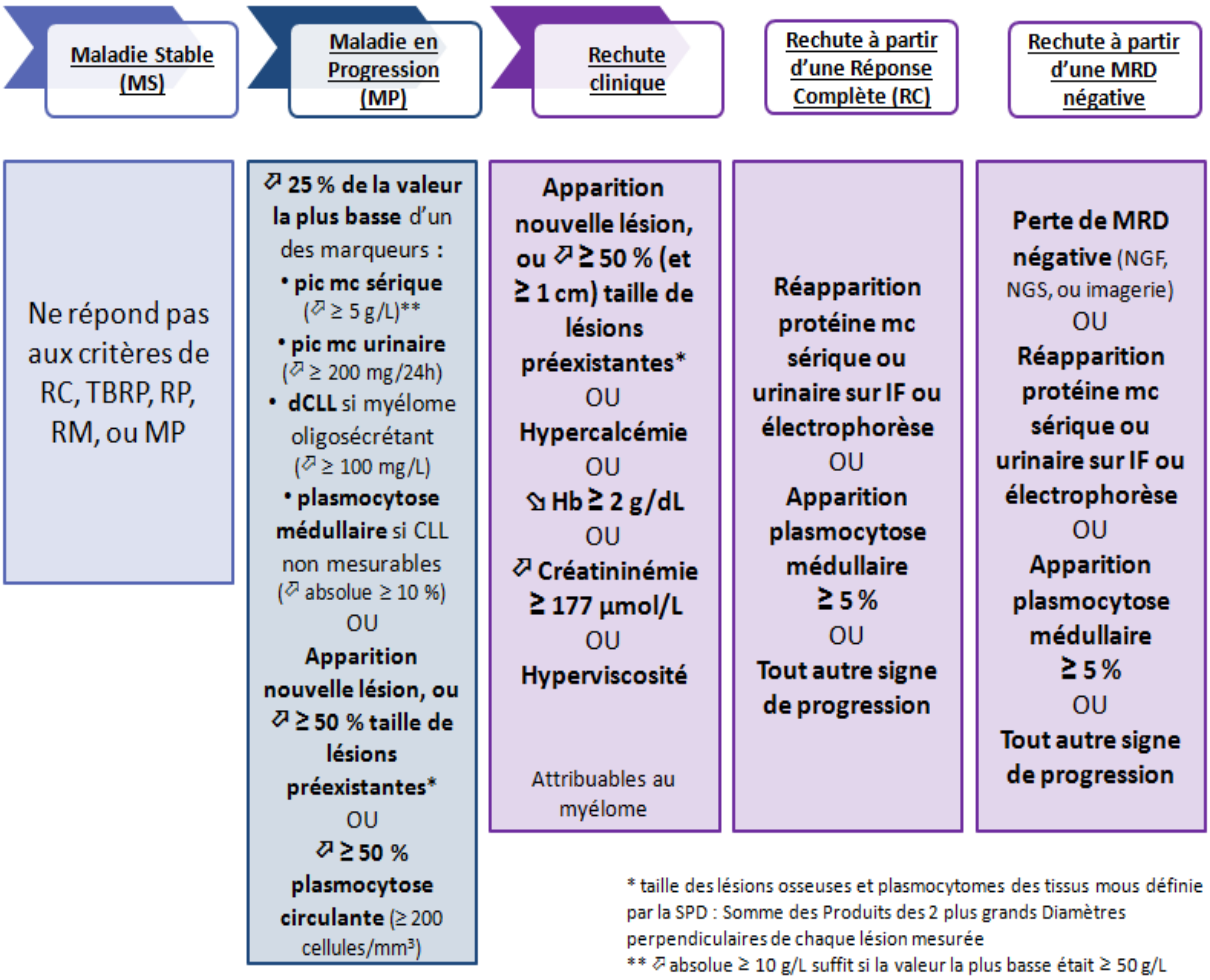


Figure 22 : Critères IMWG d'évaluation de la réponse (d'après Kumar *et al.*, 2016)

a) Électrophorèse et immunofixation des protéines sériques

L'EPS permet de suivre l'**évolution de la concentration de l'Ig monoclonale sérique au cours du traitement**, par l'intégration systématique du pic monoclonal tant que celui-ci est individualisable. La même modalité d'intégration (orthogonale ou tangentielle) devra être conservée tout au long du suivi. Lorsque suite au traitement le niveau du pic monoclonal devient trop faible pour être quantifié mais qu'il reste détectable à l'EPS, sa présence à l'état de traces est rapportée en commentaire[35].

Pour les pics migrant dans les fractions β ou α2 qui se superposent à d'autres protéines (cas fréquent pour les IgA), ainsi que pour les rares myélomes à IgD, le suivi sera effectué

préférentiellement par le dosage néphélémétrique/turbidimétrique de l'isotype d'Ig concerné plutôt que par l'EPS[42].

Dès que le composant monoclonal n'est plus détectable sur l'EPS, le pic ayant totalement disparu, une IF sérique doit être pratiquée, afin de vérifier la clairance ou non de l'Ig monoclonale. La négativité de l'IF est un critère indispensable pour **affirmer une Réponse Complète (RC)** au traitement. Au contraire si l'Ig monoclonale persiste sur l'IF, le patient sera considéré seulement en **Très Bonne Réponse Partielle (TBRP)**. Pour l'affirmation de la RC l'immunofixation est la seule technique utilisable et ne peut pas être remplacée par l'immunosoustraction[35].

Une fois la RC attestée (et confirmée sur un 2ème prélèvement), la surveillance périodique fera appel à l'EPS, et ne nécessite pas de répéter les IF sériques, sauf en cas de **réapparition d'un pic**. Il peut s'agir de la réémergence du pic monoclonal initial (même mobilité électrophorétique et même isotype), traduisant alors une rechute de la maladie inévitable chez la quasi-totalité des patients au bout d'une certaine durée, et qui précède généralement l'apparition des symptômes. Ou bien il peut s'agir de l'émergence de nouvelles anomalies monoclonales, correspondant le plus souvent à des profils oligoclonaux transitoires, qui témoignent d'une reconstitution immunitaire post-autogreffe et sont souvent associés à une évolution plus favorable de la maladie[35].

b) Électrophorèse et immunofixation des protéines urinaires

Le suivi du composant monoclonal urinaire par EPU repose sur les mêmes principes que pour l'évaluation sérique. Le pic monoclonal urinaire doit être intégré tant qu'il demeure quantifiable. Lorsqu'il disparaît totalement de l'électrophorèse, une IF urinaire doit être réalisée ; la **négativité simultanée des IF sérique et urinaire est nécessaire pour pouvoir affirmer la RC**. Lors de la rechute de la maladie le pic urinaire réapparaît généralement sur l'EPU, imposant la reprise de la quantification.

c) Dosage des chaînes légères libres sériques

Le dosage des CLL sériques présente deux indications principales dans le suivi de la maladie[40]. Il permet en premier lieu de réaliser le **suivi des myélomes oligosécrétants**, qui n'ont pas de protéine monoclonale mesurable par électrophorèse ni dans le sérum ni dans l'urine. Le paramètre utilisé pour ce monitoring est alors la **dCLL** (différence entre le taux de CLL impliquée et celui de CLL non impliquée).

D'autre part, pour les patients ayant une maladie mesurable par EPS et/ou EPU et qui ont atteint une Réponse Complète, le dosage des CLL sériques permet de documenter la **RCs (Réponse Complète stricte), qui nécessite la normalisation du rapport κ/λ** pour pouvoir être affirmée.

d) Myélogramme

1. Analyse cytomorpholgique

La réalisation d'un myélogramme (geste médical invasif) au cours du suivi de la maladie n'a pas vocation à être répétée régulièrement, et doit n'avoir lieu que lorsque la protéine monoclonale suivie dans le sérum et/ou dans l'urine n'est plus du tout détectée. Son analyse cytologique vise à rechercher la persistance ou la **disparition de la plasmocytose médullaire afin d'affirmer la RC**, qui requiert un taux de plasmocytes dans la moelle osseuse < 5 %.

En revanche, pour les « vrais » myélomes non excrétants qui ne produisent aucune protéine monoclonale et n'ont de maladie mesurable par aucun des examens sériques ou urinaires (électrophorèses, immunofixations, et dosage des CLL sériques), le suivi ne pourra se faire que par l'évaluation régulière de la plasmocytose médullaire, obligeant à une répétition périodique des myélogrammes (en pratique tous les 3 ou 4 cycles de chimiothérapie)[42].

2. MRD

L'étude de la MRD consiste en l'utilisation de nouvelles techniques de très haute sensibilité permettant de rechercher la persistance de cellules tumorales à bas bruit, indétectable par les techniques conventionnelles. En effet, aujourd'hui avec les nouvelles classes thérapeutiques plus de 50 % des patients atteignent une Réponse Complète au traitement ; or parmi ceux-ci la majorité va pourtant rechuter précocement, traduisant de fait l'existence d'un **contingent résiduel de plasmocytes myélomateux**, non détectés à l'examen cytologique. Deux techniques de laboratoire de haute sensibilité sont aujourd'hui recommandées pour évaluer la MRD dans la moelle osseuse : l'une cellulaire phénotypique, l'autre moléculaire génotypique. Celles-ci peuvent être complétées par des études d'imagerie faisant appel au TEP-Scan, qui permettent une évaluation de la MRD au niveau extra-médullaire[42].

a. Cytofluorométrie en flux

L'emploi de la **cytométrie en flux multiparamétrique avec un minimum de 8 couleurs** (soit 8 marqueurs antigéniques étudiés simultanément) permet d'atteindre des niveaux de sensibilité suffisants pour une utilisation dans l'évaluation de la MRD du myélome ; on parle alors de cytométrie en flux de nouvelle génération ou **NGF** (*Next Generation Flow*). Cette approche consiste à rechercher la persistance du clone plasmocytaire en s'appuyant sur son phénotype antigénique aberrant. Les panels minimums recommandés doivent inclure comme marqueurs de surface les **CD38, CD138, CD45, CD19, CD56, CD27, CD81, et CD117**, auxquels peuvent être ajoutées les chaînes légères intracytoplasmiques κ et λ pour confirmer la clonalité[34]. La mise au point du protocole validé EuroFlow, qui exploite la combinaison de 2 tubes en analyse 8 couleurs, a permis une standardisation des stratégies analytiques entre de multiples laboratoires. La sensibilité obtenue en NGF est de l'ordre de 10^{-5} (1 cellule tumorale pour 100 000 cellules nucléées)[42].

Les avantages de l'évaluation de la MRD par CMF résident dans la rapidité d'exécution de l'analyse (quelques heures), sa relative simplicité et sa disponibilité, les cytomètres 8 couleurs étant largement répandus dans les laboratoires hospitaliers. De plus et contrairement aux techniques génétiques, la CMF est informative chez quasiment 100 % des patients et ne nécessite pas de prélèvement de référence lors du diagnostic (les plasmocytes myélomateux

pouvant toujours être identifiés sur n'importe quel prélèvement grâce à leur phénotype aberrant). Ses inconvénients sont la brève stabilité des échantillons (imposant une analyse dans les 24-48 heures), et une sensibilité inférieure à celle des techniques génotypiques[42].

b. Séquençage de nouvelle génération

La recherche de la MRD peut également s'effectuer par séquençage de l'ADN à haut débit ou **NGS** (*Next Generation Sequencing*). L'utilisation de la plate-forme LymphoSIGHT® permet d'étudier la **séquence des gènes réarrangés des Ig** de toutes les cellules lymphoïdes B présentes dans l'échantillon médullaire. Spécifiquement, vont être séquencés sur le locus IGH les réarrangements VDJ complets et DJ incomplets des chaînes lourdes, ainsi que les réarrangements des chaînes légères κ sur le locus IGK. Les segments d'intérêt sont d'abord amplifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant des sets d'amorces consensus ; puis ils sont séquencés, et les fréquences des différents clonotypes présents dans l'échantillon sont calculées. Pour identifier parmi eux celui correspondant au clone plasmocytaire tumoral, sa séquence doit avoir été déterminée au préalable lors du diagnostic sur un prélèvement de moelle largement infiltré, où il constituait alors le clonotype dominant[42].

Le principal avantage du NGS réside dans sa très grande sensibilité, de l'ordre de 10^{-6} (1 cellule tumorale pour 1 000 000 cellules nucléées), qui en fait la technique la plus sensible actuellement pour l'évaluation de la MRD. De plus, les échantillons pour analyse génétique sont stables plus longtemps que pour la CMF, permettant de différer la réalisation de l'analyse et de travailler sur un échantillon conservé. En revanche, le NGS a l'inconvénient comparé à la CMF d'être une technique lourde et longue, dont l'exécution s'étale sur plusieurs jours. Il nécessite de plus obligatoirement l'analyse d'un prélèvement initial au diagnostic, pour pouvoir identifier la séquence du clone tumoral. Par ailleurs, le NGS n'est pas informatif chez près de 10 % des patients, ceci étant imputable aux hypermutations somatiques[42] : en effet le myélome étant une pathologie post-centre germinatif, les plasmocytes ont subi des mutations aléatoires dans les gènes d'Ig ; or si ces mutations concernent les zones ciblées par les amorces consensus l'amplification par PCR ne pourra pas avoir lieu.

e) Hémoglobine, créatininémie, calcémie

Les examens biologiques servant à rechercher les critères CRAB au diagnostic doivent être répétés tout au long du suivi du myélome : en effet ils sont la traduction des atteintes d'organes et reflètent les conséquences fonctionnelles et le **retentissement clinique de l'évolution de la maladie**. Les dosages de l'hémoglobine, de la créatinine et du calcium sanguins rentrent ainsi dans le critère de rechute clinique de l'IMWG[42] (elle-même souvent précédée d'une réapparition de la protéine monoclonale).

L'anémie finit par s'installer chez quasiment 100 % des patients au cours de l'évolution de la maladie[11]. L'insuffisance rénale est observée chez plus de la moitié des patients au décours du myélome ; elle peut être réversible sous traitement (surtout avec les nouvelles classes thérapeutiques) chez la majorité d'entre eux qui ont une atteinte rénale légère à modérée, mais à l'opposé 10 % des malades développent une atteinte sévère et permanente et deviendront dépendants de la dialyse[43]. L'hypercalcémie apparaît souvent tard dans l'évolution de la maladie et concernera environ un tiers des patients[20].

D. Traitement du myélome et Daratumumab

1) Stratégies thérapeutiques dans le myélome

Le traitement du myélome multiple a radicalement évolué à compter du début des années 2000, avec l'avènement de nouveaux agents thérapeutiques qui ont permis un allongement très significatif de la survie des patients. Ainsi les anciens traitements par anticancéreux « traditionnels » ciblant la synthèse de l'ADN (principalement des agents alkylants avec le Melphalan comme chef de file) ont progressivement été supplantés suite à l'introduction des nouvelles classes thérapeutiques. Deux familles majeures représentent aujourd'hui le socle des traitements modernes du myélome : il s'agit des **inhibiteurs du protéasome (IP)** avec le **Bortézomib** (VELCADE®), et des **immunomodulateurs (IMiDs)** avec le Thalidomide auquel a succédé le **Lénalidomide** (REVLIMID®) qui est mieux toléré. Les inhibiteurs du protéasome agissent en empêchant la dégradation de protéines régulatrices du cycle cellulaire et pro-apoptotiques, tandis que les IMiDs exercent des effets pléiotropes à la fois

immunomodulateurs, anti-prolifératifs, anti-angiogéniques, et anti-inflammatoires. Ces molécules sont associées avec la Dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, le plus souvent sous forme de combinaisons de 3 médicaments (triplets). Plus récemment dans les 5 dernières années, de nouveaux IP (Carfilzomib, et Ixazomib administrable par voie orale) et IMiDs (Pomalidomide) de 2ème génération ont été mis au point. Des Ac monoclonaux thérapeutiques ciblant des antigènes de surface plasmocytaires (anti-CD38 : Daratumumab ; anti-SLAMF7 : Élotuzumab), ainsi que le Panobinostat, un inhibiteur d'histone désacétylase, viennent compléter l'arsenal thérapeutique actuellement sur le marché.

Les schémas thérapeutiques en première ligne diffèrent principalement selon 2 cas de figure :

- Les patients les plus jeunes et en bon état général sont éligibles à une procédure de **chimiothérapie intensive myéloablative**, qui permet d'obtenir les meilleures réponses hématologiques en terme de profondeur et de durée. Pour supporter l'aplasie qui en découle, une **autogreffe de cellules souches hématopoïétiques** (ASCT, *Autologous Stem Cell Transplantation*) est pratiquée, consistant en la réinjection de CSH préalablement recueillies dans le sang périphérique après administration de facteurs de croissance (G-CSF). Ce traitement intensif fait appel à du Melphalan à forte dose (200 mg/m²) ; il est précédé d'une chimiothérapie d'induction (permettant de réduire rapidement la masse tumorale), et se poursuit par une chimiothérapie de consolidation, puis d'entretien au long cours à faible dose.
- Les patients les plus âgés et trop fragiles pour supporter la stratégie intensive avec autogreffe sont traités par une **chimiothérapie standard de moindre toxicité** pendant environ 1 an, suivie là aussi d'un traitement d'entretien au long cours. L'objectif n'est ici pas d'obtenir le meilleur niveau de réponse mais plutôt de permettre un contrôle de la maladie tout en conservant une bonne qualité de vie.

Classiquement l'éligibilité à l'autogreffe était définie selon l'âge du patient avec un seuil retenu de 65 ans, mais aujourd'hui elle prend davantage en compte le *performance status* (échelle d'évaluation de l'état général et de l'autonomie du patient en oncologie) et les comorbidités plutôt que son âge strict[44].

Les schémas thérapeutiques de première ligne pour les patients éligibles et non éligibles à l'autogreffe sont résumés dans la figure suivante :

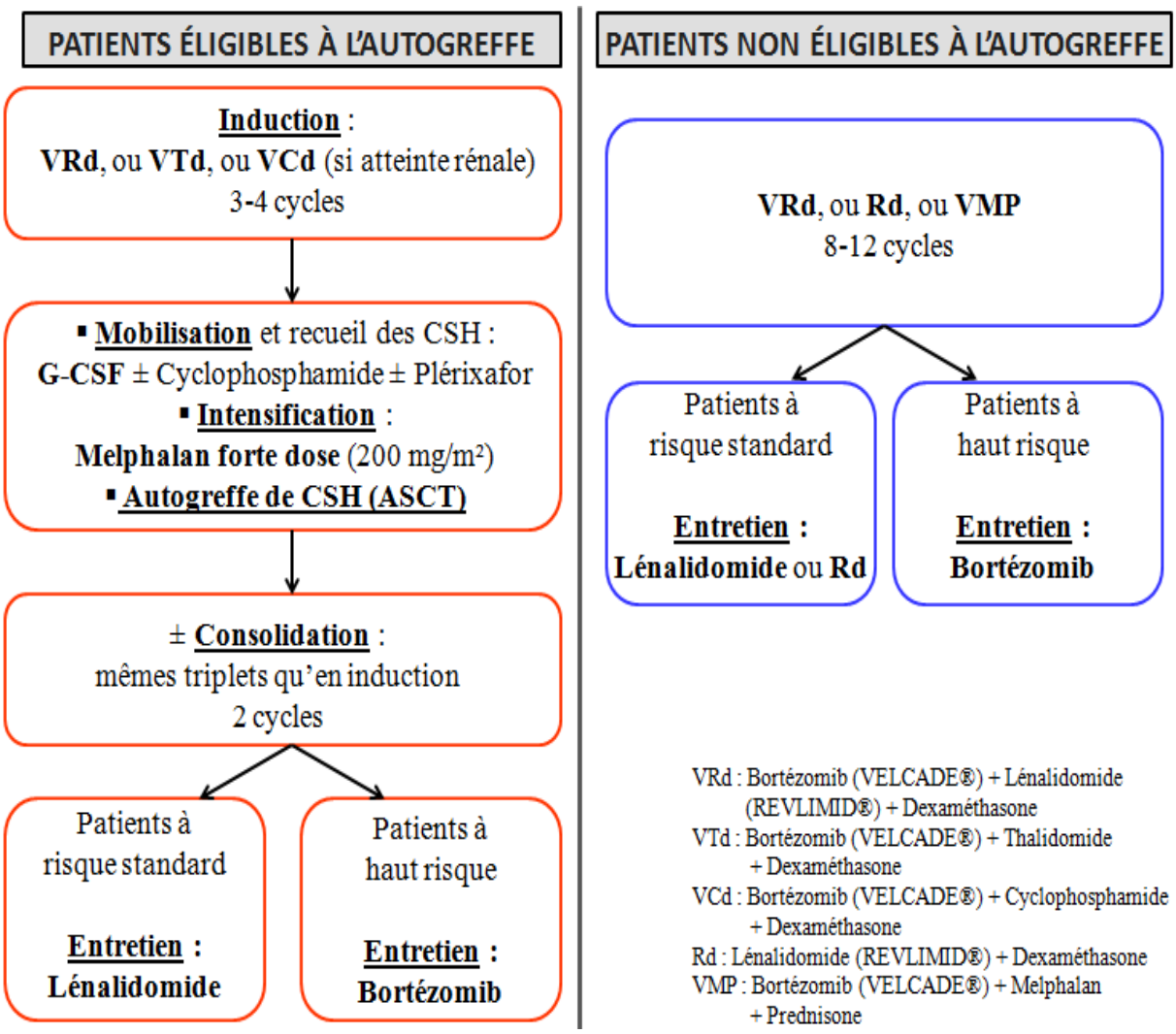


Figure 23 : Stratégies thérapeutiques pour le traitement du myélome en 1ère ligne

(d'après Rajkumar, 2018)

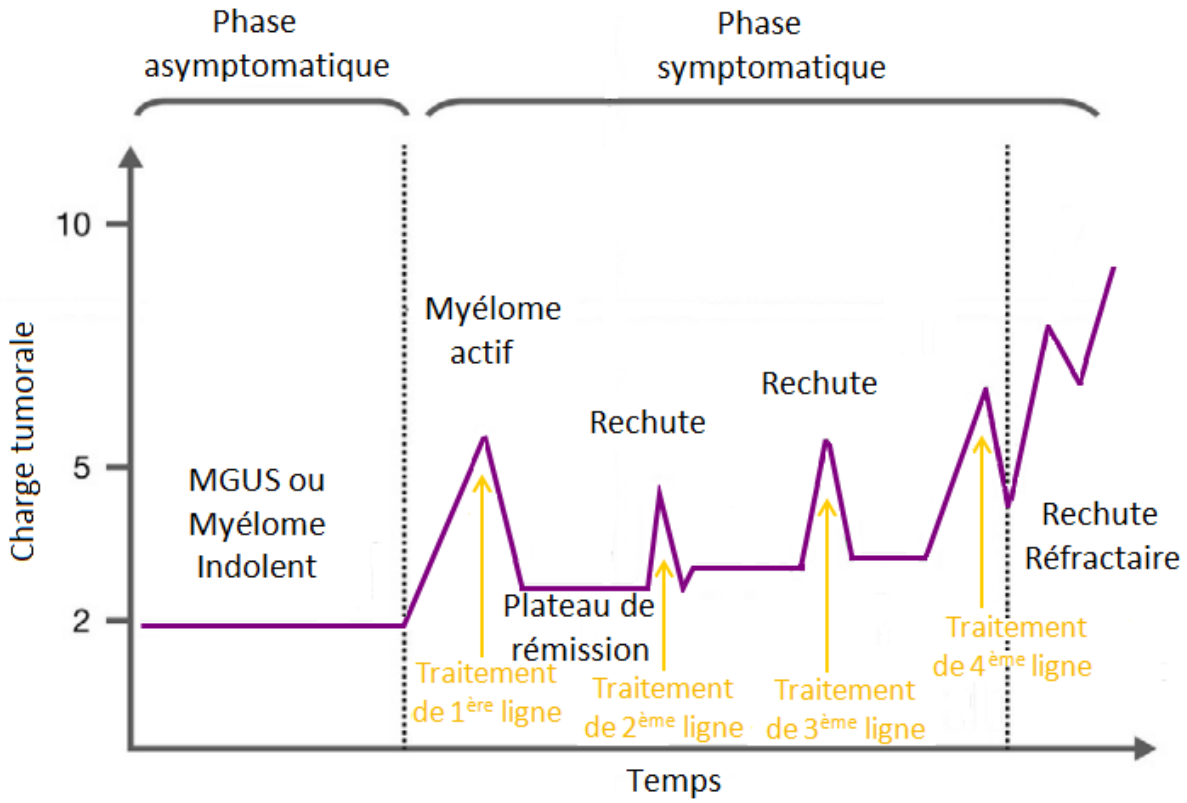
Alternatives pour les greffes de CSH[44] :

- Pour les patients à risque standard, il est possible après l'induction de différer l'intensification avec autogreffe de CSH jusqu'à la première rechute de la maladie, pour des raisons logistiques ou de préférences du patient. Les CSH sont recueillies normalement puis cryoconservées jusqu'à la rechute.
- Pour les patients à haut risque, une double autogreffe (dite en « tandem », consistant en 2 procédures consécutives d'intensification + ASCT) peut être envisagée.
- L'allogreffe de CSH dans le myélome reste controversée en raison de taux de mortalité et de GVH (*Graft Versus Host*, réactions du greffon contre l'hôte)

particulièrement élevés. Elle ne peut s'envisager que dans le cadre d'essais cliniques, préférentiellement pour des patients jeunes et à haut risque.

La quasi-totalité des patients connaîtront une rechute de leur maladie après une réponse à la première ligne de traitement. On définit ainsi[45] :

- myélome en **rechute** : progression de la maladie chez un patient ayant obtenu au moins une réponse minimale, survenant à distance de l'arrêt du traitement après 60 jours
- myélome en **rechute et réfractaire** : progression de la maladie chez un patient ayant obtenu au moins une réponse minimale, survenant sous traitement ou précocement après l'arrêt dans les 60 jours
- myélome **réfractaire primaire** : cas des patients n'ayant jamais obtenu au moins une réponse minimale à la première ligne de traitement



<u>Figure 24</u> : Évolution du myélome sous traitement avec alternance de rémissions et rechutes (d'après Borrello, 2012)

Les choix des combinaisons thérapeutiques pour les patients en rechute et réfractaires sont complexes et influencés par de nombreux facteurs (délai de la rechute, efficacité des

précédents traitements, agressivité de la rechute, état du patient). Les approches thérapeutiques possibles sont présentées dans la figure suivante :

1ère RECHUTE

- **Triplets** comportant 2 molécules parmi les classes suivantes + Dexaméthasone (d) :
  - ✓ IMiDs : Lénalidomide (REVLIMID®, R), Pomalidomide (P)
  - ✓ IP : Bortézomib (VELCADE®, V), Carfilzomib (KYPROLIS®, K), Ixazomib (I)
  - ✓ Ac monoclonaux : Daratumumab (D), Élotuzumab (E)

ex : **DRd**, **DPd**, **DVd**, ERd, IRd, KRd, KPd

- **Nouvelle ASCT** pour les patients autogreffés en 1ère ligne ayant obtenu une réponse prolongée (> 36 mois après entretien)

2ème RECHUTE ET PLUS

- Options de 1ère rechute n'ayant pas été essayées (comportant 2 nouvelles molécules)
- Quadruplets
- Associations basées sur des alkylants : Bendamustine ou Melphalan
- Polychimiothérapies type VDT-PACE
- Associer le Panobinostat
- Vénétoclax (inhibiteur de Bcl-2) pour myélome avec t(11;14)

VDT-PACE : Bortézomib (VELCADE®) + Dexaméthasone + Thalidomide + Cisplatine + Doxorubicine (Adriamycine) + Cyclophosphamide + Étoposide

Figure 25 : Stratégies thérapeutiques pour le traitement du myélome en rechute/réfractaire (d'après Rajkumar, 2018)

2) Le Daratumumab dans le traitement du myélome

L'**immunothérapie** est une approche récente dans le traitement du myélome, qui vise à stimuler l'immunité antitumorale du patient afin de lutter contre les plasmocytes malins. L'emploi d'anticorps monoclonaux thérapeutiques a été la première stratégie explorée dans cette optique, et a démontré une efficacité notable en termes de prolongation de la survie. Ces Ac monoclonaux permettent de cibler avec une haute spécificité des Ag fortement exprimés à la surface des plasmocytes tumoraux et de mobiliser contre eux les défenses immunitaires.

Parmi cette nouvelle classe thérapeutique, le Daratumumab dirigé contre le CD38 est celui qui a montré les résultats les plus prometteurs.

a) Historique des essais cliniques

Les principaux essais cliniques évaluant l'efficacité du Daratumumab dans le traitement du myélome multiple actif sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Historique des essais cliniques évaluant le Daratumumab dans le myélome

(d'après Plesner et Krejcik, 2018)

Nom de l'essai, phase, année d'ouverture	Population de patients	Molécules testées	Survie sans progression (SSP) médiane	Taux de Réponse
GEN501 Phase I/II 2008	Patients en **rechute/réfractaires** n = 42 (phase II avec Dara à 16 mg/kg)	Daratumumab en **monothérapie**	5,6 mois	≥ RP : 36 %
SIRIUS Phase II 2013	Patients en **rechute/réfractaires** n = 106 (Dara à 16 mg/kg)	Daratumumab en **monothérapie**	3,7 mois	≥ RP : 29 %
GEN503 Phase I/II 2012	Patients en **rechute/réfractaires** n = 32 (phase II)	Daratumumab + Lénalidomide + Dexaméthasone (**DRd**)	non atteinte (72 % à 18 mois)	≥ RP : 81 % ≥ TBRP : 62 % ≥ RC : 34 %
CASTOR Phase III 2014	Patients en **rechute/réfractaires** n = 498	Bortézomib + Dexaméthasone ± Daratumumab (**DVd** vs Vd)	non atteinte vs 7,2 mois	≥ RP : 82,9 % vs 63,2 % ≥ TBRP : 59,2 % vs 29,1 % ≥ RC : 19,2 % vs 9,0 %

POLLUX Phase III 2014	Patients en **rechute/réfractaires** n = 569	Lénalidomide + Dexaméthasone ± Daratumumab (**DRd** vs Rd)	non atteinte vs 18,4 mois	≥ RP : 92,9 % vs 76,4 % ≥ TBRP : 75,8 % vs 44,2 % ≥ RC : 43,1 % vs 19,2 %
ALCYONE Phase III 2014	Patients en **1ère ligne non éligibles à l'autogreffe** n = 706	Bortézomib + Melphalan + Dexaméthasone ± Daratumumab (**D-VMP** vs VMP)	non atteinte vs 18,1 mois	≥ RP : 90,9 % vs 73,9 % ≥ TBRP : 71,2 % vs 49,7 % ≥ RC : 42,6 % vs 24,4 %
MAIA Phase III 2015	Patients en **1ère ligne non éligibles à l'autogreffe** n = 737	Lénalidomide + Dexaméthasone ± Daratumumab (**DRd** vs Rd)	non atteinte vs 31,9 mois	≥ RP : 93 % vs 81 % ≥ TBRP : 79 % vs 53 % ≥ RC : 48 % vs 25 %
CASSIOPEIA Phase III 2015	Patients en **1ère ligne éligibles à l'autogreffe** n = 1085	Bortézomib + Thalidomide + Dexaméthasone ± Daratumumab (**D-VTd** vs VTd) en **induction et consolidation** d'ASCT ± **entretien par Daratumumab**	en attente (essai en cours)	après consolidation, RCs : 28,9 % vs 20,3 %

b) *Présentation*

Le Daratumumab, distribué par le laboratoire Janssen-Cilag (siège social : Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Belgique) sous le nom commercial DARZALEX®, est un **Ac monoclonal humain de type IgG1 κ, dirigé contre l'Ag CD38**. Il est produit par génie génétique sur lignées de cellules CHO (issues d'Ovaires d'Hamster Chinois).
Deux autres Ac monoclonaux ciblant le CD38 sont actuellement en cours de développement : l'Isatuximab qui est un Ac monoclonal chimérique de type IgG1 κ, ainsi que MOR202 qui est un Ac monoclonal humain de type IgG1 λ.

Le Daratumumab a été approuvé pour commercialisation en 2015 aux États-Unis puis en 2016 en Europe. Actuellement l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) européenne concerne 3 indications :

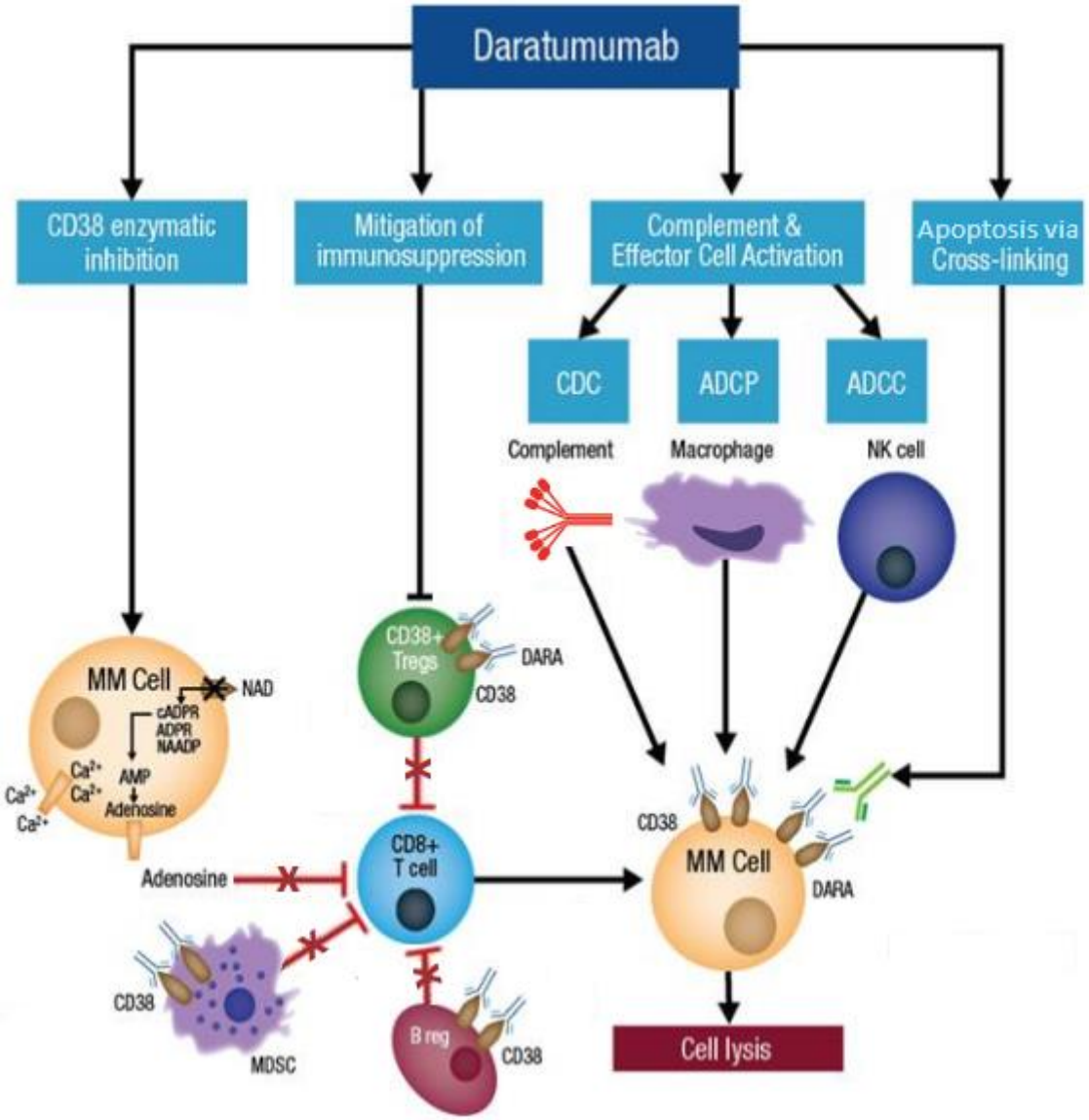
- Chez les patients atteints d'un myélome **en rechute et réfractaire** (préalablement traités par un IP et un IMiD) : **en monothérapie**
- Chez les patients **en 2ème ligne ou plus** de traitement : **en association avec le Lénalidomide et la Dexaméthasone (DRd)** ou **avec le Bortézomib et la Dexaméthasone (DVd)**
- Chez les patients nouvellement diagnostiqués **en 1ère ligne** de traitement et **non éligibles à une autogreffe** de CSH : **en association avec le Bortézomib, le Melphalan et la Prednisone (D-VMP)**

c) *Mécanisme d'action*

Le Daratumumab par sa liaison au CD38 des plasmocytes myélomateux exerce des **effets pléiotropes**, et entraîne la lyse de ces cellules par plusieurs mécanismes associés[46] :

- Recrutement d'effecteurs de l'immunité innée via le fragment Fc :
  - **CDC** : Cytotoxicité Dépendante du **Complément**, avec activation de la voie classique aboutissant à la formation du Complexe d'Attaque Membranaire
  - **ADCP** (*Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*) : **phagocytose** facilitée des plasmocytes tumoraux opsonisés, principalement par les macrophages
  - **ADCC** (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) : dégranulation de **cellules effectrices cytotoxiques** exprimant des récepteurs FcγR, principalement les lymphocytes NK porteurs du FcγRIII (CD16)

- Induction directe de l'**apoptose** des plasmocytes, par mécanisme de ***cross-linking*** (réticulation du Daratumumab sur les plasmocytes après liaison à des Ac secondaires ou à des récepteurs FcγR, entraînant des signaux de mort cellulaire programmée)
- **Inhibition de l'activité enzymatique du CD38** : ADP-ribosyl cyclase, impliquée dans les voies de signalisation calciques, et qui concourt à la génération d'adénosine ayant une action immunosuppressive sur les cellules immunitaires effectrices
- **Déplétion en cellules immunosuppressives porteuses du CD38** : lymphocytes T régulateurs, lymphocytes B régulateurs, et cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*). Ceci aboutit en conséquence à une expansion clonale des lymphocytes T CD4+ et CD8+, qui permet de renforcer la réponse immune adaptative contre les plasmocytes myélomateux.



<u>Figure 26</u> : Mécanismes d'action du Daratumumab (d'après Usmani, 2015)

d) Propriétés pharmacocinétiques

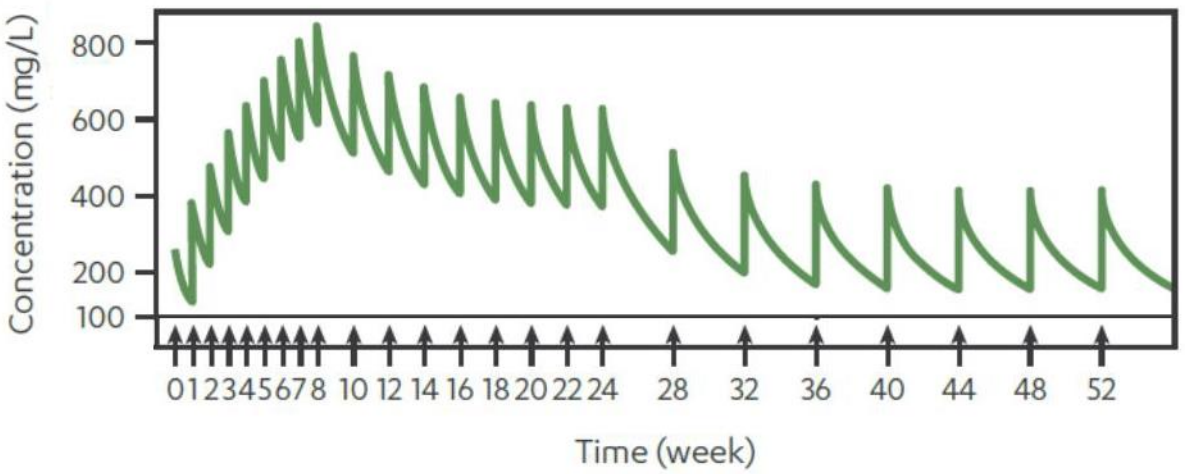
Le Daratumumab est administré par **voie intraveineuse (IV) sous forme de perfusions répétées** ; la voie sous-cutanée (SC) est encore à l'étude, mais les résultats des essais cliniques ont montré un profil pharmacocinétique similaire à celui de la voie IV[47].

Comme la plupart des Ac monoclonaux thérapeutiques, le Daratumumab suit une pharmacocinétique dite **non linéaire**, c'est-à-dire que les principaux paramètres pharmacocinétiques ne sont pas proportionnels à la dose administrée. Ainsi, entre les premières et les dernières perfusions, la concentration plasmatique maximale (C_{max}) augmente de manière plus que proportionnelle à la dose, de même que la surface sous la courbe (SSC), tandis que la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) s'allonge et que la clairance diminue avec l'accumulation du médicament[48].

Ceci s'explique par le fait que les Ac monoclonaux thérapeutiques suivent un modèle d'**élimination médiée par la cible** (**TMDD**, *Target-Mediated Drug Disposition*). En l'occurrence, l'élimination initiale du Daratumumab est conditionnée par sa liaison au CD38 des plasmocytes myélomateux ; le complexe ainsi formé sera alors rapidement détruit par les effecteurs du système immunitaire (cytotoxicité ou phagocytose, cf. supra). Cependant ce mécanisme est **saturable** : ainsi il se produit une accumulation de Daratumumab libre alors que les administrations se répètent et que la quantité de CD38 décroît (avec la baisse de la charge tumorale). L'Ac monoclonal libre se comporte alors par la suite de la même manière qu'une IgG1 endogène : élimination linéaire par les lysosomes des cellules endothéliales, après un circuit de **recyclage mettant en jeu le récepteur FcRn**. Ce mécanisme de recyclage explique la longue demi-vie des IgG d'environ 3 semaines[49].

Les principaux paramètres pharmacocinétiques du Daratumumab évalués au cours des essais de phases I et II (GEN501 et SIRIUS) ont les valeurs moyennes suivantes[48,50] :

- C_{max} (pic) après accumulation à l'issue de la période d'administrations hebdomadaires : 915 mg/L (± 410,3)
- C_{min} (résiduelle) après accumulation à l'issue de la période d'administrations hebdomadaires : 573 mg/L (± 331,5)
- Volume de distribution central : 56,98 mL/kg (± 18,07)
- $t_{1/2}$ après la première administration : 9 jours (± 4,3) = élimination médiée par la cible
- $t_{1/2}$ après administrations répétées et saturation de la cible : 18 jours (± 9)
  = élimination non spécifique par les lysosomes endothéliaux après recyclage



<u>Figure 27</u> : Profil pharmacocinétique du Daratumumab (d'après Xu *et al.*, 2017)
Concentrations plasmatiques en fonction du temps au schéma posologique recommandé

Étant une immunoglobuline, le Daratumumab ne subit ni métabolisme hépatique, ni excrétion biliaire ni excrétion rénale. Par conséquent l'insuffisance hépatique et l'insuffisance rénale n'ont aucune incidence sur sa pharmacocinétique et les patients concernés ne nécessitent pas d'adaptation posologique. De la même manière, l'âge des patients n'a pas d'impact notable sur la pharmacocinétique du Daratumumab[51].
En revanche, la masse corporelle est une covariable qui a une incidence significative sur son élimination et sa distribution : la posologie de Daratumumab devra donc être ajustée en fonction du poids des patients[50].

e) Effets indésirables

Le Daratumumab présente un profil de tolérance globalement très favorable, qui est dominé par la survenue de **Réactions Liées à la Perfusion** (RLP) fréquentes avec les Ac monoclonaux thérapeutiques. Sous ce terme sont regroupées à la fois des manifestations d'hypersensibilité immédiate médiées par les IgE et des manifestations dues au syndrome de relargage des cytokines, les symptômes étant similaires et les étiologies difficiles à discriminer. Des RLP ont été observées avec le Daratumumab chez environ 40 à 70 % des patients traités, survenant pour la plupart au cours de la première perfusion du médicament. Elles sont dans la très grande majorité des cas d'intensité légère à modérée, et se caractérisent par des manifestations à type de congestion nasale, irritation de la gorge, toux, fièvre, frissons, nausées, vomissements, voire bronchospasme et dyspnée[51].

En plus des RLP, les autres effets indésirables les plus fréquents avec le Daratumumab (survenant à distance de la perfusion) sont principalement hématologiques avec des cytopénies portant sur les 3 lignées (anémie, neutropénie, thrombopénie), des infections des voies respiratoires supérieures, de la fatigue, de la toux, et des diarrhées[52].

f) Administration

Le Daratumumab est administré à la dose optimale de **16 mg/kg** de masse corporelle en perfusion intraveineuse, dilué en solution de NaCl à 0,9 %. Le débit de perfusion doit être augmenté très progressivement par paliers au cours de l'administration, ceci afin d'éviter la survenue de RLP[51]. Dans le même but, la dose de 16 mg/kg pourra lors de la première administration être répartie en deux fois sur deux journées consécutives (8 mg/kg chaque jour).

Les fréquences d'administration du Daratumumab validées en fonction de ses différentes indications sont les suivantes :

- en monothérapie ou en association avec le Lénalidomide, pour des patients en rechute/réfractaires :
  - hebdomadaire pendant 8 semaines
  - puis toutes les 2 semaines pendant 16 semaines
  - puis mensuel au-delà
- en association avec le Bortézomib, pour des patients en rechute/réfractaires :
  - hebdomadaire pendant 9 semaines
  - puis toutes les 3 semaines pendant 15 semaines
  - puis mensuel au-delà
- en association avec le Bortézomib, le Melphalan, et la Prednisone (D-VMP), pour des patients en 1ère ligne non éligibles à l'autogreffe :
  - hebdomadaire pendant 6 semaines
  - puis toutes les 3 semaines pendant 48 semaines
  - puis mensuel au-delà

Afin de prévenir la survenue des RLP, une **prémédication** doit être administrée environ 1 heure avant chaque perfusion de Daratumumab, composée de :

- corticoïdes à faible dose, par voie IV (envisageable par voie orale pour les perfusions ultérieures s'il n'y a pas eu de RLP initialement)
- antipyrétiques : Paracétamol par voie orale
- antihistaminiques, par voie orale ou IV

L'ajout du Montélukast (antagoniste du récepteur aux leucotriènes $CysLT_1$) comme prémédication est possible mais facultatif[51].

Les patients doivent être surveillés tout au long de la perfusion pour détecter la survenue éventuelle d'une RLP. Si une telle réaction est observée, l'administration de Daratumumab doit être interrompue et les symptômes pris en charge ; la perfusion pourra alors être reprise à un débit inférieur, qui pourra être de nouveau augmenté par la suite en respectant les paliers. En cas de RLP d'intensité sévère observées au cours de 3 perfusions successives, le Daratumumab devra être définitivement arrêté[51].

Pour prévenir la survenue de RLP retardées, une **médication post-perfusion** faite de corticoïdes oraux doit être administrée le lendemain et le 2ème jour après la perfusion.
Par ailleurs, les patients ayant des antécédents d'asthme et de BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) devront également recevoir comme traitement post-perfusion des bronchodilatateurs (agonistes β_2-adrénergiques) à courte et longue durée d'action ainsi que des corticoïdes inhalables, qui pourront être arrêtés à l'issue des 4 premières perfusions si le patient n'a présenté aucune RLP majeure[51].

Enfin, le traitement par Daratumumab augmentant le risque de réactivation du VZV (*Varicella-Zoster Virus*) sous forme de zona, une prophylaxie anti-virale par Aciclovir ou Valaciclovir devra aussi être administrée[51]. Des cas de réactivation du virus de l'hépatite B (VHB) ont également été rapportés sous Daratumumab, imposant la réalisation d'une sérologie de dépistage avant toute initiation du traitement, la surveillance des signes de réactivation pour les patients séropositifs, et la suspension du traitement en cas de réactivation avérée.

3) Interférences du Daratumumab sur les examens biologiques

L'emploi du Daratumumab, de par sa nature même d'Ac monoclonal et sa spécificité contre le CD38, peut être à l'origine d'interférences sur plusieurs examens biologiques de laboratoire, qui posent problème dans l'évaluation de la réponse au traitement et dans le bilan pré-transfusionnel.

a) Interférence sur l'EPS et l'IF sérique

Le Daratumumab étant une immunoglobuline monoclonale d'isotype IgG1 κ administrée en intraveineuse, il peut être détecté sur les examens sériques d'électrophorèse des protéines et d'immunofixation au même titre que les autres Ig endogènes. Le Daratumumab apparaît ainsi sur ces examens de suivi sous la forme d'une bande monoclonale avec un profil de migration sur gel caractéristique à l'**extrémité cathodique des γ-globulines**. La concentration attendue de ce pic monoclonal sur l'EPS, comme l'ont montré les études pharmacocinétiques (cf. supra), peut atteindre à l'issue de la phase d'accumulation **jusqu'à 1 g/L** en moyenne[53].
En revanche, n'ayant pas d'excrétion rénale, le Daratumumab n'apparaît pas sur l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines urinaires, et étant une Ig entière il n'interfère pas non plus sur le dosage des CLL sériques[54].

Or les critères IMWG de réponse au traitement stipulent que pour affirmer une Réponse Complète la négativité de l'IF sérique (ainsi qu'urinaire) est indispensable, témoignant d'une clairance totale de la protéine monoclonale du myélome. L'apparition du Daratumumab engendre une fausse positivité qui peut donc conduire à **méconnaître une RC**, le patient étant alors classé à tort seulement en TBRP. La profondeur de la réponse au traitement se trouve sous-estimée, ce qui peut avoir comme conséquence un éventuel surtraitement du patient[55].
Deux cas de figure sont à distinguer, selon l'isotype et la mobilité électrophorétique de l'Ig monoclonale endogène relative au myélome :

- <u>IgG κ comigrant avec le Daratumumab</u> : dans ce cas les deux bandes monoclonales ne peuvent pas être différenciées l'une de l'autre. Sur l'EPS le Daratumumab surestime légèrement la quantification du composant monoclonal d'un maximum de 1 g/L, mais surtout il est susceptible de **masquer la clairance de l'IgG κ endogène** sur l'IF sérique, ce qui empêche de documenter la RC. Il est rapporté que près de la moitié des

cas de myélomes à IgG κ ont une protéine monoclonale se superposant au moins partiellement avec le Daratumumab dans la région γ lente[55] (soit environ 15 % de tous les myélomes).

- IgG κ non comigrante, ou autre isotype : les deux bandes monoclonales sont dans ce cas facilement différenciables et ne peuvent pas être confondues. Mais celle correspondant au Daratumumab peut être interprétée à tort comme l'**apparition d'un nouveau clone**, qu'il soit bénin (cas fréquent de profils oligoclonaux lors de reconstitution immunitaire post-autogreffe) ou malin (plus rare, conséquence de l'évolution clonale du myélome)[53].

Afin de pouvoir évaluer correctement la réponse biologique au traitement, des stratégies ont été développées visant à s'affranchir de l'interférence du Daratumumab sur les gels d'IF sérique. Elles reposent sur l'emploi *in vitro* d'un Ac monoclonal anti-idiotype ciblé contre le Daratumumab, qui va induire le déplacement de ce dernier sur le gel vers une position plus anodique où il ne gênera pas la lecture. Dans un premier temps un test expérimental désigné sous l'acronyme **DIRA** (*Daratumumab-specific Immunofixation electrophoresis Reflex Assay*) a été mis au point pour pouvoir suivre les patients inclus dans les essais cliniques. Cette technique lourde a par la suite été adaptée sous forme d'un test semi-automatisé en vue du suivi des patients en routine, commercialisé sous le nom d'**Hydrashift 2/4 Daratumumab®** par la société Sebia, et qui fait l'objet de cette étude. Ces deux techniques sont présentées ci-après dans la partie Matériels et méthodes.

Outre les stratégies utilisant des Ac anti-idiotype pour lever l'interférence du Daratumumab sur les gels d'IF, d'autres approches basées sur la **spectrométrie de masse** ont été récemment développées ; elles sont évoquées plus loin dans la partie Discussion.

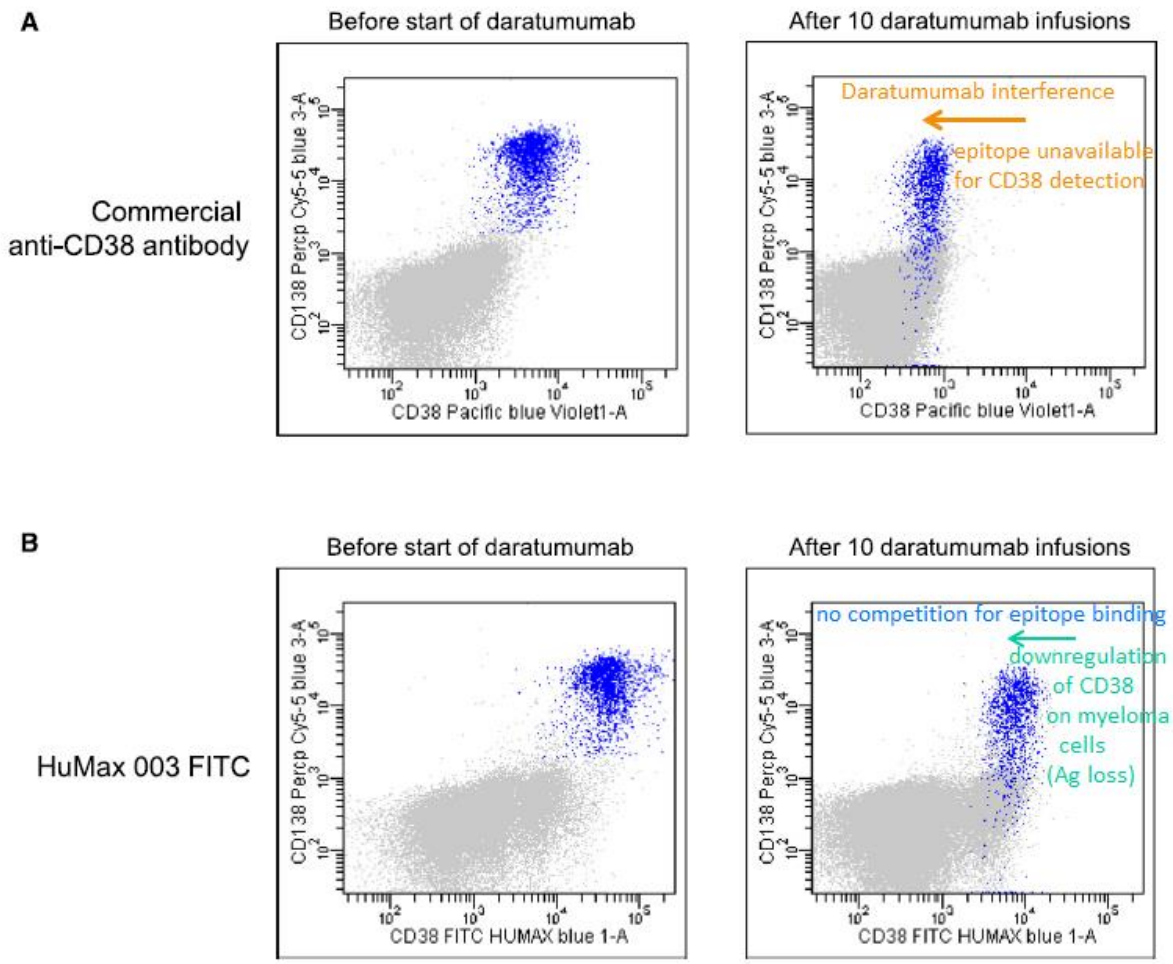
b) Interférence sur la CMF multiparamétrique

La cytométrie en flux multiparamétrique à au moins 8 couleurs est l'une des deux techniques recommandées pour évaluer la MRD dans la moelle osseuse, chez les patients ayant obtenu une RC au cours de leur traitement. Le CD38, cible du Daratumumab, est un marqueur antigénique de surface essentiel dans cette optique : il permet en combinaison avec le CD138

de repérer les plasmocytes totaux de la moelle osseuse, les autres marqueurs du panel servant à discriminer parmi eux les plasmocytes myélomateux résiduels[53].
Or le Daratumumab par sa liaison à cet Ag interfère sur l'examen : il **bloque l'accès à l'épitope du CD38** également ciblé par la plupart des Ac anti-CD38 commercialisés comme réactifs de cytométrie en flux. Cette compétition entre l'Ac monoclonal thérapeutique et Ac monoclonaux diagnostiques peut être à l'origine d'une absence de détection des plasmocytes et donc d'une fausse négativité de l'analyse, avec **sous-estimation du niveau de MRD**[53,56].

Afin de contourner cette interférence ont été développés de **nouveaux Ac diagnostiques anti-CD38 se liant à un épitope différent** de celui ciblé par le Daratumumab. Ainsi l'Ac HuMax-003 récemment développé par le laboratoire Janssen, de même que l'anti-CD38 inclus dans le panel du protocole EuroFlow sont deux réactifs qui n'entrent pas en compétition avec le Daratumumab et permettent de ce fait une détection fiable du CD38 en CMF[53].
Cependant, même en l'absence de compétition pour la liaison à l'Ag, il a été observé que le traitement par Daratumumab peut induire *in vivo* une réduction de l'expression du CD38 à la surface des plasmocytes tumoraux, cette perte de l'Ag constituant un mécanisme de résistance de la tumeur[57]. Toutes les stratégies de CMF exploitant le CD38 aboutiront alors dans ce cas à un faux négatif, quel que soit l'épitope ciblé.

Pour pallier l'impossibilité d'utiliser le CD38 en CMF, d'**autres marqueurs d'identification plasmocytaire** pourraient être utilisés en replacement, tels que les CD229, CD269 (BCMA, *B-Cell Maturation Antigen*, actuellement exploité comme cible dans plusieurs stratégies d'immunothérapie du myélome) ou CD319 (SLAMF7, cible de l'Élotuzumab)[53].
La solution alternative consiste à réaliser l'évaluation de la MRD médullaire par la **technique moléculaire de NGS**, qui elle n'est pas impactée par les Ac monoclonaux thérapeutiques[42,53].



<u>Figure 28</u> : Influence du Daratumumab sur la détection des plasmocytes en CMF

(d'après van de Donk *et al.*, 2016)

(A) Avec un Ac diagnostique anti-CD38 commercial ; (B) Avec HuMax-003

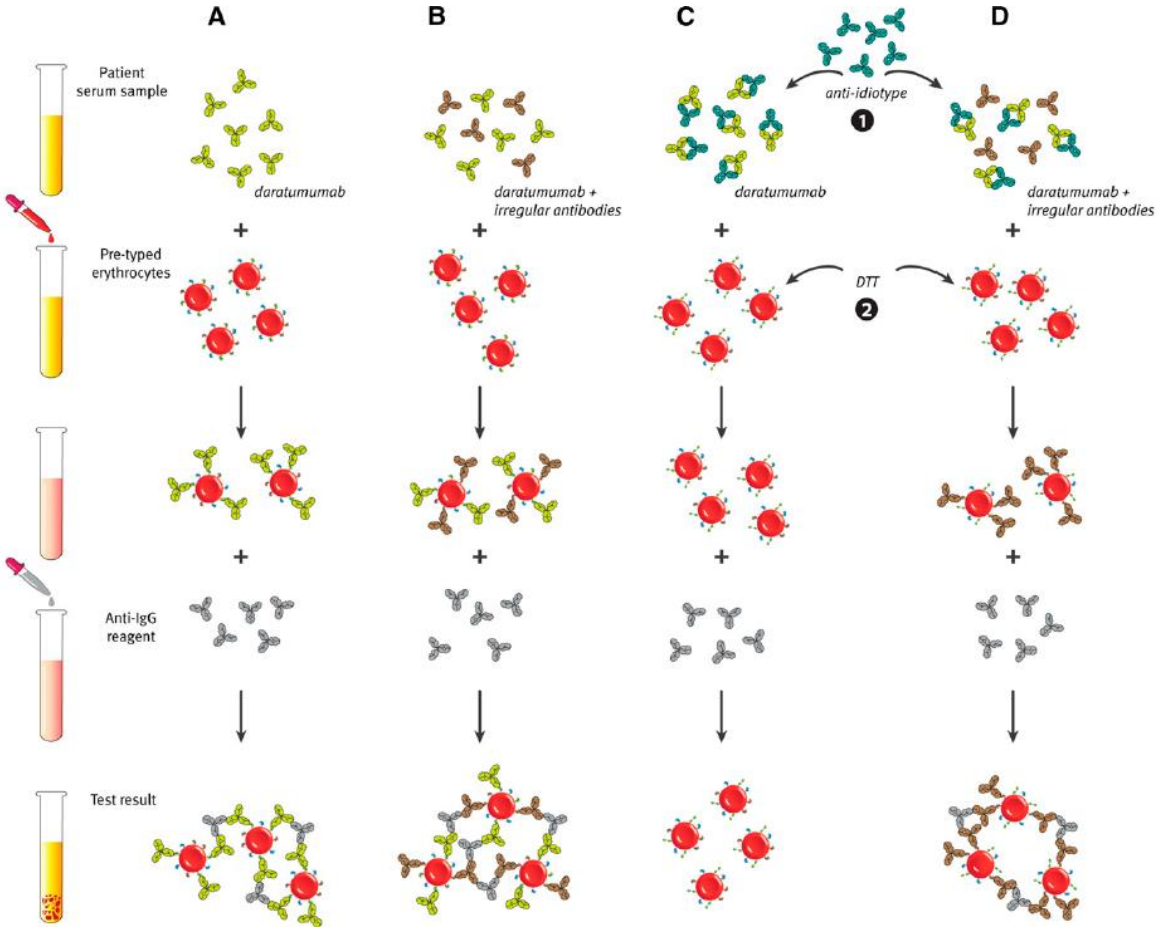
c) Interférence sur les tests pré-transfusionnels d'immuno-hématologie

En plus de son expression sur les plasmocytes, le CD38 est également représenté sur de nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques ; en particulier il est faiblement exprimé à la surface des érythrocytes humains. Cette caractéristique est à l'origine d'une interférence du Daratumumab sur certains examens d'immuno-hématologie faisant partie du bilan pré-transfusionnel de routine. Il a été démontré que le Daratumumab n'occasionne pas d'interférence sur la détermination des groupes sanguins des systèmes ABO, Rhésus et Kell. En revanche, la liaison du Daratumumab du plasma des patients au CD38 des hématies-tests est à l'origine d'une **fausse positivité systématique du test de Coombs indirect à l'antiglobuline, utilisé dans la Recherche d'Anticorps Irréguliers (RAI)** et leur identification (ainsi que dans l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire ou

crossmatch érythrocytaire). L'image de panagglutination observée mime la présence d'un anticorps anti-public, et surtout va **masquer la présence d'un éventuel allo-anticorps sous-jacent**, pouvant être à l'origine lors de la transfusion d'une réaction hémolytique sévère[58]. Cette interférence *in vitro*, qui persiste jusqu'à 6 mois à distance de la dernière perfusion de Daratumumab, complique donc le choix des produits sanguins labiles et peut entraîner un retard de la prise en charge transfusionnelle. Par contre *in vivo* la liaison du Daratumumab au CD38 des hématies du patient n'entraîne pas d'hémolyse significative[59].

Pour lever l'interférence du Daratumumab sur la RAI, deux approches ont été développées par les laboratoires d'immuno-hématologie. La première consiste à réaliser une dénaturation du CD38 des hématies-tests par du **DiThioThréitol (DTT)**, un agent réducteur. Ce pré-traitement permet alors de mettre en évidence les éventuels allo-Ac sous-jacents du patient ; il s'agit d'une stratégie facile à mettre en œuvre et peu onéreuse. Cependant, le DTT entraîne aussi la dégradation d'autres Ag érythrocytaires, dont les plus importants en termes de risque hémolytique sont ceux du système Kell. Par conséquent la présence d'allo-Ac anti-Kell ne peut être exclue, et les patients devront donc être transfusés en concentrés de globules rouges Kell négatifs[58].
L'autre approche consiste à neutraliser le Daratumumab du plasma du patient, en utilisant un **Ac anti-idiotype du Daratumumab**, ou bien en le saturant avec du **CD38 soluble recombinant**. Les inconvénients de cette stratégie résident dans le coût plus important et la disponibilité limitée de ces réactifs, comparativement au DTT[59].

Ces deux approches ayant chacune des limites, il est recommandé par précaution avant tout traitement par Daratumumab de réaliser le phénotypage érythrocytaire étendu du patient (détermination des groupes des systèmes ABO, D, C, c, E, e, Kell, Kidd, Duffy, et MNS) ainsi qu'une RAI (pour détecter des allo-Ac pré-existants). Le génotypage est une technique alternative au phénotypage mais plus onéreuse ; néanmoins lorsque le patient a été transfusé récemment ou que le traitement par Daratumumab a déjà débuté, seul le génotypage est utilisable. Si une transfusion sanguine est requise, le patient devra être transfusé en **concentrés de globules rouges phénocompatibles**, d'après les résultats du phénotypage/génotypage[53]. Enfin l'information d'un traitement par Daratumumab devra être systématiquement transmise au laboratoire d'immuno-hématologie ; il est en particulier préconisé que chaque patient soit porteur d'une carte de transfusion sanguine précisant la nature de son traitement par Ac anti-CD38[51].



<u>Figure 29</u> : Interférence du Daratumumab sur le test de Coombs indirect

(d'après van de Donk *et al.*, 2016)

(A) Panagglutination sur la RAI en présence de Daratumumab, (B) masquant la présence d'allo-Ac ; (C) Levée de l'interférence par neutralisation du Daratumumab ou dénaturation du CD38, (D) permettant la détection des allo-Ac

II. Matériels et méthodes

A. Test Hydrashift 2/4 Daratumumab®

1) Historique : test DIRA

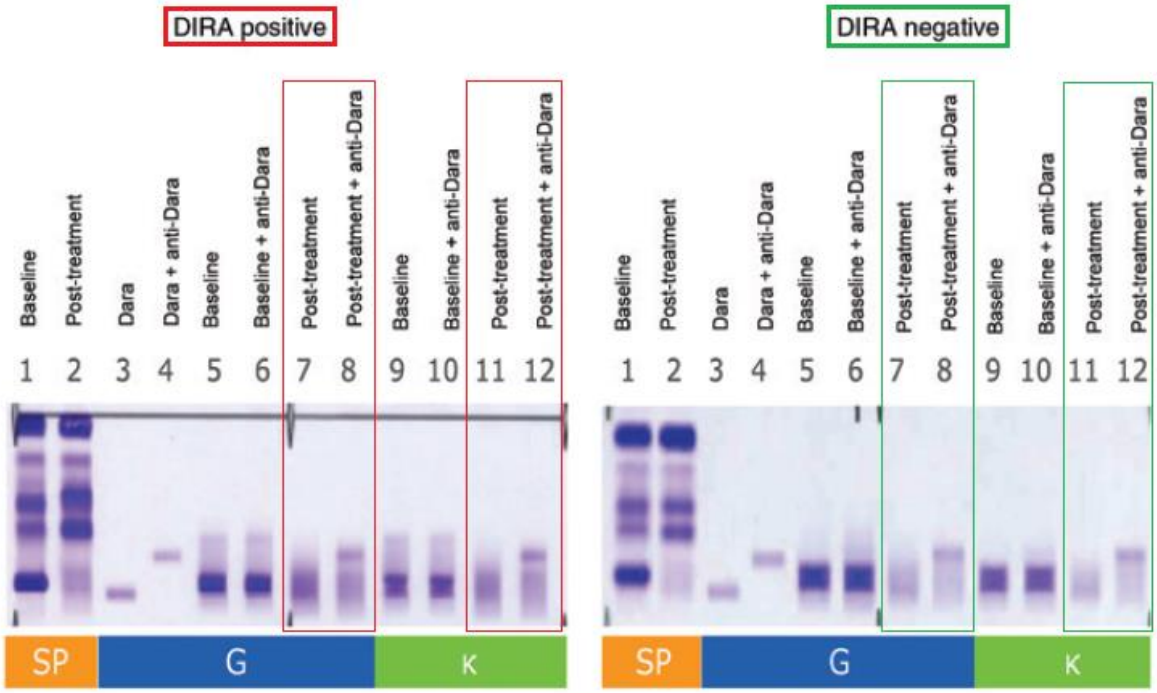
Pour s'affranchir de l'interférence du Daratumumab sur l'IF sérique, le laboratoire Janssen-Cilag a mis au point un test désigné sous l'acronyme DIRA (*Daratumumab-specific Immunofixation electrophoresis Reflex Assay*), afin de permettre d'évaluer correctement la réponse biologique au traitement. Ce test repose sur l'emploi *in vitro* d'un **Ac monoclonal murin anti-idiotype dirigé contre la partie variable du Daratumumab**. Le complexe ainsi formé ayant une mobilité électrophorétique modifiée, le Daratumumab est alors déplacé vers la zone des β-globulines, ce qui rend possible sa distinction avec l'Ig monoclonale endogène.

Le DIRA est une technique expérimentale développée pour le suivi des patients inclus dans les essais cliniques, qui correspond à une adaptation de l'IF sur 12 pistes utilisant des antisérums anti-chaîne lourde γ et anti-chaîne légère κ :

- pistes 1 et 2 : échantillon initial du patient avant traitement et échantillon après traitement par Daratumumab, avec un fixateur non spécifique des protéines totales ; montrent les profils de migration de l'ensemble des protéines sériques
- pistes 3 et 4 : contrôles de migration du Daratumumab seul et du Daratumumab déplacé par l'Ac anti-idiotype
- pistes 5 et 6 (révélées par l'antisérum anti-γ) : échantillon initial seul et avec l'Ac anti-idiotype ; pour visualiser la migration de l'Ig monoclonale endogène, et démontrer que l'Ac anti-idiotype n'a pas d'effet sur elle (spécificité)
- pistes 7 et 8 (révélées par l'antisérum anti-γ) : échantillon post-traitement seul et avec l'Ac anti-idiotype ; pour visualiser l'interférence du Daratumumab, puis s'en affranchir grâce à son déplacement
- pistes 9 à 12 : même contenu que les pistes 5 à 8 mais avec l'antisérum anti-κ[60].

Lorsqu'un test DIRA est réalisé, deux résultats sont possibles[60] :

- ✓ <u>DIRA positif</u> : le Daratumumab ayant été déplacé, persistance de l'Ig monoclonale pathologique
- ✓ <u>DIRA négatif</u> : le Daratumumab ayant été déplacé, absence de l'Ig monoclonale pathologique



<u>Figure 30</u> : DIRA, exemples de tests positif et négatif (d'après McCudden *et al.*, 2016)

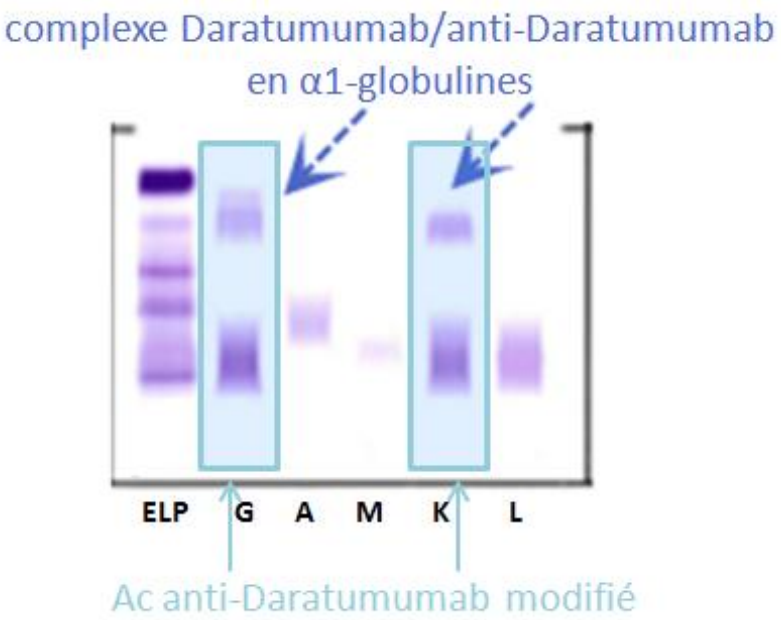
La limite de sensibilité de la technique (plus basse concentration de Daratumumab détectable et déplaçable par l'Ac anti-Daratumumab) a été mesurée à 200 mg/L, tandis que sa spécificité est de 100 % (aucun effet de l'Ac anti-Daratumumab sur les Ig monoclonales endogènes)[60].

Le test DIRA présente cependant certaines limites qui sont un frein à une utilisation en pratique courante : il s'agit d'une technique lourde et avec beaucoup d'étapes manuelles, et qui puisqu'elle requiert 12 pistes d'immunofixation représente des coûts supplémentaires en réactifs pour le laboratoire. De plus le DIRA nécessite pour chaque test d'avoir un contrôle de migration du Daratumumab ainsi que d'avoir conservé un échantillon initial de sérum du patient au diagnostic.

2) Principe de l'Hydrashift

Compte-tenu des limites du test DIRA historique, une adaptation automatisable a été développée par le fournisseur de matériels et de réactifs d'électrophorèses Sebia (siège social : 27 rue Leonard de Vinci, 91090 Lisses, France) en collaboration avec le laboratoire Janssen-Cilag, et commercialisée pour utilisation en pratique clinique sous le nom d'Hydrashift 2/4 Daratumumab®. Ce test présente l'intérêt de pouvoir être pratiqué **conjointement à la technique d'IF sérique semi-automatisée de Sebia** : kits Hydragel 2 IF® ou Hydragel 4 IF® sur les automates de la gamme Hydrasys 2®. Il s'agit d'une technique validée et standardisée, qui a reçu le marquage CE pour commercialisation en Europe en 2016, et a été approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis en 2018.

L'Hydrashift repose là aussi sur l'utilisation d'un Ac monoclonal anti-idiotype du Daratumumab, mais qui comparativement à celui du DIRA a été **modifié pour permettre une migration du complexe plus anodique dans la zone des α1-globulines**. Cet antisérum complémentaire est disposé uniquement sur les pistes IgG et κ de l'immunofixation, au moyen d'un applicateur supplémentaire de couleur verte, qui se juxtapose dans l'automate à l'applicateur classique de couleur grise contenant le sérum des patients à analyser[61].



<u>Figure 31</u> : Principe de l'Hydrashift 2/4 Daratumumab® (d'après Caillon *et al.*, 2016)

3) Mode opératoire

Au cours de notre étude, le kit Hydrashift 2/4 Daratumumab® (référence Sebia n°4639) a été utilisé conformément aux instructions du fournisseur, sur l'automate HYDRASYS 2 SCAN et avec le kit d'immunofixation HYDRAGEL 4 IF Violet acide - Masque standard. Les étapes de la technique sont présentées ci-dessous :

- <u>Préparation des applicateurs gris</u> contenant les sérums des patients à analyser :
  - Les applicateurs gris peuvent être préparés par pipetage manuel ou par pipetage automatique avec l'automate ASSIST de Sebia, qui a été utilisé au cours de notre étude. Pour l'analyse de 4 échantillons de patients avec le kit Hydragel 4 IF®, 2 applicateurs gris sont utilisés (chacun permettant de déposer le sérum de 2 patients sur les 6 pistes d'immunofixation).

    Les échantillons de sérums doivent être déposés dilués pour éviter le phénomène de zone par excès d'Ag. La dilution à effectuer pour chaque piste dépend du dosage pondéral des isotypes IgG, IgA, et IgM réalisé préalablement par néphélémétrie, la concentration des immunoglobulines devant être ramenée à environ 1 g/L sur chaque piste.

    10 µL de sérum dilué sont disposés dans les puits 2 à 7 pour le premier patient et dans les puits 9 à 14 pour le second patient. Les puits n°1, 8, et 15 ne sont pas utilisés.
  - Les applicateurs gris sont ensuite déposés en chambre humide pour une durée de 5 minutes afin de permettre la diffusion des sérums.

- <u>Préparation des applicateurs verts</u> de l'Hydrashift contenant l'antisérum anti-Daratumumab :
  - 2 applicateurs verts sont préparés par pipetage manuel.

    10 µL d'antisérum anti-Daratumumab sont disposés dans les puits n°3, 6, 10, et 13 (correspondant aux pistes IgG et κ pour les 2 patients), à l'aide du guide de dépôt placé sur l'applicateur vert. Les puits n°2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, et 14 sont remplis quant à eux par 10 µL de diluant. Les puits n°1, 8, et 15 ne sont pas utilisés.
  - Les applicateurs verts sont ensuite déposés en chambre humide pour une durée de 5 minutes afin de permettre la diffusion du réactif.

❖ Électrophorèse :

- Sur l'automate HYDRASYS 2, le programme de migration « 2/4 IF MS/MD » est sélectionné.
- Les mèches tamponnées sont disposées sur le chariot porte-électrodes.
- Le gel du kit HYDRAGEL 4 IF® est déposé sur le plateau de migration au contact d'une goutte de 200 µL d'eau distillée, après élimination préalable de l'excès de tampon à sa surface avec un papier-filtre fin.
- Le chariot porte-électrodes ainsi que le chariot porte-applicateurs du kit « Accessoires Hydrashift 2/4 » sont abaissés jusqu'en butée. Sur ce dernier, on place et on aligne les applicateurs sortis de la chambre humide de la façon suivante : applicateurs gris (contenant les échantillons de sérums) sur les positions 3 et 9, et applicateurs verts (contenant l'antisérum anti-Daratumumab) sur les positions 2 et 8. Puis le programme de migration est démarré, pour une durée d'environ 9 minutes.

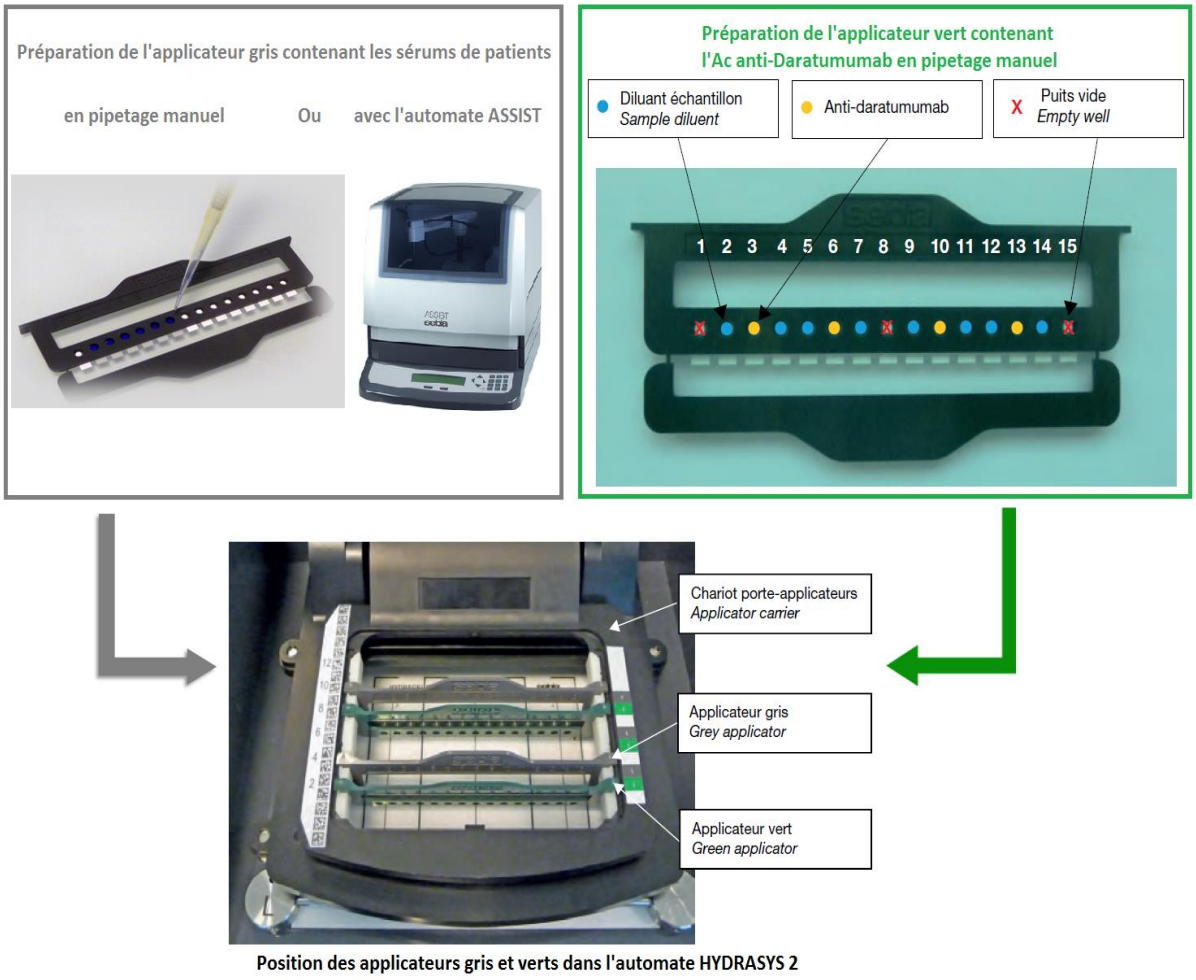


Figure 32 : Préparation des applicateurs gris et verts et disposition dans l'automate Hydrasys 2 (d'après Caillon *et al.*, 2016)

- Immunofixation : mêmes étapes que pour l'Hydragel IF classique
  - Les mèches tamponnées et les applicateurs sont jetés, et les chariots porte-électrodes et porte-applicateurs sont retirés.
  - Le masque de dépôt des antisérums est mis en place ; le kit Hydrashift peut être utilisé indifféremment avec le Masque standard ou le Masque dynamique de Sebia. Pour cette étude tous les tests ont été réalisés avec le Masque standard. On dépose pour chaque patient 40 µL de solution de fixation pour la première piste servant de référence, et 25 µL d'antisérums pour chacune des 5 autres pistes : antisérums anti-chaînes lourdes γ, α, et µ, et anti-chaînes légères κ et λ (libres et liées). Puis l'incubation est initiée pour une durée de 5 minutes, au cours de laquelle a lieu l'immunoprécipitation.
  - L'excédent d'antisérums est éliminé en utilisant 2 peignes de papier-filtre (maintenus pendant 15 secondes).
  - Le masque de dépôt des antisérums est retiré, puis le pompage du gel est réalisé en appliquant un papier-filtre épais (maintenu pendant 3 minutes).
  - Après retrait du papier-filtre, le gel subit un séchage pendant une durée de 6 minutes.
  - Le gel sec est enfin placé dans le porte-film et introduit dans le module de coloration. Pour l'Hydrashift la seule coloration utilisable est le Violet acide.
  - Une fois le gel coloré obtenu, il est ultérieurement numérisé dans le module de Scan de l'automate, pour permettre sa traçabilité dans le logiciel Phoresis® du fournisseur Sebia.

4) Performances analytiques

La technique d'Hydrashift a une **limite de sensibilité à 200 mg/L** (plus basse concentration de Daratumumab pour laquelle on détecte le complexe immun dans la fraction α1), soit le même seuil de détection que pour le DIRA historique. La spécificité du test est là aussi de 100 % (aucun effet de l'Ac anti-Daratumumab sur les Ig monoclonales endogènes). De plus, l'Hydrashift présente une concordance totale à 100 % avec le test DIRA expérimental[61].

B. Patients étudiés

❖ Cohorte de 70 patients traités par Daratumumab :

- Pour mener cette étude, nous avons sélectionné des patients atteints de myélome multiple, suivis dans le service d'Hématologie clinique du CHU de Bordeaux, et traités par Daratumumab (seul ou en association) sur la période allant de janvier 2017 à juin 2018. Cette cohorte a été constituée de manière **rétrospective**, à partir des archives du laboratoire d'Immunologie du CHU de Bordeaux. En effet, à l'occasion de la validation biologique du dosage des CLL sériques, les renseignements cliniques et thérapeutiques des patients concernés sont systématiquement relevés par les internes du laboratoire, incluant le détail du protocole thérapeutique. Ceci a ainsi permis d'identifier 70 patients traités par Daratumumab du 01/01/2017 au 30/06/2018.

- Puis dans un second temps, une fois la cohorte constituée, des renseignements cliniques et thérapeutiques plus détaillés ont été recueillis pour chaque patient, via la consultation du logiciel DxCare® de la société Medasys, Système d'Information Hospitalier (SIH) du CHU de Bordeaux. Ces renseignements incluaient la date du diagnostic de myélome, l'isotype de l'Ig monoclonale, la date d'initiation du traitement par Daratumumab, le protocole d'administration (en monothérapie ou en association, dans le cadre de l'AMM ou d'un essai clinique), l'historique des traitements antérieurs, et le niveau de réponse au traitement par Daratumumab. Ces données sont présentées ci-après dans le tableau en Annexe.

- Des renseignements biologiques complémentaires ont été recueillis sur le logiciel TD-Synergy® de la société Technidata, Système d'Information du Laboratoire (SIL) du CHU de Bordeaux. Il s'agissait pour chaque patient durant la période de traitement par Daratumumab d'observer l'évolution des profils de l'EPS et de l'IF sérique, et en particulier de relever toute **suspicion d'apparition du Daratumumab** sur ces examens. Sur l'EPS capillaire, elle se manifeste comme l'émergence d'une nouvelle anomalie monoclonale de concentration ≤ 2 g/L au milieu ou en fin des γ-globulines, et sur l'IF sérique comme une nouvelle IgG κ monoclonale à l'extrémité cathodique du gel.

❖ <u>20 patients de la cohorte testés avec l'Hydrashift</u> :

Un lot du kit Hydrashift 2/4 Daratumumab permettant d'effectuer 20 tests, 20 patients de la cohorte (pour qui il a été possible de collecter des sérums, cf. infra) ont été sélectionnés afin de tester la technique. Dans l'optique de réaliser 5 gels avec sur chacun 4 patients testés, nous avons sélectionné différents cas de figures :

- des patients traités par Daratumumab mais dont on pensait qu'il n'apparaissait pas au vu des résultats de l'EPS et de l'IF sérique: patients n°40, 55, 64
- des patients pour lesquels apparaissait le Daratumumab d'après l'EPS/IF sérique mais sans trace de l'Ig monoclonale du myélome (c'est-à-dire se trouvant en RC) : patients n°25, 32, 44, 46, 51, 60, 70
- des patients pour lesquels apparaissaient en même temps sur l'EPS/IF sérique le Daratumumab et l'Ig monoclonale pathologique résiduelle d'isotype IgG κ (non comigrante) : patients n°14, 36, 62
- des patients pour lesquels apparaissaient simultanément le Daratumumab et l'Ig monoclonale pathologique d'un isotype autre qu'IgG κ : patients n°27, 31, 37, 41, 42, 68
- ainsi qu'un témoin négatif (patient non traité par Daratumumab)

Par ailleurs, pour 2 des 20 patients (n°31 et 70) ont en plus été réalisés sur le même gel un Hydrashift juxtaposé à un Hydragel IF classique ; ceci permettant de confronter directement le profil avec l'interférence du Daratumumab à celui avec le Daratumumab déplacé, réalisés tous deux dans les mêmes conditions opératoires.

❖ <u>1 patient testé à plusieurs temps de la séquence thérapeutique</u> :

Pour **étudier la cinétique d'apparition et de disparition du Daratumumab sur l'IF et l'Hydrashift au cours de la séquence thérapeutique**, un patient a été sélectionné dans le but de répéter ces examens à des temps différents de la séquence. Il s'agit du patient n°43, qui a reçu pour un myélome à IgG λ du Daratumumab par voie sous-cutanée dans le cadre de l'essai clinique PLEIADES, selon le schéma posologique classique en association avec le Lénalidomide : administrations hebdomadaires pendant 8 semaines, puis bimensuelles pendant 16 semaines, puis mensuelles au-delà.

C. Échantillons biologiques

Les échantillons sur lesquels a porté cette étude sont des **sérums de patients de la cohorte** prélevés au cours de leur période de traitement par Daratumumab dans le cadre de leur prise en charge courante. Ils ont été collectés à partir de la sérothèque du laboratoire d'Immunologie du CHU de Bordeaux, dans laquelle les sérums sont conservés pour une durée maximale de 6 mois. Ceci implique que n'ont pu être recueillis que des sérums de patients qui étaient encore traités par Daratumumab dans les 6 derniers mois avant la collecte (ayant eu lieu en mai et juin 2018). Sur les patients de la cohorte, 32 sérums datant d'octobre 2017 à juin 2018 ont ainsi pu être récupérés.
Ces sérums étaient conservés en tubes à hémolyse congelés à -20°C en sérothèque. En vue de tester l'Hydrashift 2/4 Daratumumab, les 20 sérums d'intérêt ont été décongelés, puis centrifugés à 2300 g pendant 10 minutes à +4°C avant analyse.

Pour le patient sur lequel a été réalisée l'étude cinétique (cf. supra), 8 sérums prélevés pour suivi biologique à des temps différents de sa séquence thérapeutique de juillet 2018 à avril 2019 ont été utilisés en vue d'effectuer sur chacun un Hydrashift ainsi qu'un Hydragel IF classique. La chronologie de la séquence avec les dates de prélèvement des sérums testés est présentée dans la figure suivante :

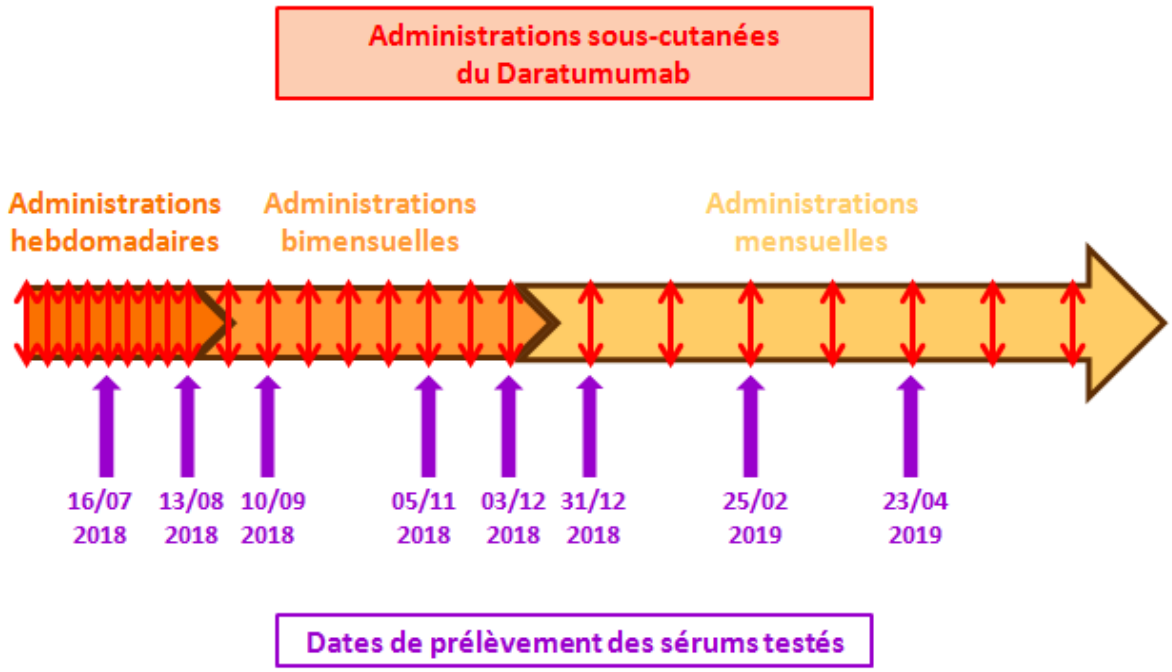
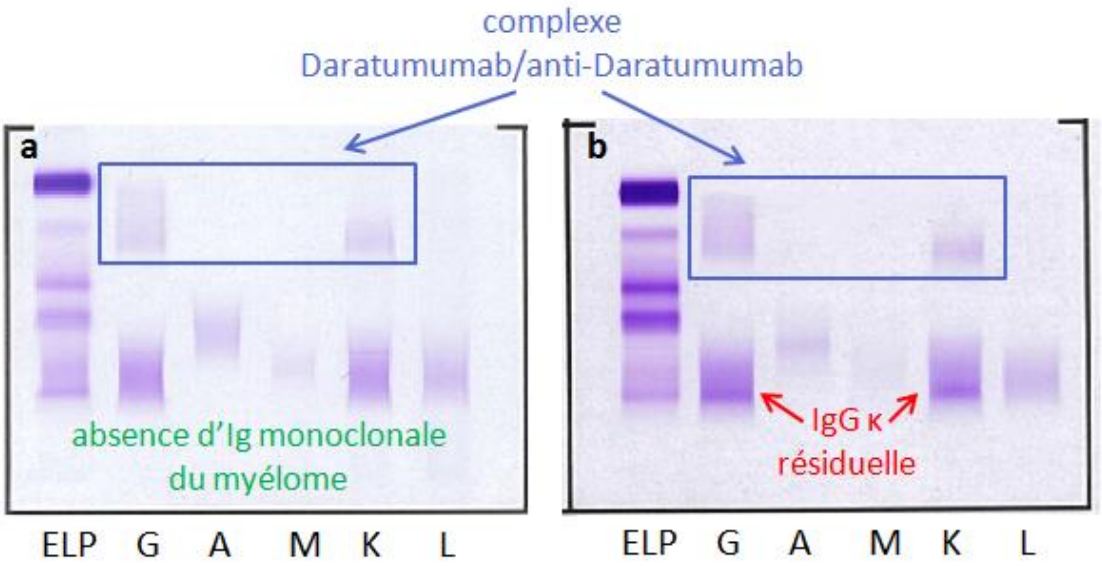


Figure 33 : Dates de prélèvement des sérums de l'étude cinétique en fonction de la séquence thérapeutique du patient

D. Interprétation des profils

Après réalisation de la technique d'Hydrashift, deux données sont relevées lors de la lecture des gels pour l'interprétation des profils des patients :

- **présence ou non du Daratumumab** déplacé : elle se traduit par la présence d'une bande large au niveau des α1-globulines sur les pistes IgG et κ correspondant au complexe Daratumumab/Ac anti-Daratumumab
- statut de l'Ig monoclonale du myélome :
  - ✓ <u>résultat d'Hydrashift négatif</u> : **absence de l'Ig monoclonale pathologique**. Ceci permet d'affirmer sa clairance et de considérer l'IF comme négative, ce qui remplit le critère de RC.
  - ✓ <u>résultat d'Hydrashift positif</u> : **persistance de l'Ig monoclonale pathologique**, patient au mieux en TBRP.



<u>Figure 34</u> : Exemples de profils après Hydrashift (d'après Sebia)

(a) résultat d'Hydrashift négatif, suggérant une RC ; (b) résultat d'Hydrashift positif, avec persistance d'une IgG κ monoclonale endogène

III. Résultats

❖ Test de l'Hydrashift sur 20 patients de la cohorte :

Les gels obtenus suite aux tests de l'Hydrashift 2/4 Daratumumab sur les sérums des 20 patients d'intérêt, numérisés et archivés dans le logiciel Phoresis de Sebia, sont présentés dans la figure ci-dessous :

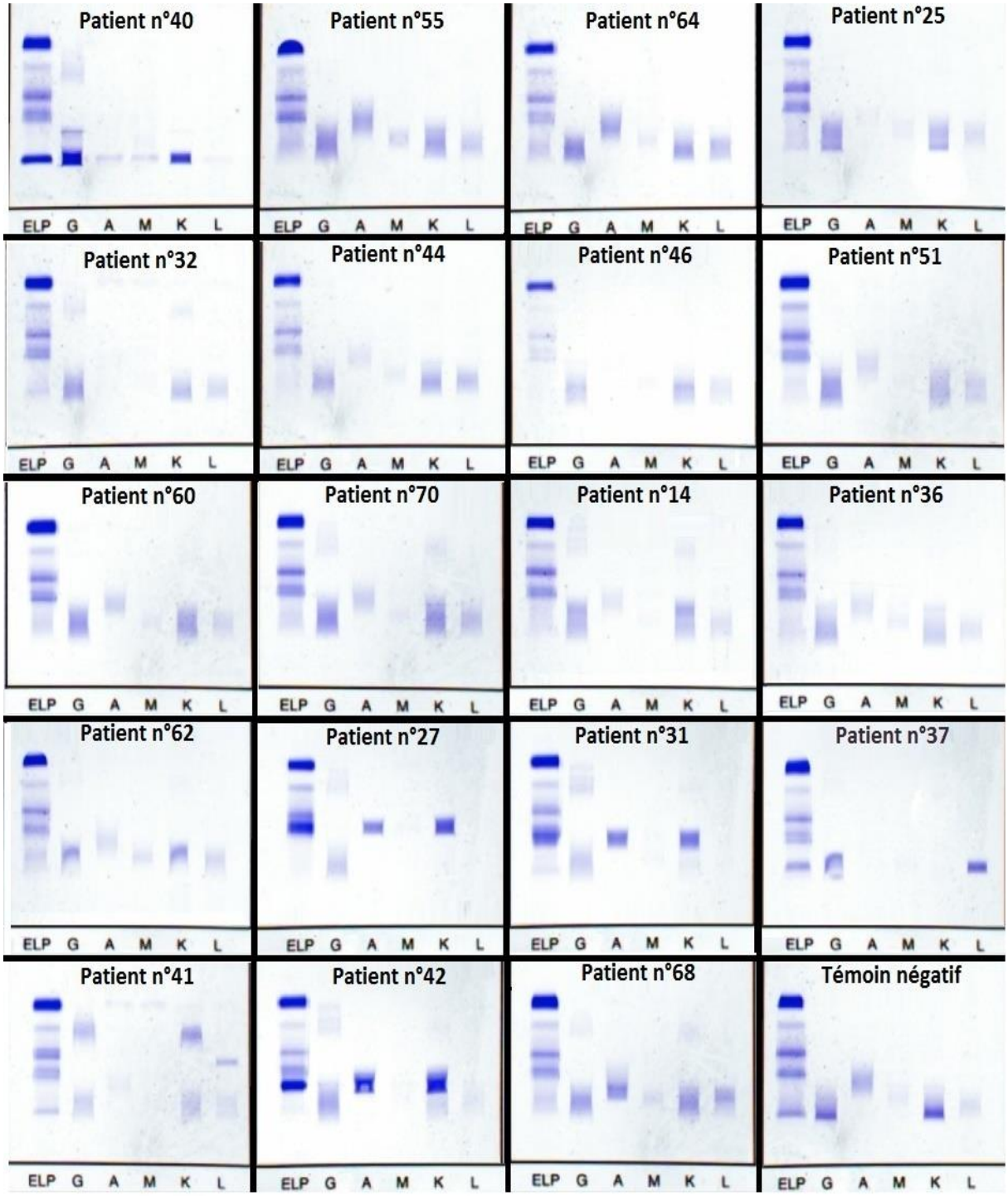
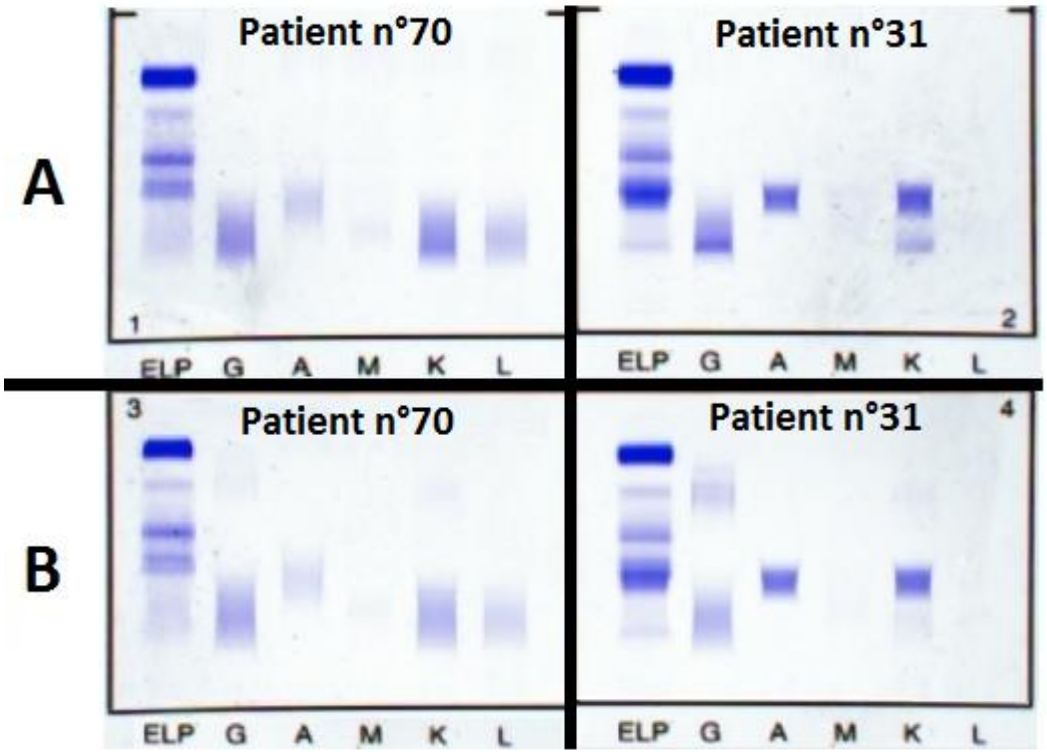


Figure 35 : Gels d'Hydrashift des 20 patients testés

À noter que les bandes correspondant au complexe Daratumumab/Ac anti-Daratumumab lorsqu'elles sont de faible intensité ne sont pas visibles, le niveau de résolution des gels scannés étant inférieur à leur équivalent physique.

Le gel sur lequel ont été juxtaposés pour 2 des patients l'Hydrashift avec l'Hydragel IF classique (illustration des profils « Avant »/ « Après » Hydrashift) est présenté dans la figure suivante :



<u>Figure 36</u> : Gel avec comparaison Hydragel IF/Hydrashift
(A) Hydragel IF : profil avec l'interférence du Daratumumab (IgG κ cathodique) ;
(B) Hydrashift : profil avec Daratumumab déplacé

Les résultats des tests d'Hydrashift sont par ailleurs rapportés dans le tableau ci-après. La présence de la bande correspondant au complexe Daratumumab/Ac anti-Daratumumab est notée en bleu, un résultat d'Hydrashift négatif (absence de l'Ig monoclonale pathologique) en vert, et un résultat d'Hydrashift positif (persistance de l'Ig monoclonale pathologique) en rouge. Pour chacun des patients ces résultats sont confrontés au temps dans la séquence thérapeutique où a été prélevé le sérum testé. Sont également rapportés pour chaque sérum les résultats de l'EPS et de l'IF sérique correspondantes.

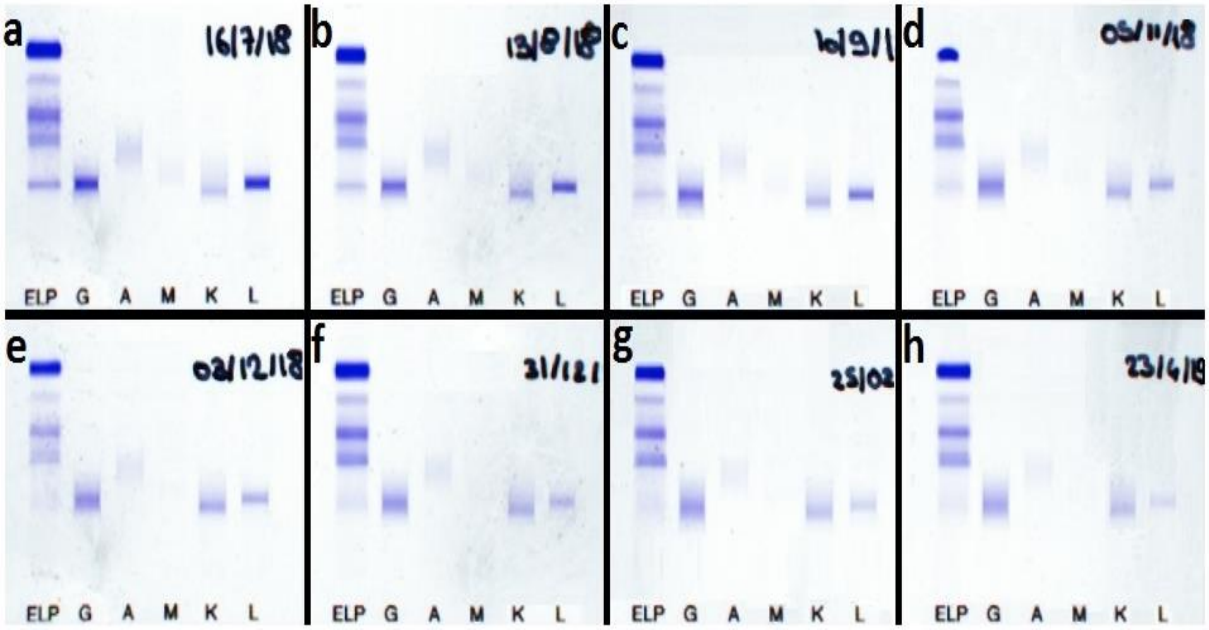
Tableau 4 : Résultats des tests d'Hydrashift sur 20 sérums de patients

IDENTIFICATION	ISOTYPE Ig MONOCLONALE	PROTOCOLE DARATUMUMAB	SÉQUENCE DU TRAITEMENT PAR DARATUMUMAB	RÉPONSE AU DARATUMUMAB	RÉSULTAT EPS	RÉSULTAT IF SÉRIQUE	RÉSULTAT HYDRASHIFT
Pas d'apparition du Daratumumab suspectée							
Patient n°40	IgG κ	COLUMBA (Daratumumab SC)	Après la 4ème administration hebdomadaire	RP puis maladie en progression	pic monoclonal connu quantifié à 16 g/L, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	Ig monoclonale de type IgG κ connue (de mobilité très cathodique)	bande correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgG κ connue
Patient n°55	CLL κ	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)	Phase d'entretien de l'essai, avec administrations tous les 2 mois	RCs MRD négative	hypogammaglobulinémie avec Restriction d'Hétérogénéité	IF normale	bande très discrète correspondant au Daratumumab, sans autre Ig monoclonale résiduelle
Patient n°64	IgA κ	MAIA (Daratumumab + Rd)	Administrations mensuelles	RC MRD positive	pas d'anomalie monoclonale détectable	Restriction d'Hétérogénéité de type IgG κ connue	absence de Daratumumab + présence de la Restriction d'Hétérogénéité de type IgG κ connue
Suspicion d'apparition du Daratumumab + absence de l'Ig monoclonale pathologique							
Patient n°25	IgG κ	Daratumumab + Dexaméthasone	Administrations mensuelles	RC	discrète anomalie monoclonale connue quantifiée à 1,7 g/L pouvant correspondre au traitement par Daratumumab, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	Ig monoclonale de type IgG κ connue, compatible avec le traitement par Daratumumab	bande correspondant au Daratumumab à l'état de traces + présence de l'Ig monoclonale de type IgG κ connue
Patient n°32	IgA κ et CLL κ	Daratumumab + Dexaméthasone	Après la 4ème administration hebdomadaire	RC puis rechute	hypogammaglobulinémie avec anomalie monoclonale d'environ 1 g/L pouvant correspondre au traitement par Daratumumab	Ig monoclonale de type IgG κ connue, compatible avec le traitement par Daratumumab	bande correspondant au Daratumumab, sans autre Ig monoclonale résiduelle
Patient n°44	IgG λ et CLL λ	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)	À l'isue de la phase de consolidation, 3 mois après la dernière administration	RCs MRD négative	hypogammaglobulinémie	très discrète Ig monoclonale de type IgG κ connue	bande correspondant au Daratumumab à l'état de traces à la limite du seuil de détection, sans autre Ig monoclonale résiduelle
Patient n°46	IgG κ et CLL κ	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)	À l'isue de la phase de consolidation, 2 mois et demi après la dernière administration	RCs MRD négative	hypogammaglobulinémie avec Restriction d'Hétérogénéité	profil biclonal de type IgG κ connu	absence de Daratumumab + présence du profil biclonal de type IgG κ connu
Patient n°51	CLL κ	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)	Entre les phases d'induction et de consolidation de l'essai, presque 3 mois après la dernière administration	RC MRD positive	hypogammaglobulinémie avec très léger profil oligoclonal	très discret profil oligoclonal de type IgG (κ + λ)	bande correspondant au Daratumumab à l'état de traces + présence d'un profil oligoclonal de type IgG (κ + λ)
Patient n°60	CLL λ	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)	Administrations tous les 2 mois	RCs	hypogammaglobulinémie sans anomalie monoclonale détectable	discrète Ig monoclonale de type IgG κ	bande très discrète correspondant au Daratumumab, sans autre Ig monoclonale résiduelle
Patient n°70	IgG κ et CLL κ	MAIA (Daratumumab + Rd)	Administrations mensuelles	RCs	anomalie monoclonale connue non quantifiable (< 1 g/L), et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	discrète Ig monoclonale de type IgG κ, compatible avec le traitement par Daratumumab	bande correspondant au Daratumumab, sans autre Ig monoclonale résiduelle

IDENTIFICATION	ISOTYPE Ig MONOCLONALE	PROTOCOLE DARATUMUMAB	SÉQUENCE DU TRAITEMENT PAR DARATUMUMAB	RÉPONSE AU DARATUMUMAB	RÉSULTAT EPS	RÉSULTAT IF SÉRIQUE	RÉSULTAT HYDRASHIFT
Suspicion d'apparition du Daratumumab + persistance de l'Ig monoclonale pathologique d'isotype IgG κ							
Patient n°14	IgG κ	Daratumumab + Dexaméthasone	Administrations mensuelles	TBRP puis maladie en progression	hypogammaglobulinémie avec 2 anomalies monoclonales connues non quantifiables	profil biclonal de type IgG κ connu	bande correspondant au Daratumumab + présence d'une Ig monoclonale de type IgG κ connue
Patient n°36	IgG κ	POLLUX (Daratumumab + Rd)	Administrations mensuelles	TBRP	hypogammaglobulinémie avec anomalie monoclonale connue non intégrable (< 1g/L)	profil biclonal de type IgG κ connu	bande discrète correspondant au Daratumumab + présence d'une Ig monoclonale de type IgG κ connue (migrant au point de dépôt)
Patient n°62	IgG κ	MAIA (Daratumumab + Rd)	Administrations mensuelles	TBRP	persistance de 2 pics monoclonaux connus sous forme de Restrictions d'Hétérogénéité, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	profil biclonal de type IgG κ, dont une connue et l'autre compatible avec le traitement par Daratumumab	bande très discrète correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgG κ connue
Suspicion d'apparition du Daratumumab + persistance de l'Ig monoclonale pathologique d'isotype autre qu'IgG κ							
Patient n°27	IgA κ	Daratumumab + Dexaméthasone	1 mois après la dernière administration mensuelle	TBRP puis maladie en progression	pic monoclonal connu en β1-globulines quantifié à 27,7 g/L + Restriction d'Hétérogénéité en γ-globulines, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	pas d'IF sur ce sérum ; sur sérums antérieurs : 2 Ig monoclonales de type IgG κ et IgA κ connues	bande correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgA κ connue
Patient n°31	IgA κ	Daratumumab + Dexaméthasone	Après la 8ème administration hebdomadaire	rechute	hypogammaglobulinémie avec pic monoclonal connu en β2-globulines quantifié à 17,2 g/L et un autre pic non intégrable en γ-globulines (Daratumumab ?)	2 Ig monoclonales de type IgA κ connue et IgG κ compatible avec le traitement par Daratumumab	bande correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgA κ connue
Patient n°37	IgG λ	CANDOR (Daratumumab + Kd)	Après la 8ème administration hebdomadaire (7ème administration sautée en raison d'une thrombopénie)	TBRP puis maladie en progression	anomalie monoclonale connue + apparition d'une 2ème anomalie d'allure monoclonale < 1g/L, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	Ig monoclonale de type IgG λ connue, et discrète Ig monoclonale de type IgG κ compatible avec le traitement par Daratumumab	bande très discrète correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgG λ connue
Patient n°41	IgG λ et CLL λ	COLUMBA (Daratumumab SC)	Après la 8ème administration hebdomadaire	maladie stable	hypogammaglobulinémie avec anomalie monoclonale connue quantifiée à 2,4 g/L pouvant correspondre au traitement par Daratumumab	Ig monoclonale de type IgG κ connue compatible avec le traitement par Daratumumab, et CLL monoclonale de type λ connue	bande correspondant au Daratumumab (de forte intensité) + présence de la CLL monoclonale de type λ connue
Patient n°42	IgA κ	COLUMBA (bras Daratumumab IV)	Après la 3ème administration hebdomadaire	RP puis maladie en progression	pic monoclonal connu à cheval entre les fractions β2 et γ quantifié à 39,5 g/L, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	2 Ig monoclonales de type IgA κ connue et IgG κ compatible avec le traitement par Daratumumab	bande correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgA κ connue
Patient n°68	IgA λ	MAIA (Daratumumab + Rd)	Administrations mensuelles	RCs MRD positive puis rechute	anomalie monoclonale connue non quantifiable, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	Ig monoclonale de type IgA λ connue	bande discrète correspondant au Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgA λ connue
Témoin négatif (patient non traité par Daratumumab)							
Témoin négatif	IgG κ et CLL κ			avant initiation du traitement	anomalie d'allure monoclonale, et baisse des γ-globulines polyclonales résiduelles	Ig monoclonale de type IgG κ (de mobilité très cathodique)	absence de Daratumumab + présence de l'Ig monoclonale de type IgG κ

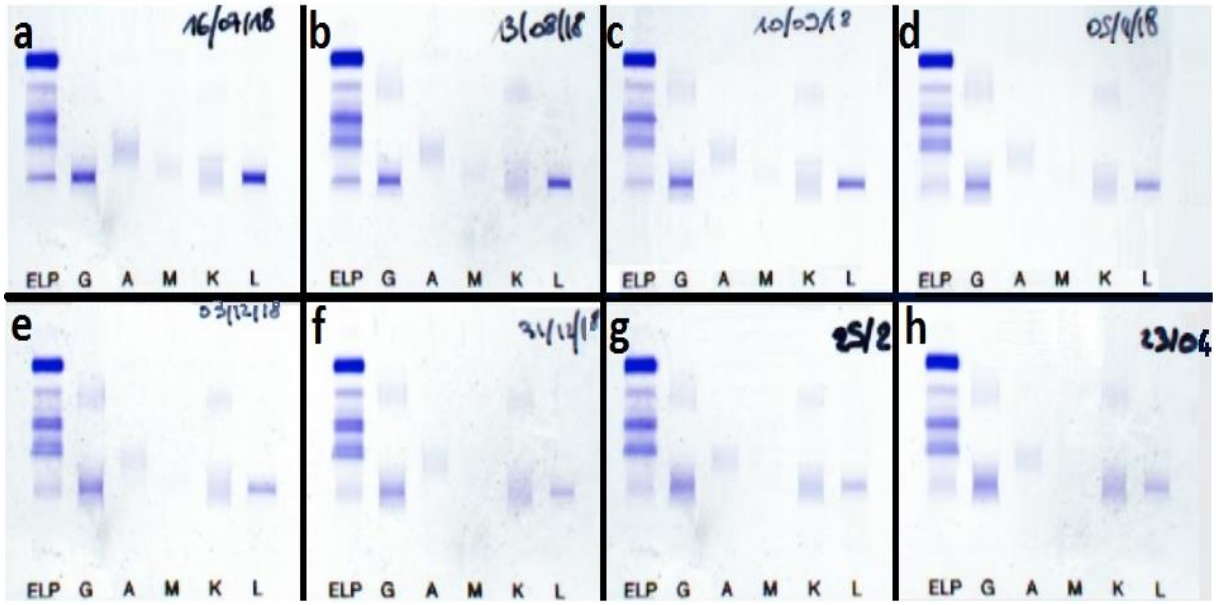
❖ <u>Étude de la cinétique d'apparition du Daratumumab</u> :

Les gels d'Hydragel IF et d'Hydrashift de l'étude cinétique effectuée sur plusieurs sérums du même patient à des temps différents de sa séquence thérapeutique sont présentés dans les figures suivantes :



<u>Figure 37</u> : Gels d'Hydragel IF de l'étude cinétique

(a) 16/07/2018 ; (b) 13/08/2018 ; (c) 10/09/2018 ; (d) 05/11/2018 ; (e) 03/12/2018 ; (f) 31/12/2018 ; (g) 25/02/2019 ; (h) 23/04/2019



<u>Figure 38</u> : Gels d'Hydrashift de l'étude cinétique

(a) 16/07/2018 ; (b) 13/08/2018 ; (c) 10/09/2018 ; (d) 05/11/2018 ; (e) 03/12/2018 ; (f) 31/12/2018 ; (g) 25/02/2019 ; (h) 23/04/2019

IV. Discussion

Le Daratumumab, immunothérapie ayant montré une efficacité inédite dans le traitement du myélome multiple, va devenir un standard dans la prise en charge de cette hémopathie ainsi que d'autres dyscrasies plasmocytaires. Néanmoins son utilisation engendre aussi des difficultés pour le suivi de la maladie, étant notamment à l'origine d'une interférence à type de fausse positivité sur les examens biologiques d'EPS et d'IF sérique. Pour une évaluation fiable de la réponse biologique au traitement, des techniques de déplacement sur les gels d'IF sérique ont été développées, dont l'Hydrashift 2/4 Daratumumab® est l'aboutissement semi-automatisé commercialisé depuis 2016. En vue d'une utilisation au CHU de Bordeaux, nous avons réalisé une évaluation de cette technique sur des patients de notre centre, afin de pouvoir cerner l'apport de ce kit en pratique courante pour l'interprétation de l'IF et de statuer sur les cas de figure où son utilisation serait justifiée.

En l'occurrence notre étude vient confirmer l'utilité et l'efficacité de la technique d'Hydrashift dans le suivi des patients recevant du Daratumumab. Nos tests effectués sur une cohorte de patients d'hématologie du CHU de Bordeaux illustrent que **l'Hydrashift lève efficacement l'interférence du Daratumumab sur l'IF sérique**. Le kit aide à clarifier l'origine d'une bande IgG κ de mobilité cathodique de concentration < 2 g/L, et permet au biologiste de visualiser dans la fraction γ uniquement les Ig monoclonales endogènes du patient tandis que l'Ac monoclonal thérapeutique est déplacé vers l'anode pour ne plus gêner la lecture.

L'Hydrashift est de plus un test standardisé, qui s'est révélé dans notre étude facile à mettre en œuvre au laboratoire. Son utilisation va concerner prochainement un nombre croissant de patients : en effet, au vu des résultats des nombreux essais cliniques il apparaît que de plus en plus de malades atteints de myélome vont recevoir du Daratumumab dans leurs protocoles de chimiothérapie, y compris en 1ère ligne. Or compte-tenu de son efficacité clinique, une part significative de ces patients va pouvoir atteindre une RC, situation dans laquelle se pose justement le problème de l'interférence, justifiant le recours à l'Hydrashift[62].

Auparavant, d'autres équipes ont publié leurs travaux sur la technique d'Hydrashift. Ainsi, Caillon *et al.* en 2016 ont évalué les performances analytiques du test, en comparaison avec le DIRA historique. Il ressort de leurs essais qu'après Hydrashift la bande due au Daratumumab est systématiquement retirée de la fraction γ, et ce quelle qu'ait été sa concentration sérique. Par contre la détection du complexe Daratumumab/Ac anti-Daratumumab dans la fraction α1 a une limite de sensibilité à 200 mg/L, concentration en-dessous de laquelle il devient difficile à visualiser[61]. Ceci se retrouve dans notre étude, où la bande correspondant au complexe pour certains des patients testés n'est présente qu'à l'état de traces à peine discernables dans la zone des α1-globulines. Par ailleurs Caillon *et al.* concluent que l'Hydrashift n'est **requis que pour les myélomes dont la protéine monoclonale est une IgG κ ou une CLL κ comigrant avec le Daratumumab**, situation dans laquelle existe une ambigüité entre la RC et la TBRP.

Thoren *et al.* en 2018 ont testé l'Hydrashift sur 40 sérums de patients atteints de myélome et traités par Daratumumab[62], à l'image de ce que nous avons fait. Dans leur étude le complexe Daratumumab/Ac anti-Daratumumab apparaissait systématiquement dans la fraction α1 pour tous les patients testés (contrairement à nos résultats, où pour certains patients il n'y a pas eu de mise en évidence du complexe et de modification du profil après Hydrashift). Pour 27 de leurs patients, l'Ig monoclonale pathologique était facilement différenciable du Daratumumab car d'un autre isotype qu'IgG κ, ou d'isotype IgG κ mais non comigrante. Dans ce cas de figure Thoren *et al.* soulignent l'intérêt de l'Hydrashift **pour distinguer le Daratumumab de bandes oligoclonales** bénignes, apparaissant fréquemment au décours du traitement. Pour 11 de leurs patients au contraire, l'Ig monoclonale pathologique ne pouvait être différenciée du Daratumumab sur l'IF car d'isotype IgG κ et de même mobilité électrophorétique. Auquel cas, l'Hydrashift se révèle **indispensable pour savoir s'il y a persistance ou disparition de l'Ig pathologique** et pour statuer sur le niveau de réponse au traitement.

L'interprétation des profils obtenus par nos tests de l'Hydrashift sur 20 patients de la cohorte est présentée ci-après, en comparaison avec les résultats attendus d'après l'EPS et l'IF sérique seules. Pour 16 patients le résultat de l'Hydrashift est conforme à nos prévisions. En revanche pour 4 patients (n° 25, 40, 46, et 55) nous avons obtenu des **résultats divergents par rapport à ce que l'IF seule laissait supposer**, ceci illustrant donc l'intérêt de l'Hydrashift pour rectifier l'interprétation chez les patients recevant du Daratumumab.

- Pas d'apparition du Daratumumab suspectée :

  Pour le patient n°64 la bande relative au Daratumumab n'apparaît pas conformément à ce que nous attendions d'après l'IF.

  En revanche pour le patient n°55, une bande correspondant au Daratumumab est visualisée alors que l'IF apparaissait normale. Ceci s'explique par la très faible intensité de cette bande qui était passée inaperçue sur l'IF, due aux administrations très espacées de Daratumumab tous les 2 mois lors de la phase d'entretien de l'essai CASSIOPEIA.

  De même pour le patient n°40, une bande relative au Daratumumab est visualisée alors que l'IF ne montrait que la présence de l'Ig monoclonale pathologique. Cette dernière étant une IgG κ comigrante et de forte concentration (16 g/L) masquait en fait la présence du Daratumumab sur l'IF.

- Suspicion d'apparition du Daratumumab et absence de l'Ig monoclonale pathologique (patients en RC) :

  Pour les patients n°32, 51, 60, 44, et 70, le résultat est conforme aux résultats attendus.

  Pour le patient n°46 cependant, la bande relative au Daratumumab n'apparaît pas alors que l'IF laissait supposer sa présence au sein d'un profil biclonal IgG κ. Les 2 bandes de ce profil correspondaient en fait à des Ig monoclonales endogènes bénignes de reconstitution immunitaire après autogreffe dans l'essai CASSIOPEIA. Dans ce cas de figure l'Hydrashift aide donc à **distinguer Daratumumab et bandes oligoclonales**.

  Le patient n°25 quant à lui correspond à une parfaite illustration de l'interférence : RC suspectée avec présence du Daratumumab seul, dans le contexte d'un myélome à IgG κ comigrante. Or l'Hydrashift vient révéler, en plus de la bande correspondant au Daratumumab, la persistance de l'Ig monoclonale pathologique sous-jacente. En l'occurrence le patient avait donc été classé à tort en RC, et l'Hydrashift trouve toute son utilité en **permettant de reclasser la réponse** en TBRP.

- Suspicion d'apparition du Daratumumab et persistance de l'Ig monoclonale pathologique d'isotype IgG κ (non comigrante) :

  Le résultat de l'Hydrashift est concordant avec l'IF pour les patients n°14, 36, et 62.

- Suspicion d'apparition du Daratumumab et persistance de l'Ig monoclonale pathologique d'isotype autre qu'IgG κ :

  L'Hydrashift confirme le résultat attendu pour les patients n°27, 31, 37, 41, 42, et 68.

Les résultats obtenus pour les patients testés en Hydrashift soulèvent également certaines **questions quant à la visualisation de la bande relative au Daratumumab** dans la fraction α1 :

- Pour 2 des 19 patients traités par du Daratumumab, ce dernier n'apparaît pas sur le profil après Hydrashift, alors que pour d'autres patients au même stade de la séquence thérapeutique (et ayant donc théoriquement les mêmes concentrations sériques) le Daratumumab est pourtant visible.

  Ainsi pour le patient n°46 le Daratumumab n'apparaît pas sur le profil, alors que c'est bien le cas pour le patient n°44 et que leurs sérums ont été prélevés près de 3 mois après la dernière administration de la phase de consolidation de l'essai CASSIOPEIA.

  De même le Daratumumab n'apparaît pas chez le patient n°64 alors qu'il est visualisé chez le patient n°70, et que tous deux reçoivent des administrations mensuelles depuis plusieurs années au sein de l'essai MAIA.

  Ceci pourrait être expliqué par des variations pharmacocinétiques interindividuelles, aboutissant à des concentrations sériques inférieures au seuil de détection pour certains des patients.
- Chez le patient n°41 dont le sérum a été prélevé après la 8ème administration hebdomadaire d'un schéma en monothérapie (fin de la phase d'accumulation), la bande correspondant au Daratumumab présente une intensité inhabituellement élevée (quantification à 2,4 g/L sur l'EPS), comparativement au patient n°31 au même temps de la séquence thérapeutique. Une hypothèse pour expliquer cette différence de concentrations du Daratumumab pourrait être la différence de voies d'administration : en effet le Daratumumab est administré chez le patient n°41 par voie sous-cutanée alors qu'il est administré classiquement par voie intraveineuse chez le patient n°31. La voie SC a démontré au cours des études sa non-infériorité par rapport à la voie de référence IV, mais pourrait donner lieu à des concentrations sanguines plus élevées[47].

L'originalité de notre étude réside dans l'**analyse de la cinétique d'apparition du Daratumumab en fonction de la séquence thérapeutique**, et des liens entre la pharmacocinétique du médicament et sa détection avec l'électrophorèse des protéines et l'immunofixation. Les résultats des tests que nous avons effectués sur plusieurs sérums du patient n°43 illustrent en effet concrètement l'évolution de l'interférence du Daratumumab au

cours de la période de traitement. Ainsi, la présence d'une bande encore très discrète sur le premier sérum en date du 16/07/2018 témoigne d'un **effet cumulatif**, avec une croissance progressive des concentrations sériques de Daratumumab au cours des administrations hebdomadaires. La bande correspondant au Daratumumab est ensuite aisément **détectable à la fin des administrations hebdomadaires et au cours des administrations bimensuelles** ; par la suite elle **s'estompe au moment des administrations mensuelles**. Ces observations sont concordantes avec les données de la littérature faisant état de concentrations résiduelles de Daratumumab au-dessus du seuil de détection pendant les phases d'administrations hebdomadaires et bimensuelles, puis avoisinant la limite de sensibilité de la technique lors des administrations mensuelles, le Daratumumab pouvant alors ne plus être détecté sur les gels[55,60].

Malgré ses intérêts que nous avons illustrés, le test Hydrashift présente néanmoins certaines limites. La principale est liée à sa spécificité restreinte au Daratumumab. Or de nombreux **autres Ac monoclonaux thérapeutiques** sont disponibles sur le marché, utilisés communément dans le traitement de pathologies néoplasiques ou inflammatoires, et sont donc susceptibles eux aussi d'occasionner de la même manière des interférences sur l'EPS et l'IF sérique. À noter cependant que tous les Ac monoclonaux thérapeutiques ne présentent pas le même risque de générer des interférences en pratique clinique. Ainsi leur détection sur l'EPS et l'IF sérique est beaucoup plus probable pour les Ac monoclonaux utilisés en onco-hématologie que pour ceux utilisés dans les maladies inflammatoires chroniques de mécanisme auto-immun[63]. Les raisons l'expliquant sont résumées dans le tableau ci-dessous :

<u>Tableau 6</u> : Ac monoclonaux thérapeutiques et risque d'interférence sur l'EPS et l'IF sérique (d'après Mills et Murray, 2017)

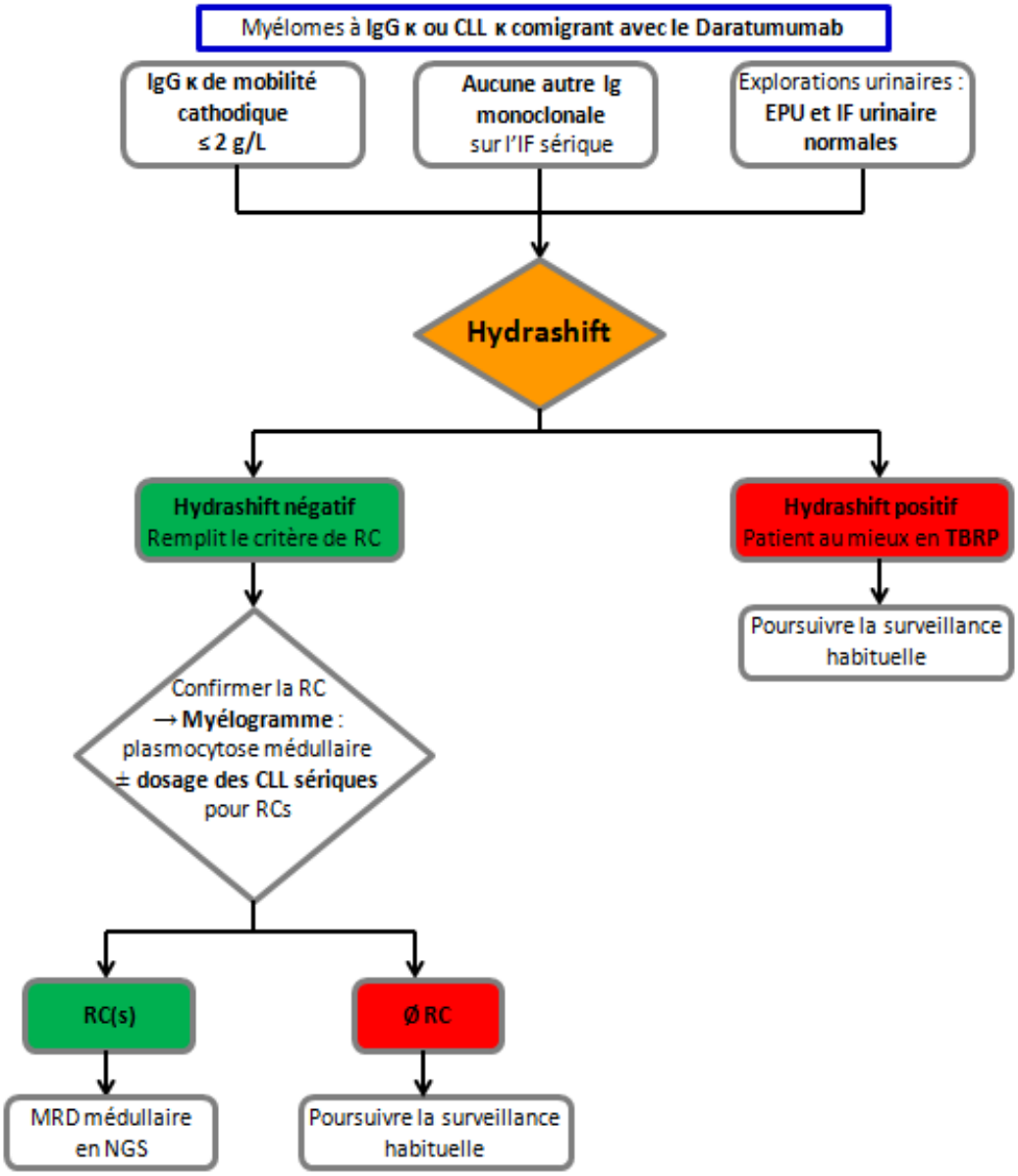
Ac monoclonaux thérapeutiques d'onco-hématologie (syndromes lymphoprolifératifs) (Rituximab, Élotuzumab, Daratumumab, Isatuximab…)	**Ac monoclonaux thérapeutiques dans les maladies auto-immunes** (Infliximab, Adalimumab…)
• **Concentrations plasmatiques élevées** (> 100 mg/L) au schéma posologique recommandé	• **Concentrations plasmatiques faibles** (< 100 mg/L) au schéma posologique recommandé : inférieures au seuil de détection de l'IF
• Fréquente **hypogammaglobulinémie** associée (abaisse le seuil de détection des Ig monoclonales)	• Fréquente **hypergammaglobulinémie polyclonale** associée (masque la détection des Ig monoclonales de faible concentration)
• **Indication à un suivi régulier** par électrophorèse des protéines ± IF	• **Pas d'indication** à la réalisation d'une électrophorèse des protéines
Forte probabilité de détection en routine sur EPS et IF sérique	**Faible probabilité de détection** en routine sur EPS et IF sérique

Pour ce qui est du traitement du myélome multiple, l'Élotuzumab qui est dirigé contre la protéine SLAMF7 est disponible sur le marché depuis 2015 aux États-Unis et 2016 en Europe, tandis que d'autres Ac anti-CD38 tels que l'Isatuximab sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques. Élotuzumab et Isatuximab sont tous deux d'isotype IgG1 κ, et ont une mobilité électrophorétique sur gel au milieu des γ-globulines. Or l'Hydrashift ne fonctionne que pour le Daratumumab et ne permet pas de lever l'interférence sur l'IF causée par ces autres Ac. La transposition de la même stratégie nécessiterait le **développement d'autres antisérums spécifiques de chacun des médicaments**.

Une approche alternative et « universelle » permettant d'identifier n'importe quel Ac monoclonal thérapeutique a été plus récemment développée, et se base sur la **spectrométrie de masse**. Elle s'appuie sur le principe selon lequel toutes les immunoglobulines, de par leur séquence unique en acides aminés, ont une masse moléculaire distincte. L'analyse de la masse moléculaire des Ig du sérum permet donc d'identifier et discriminer aisément les Ac monoclonaux thérapeutiques des Ig monoclonales endogènes du myélome. Les technologies de spectrométrie de masse par ESI-TOF (*ElectroSpray Ionization-Time Of Flight*) et MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) couplées à une séparation par chromatographie liquide sont utilisables dans cette indication, et permettent une analyse à haute résolution (mesures précises à 1 Da près) avec des seuils de détection très inférieurs à ceux des techniques électrophorétiques. Cependant à l'heure actuelle ces technologies ne sont pas encore disponibles en pratique clinique pour la prise en charge en routine des interférences des Ac thérapeutiques[63].

Une autre limite de la stratégie basée sur l'Hydrashift est qu'il ne lève l'interférence du Daratumumab que sur l'IF sérique mais pas sur l'EPS, ce qui en cas de comigration ne permet pas une quantification exacte de la protéine monoclonale du myélome, systématiquement surestimée[62]. Une solution pour pallier cet inconvénient pourrait être le développement d'une stratégie d'immunosoustraction, de même principe que celle utilisée pour le typage d'une Ig monoclonale, mais avec un antisérum anti-Daratumumab qui permettrait de retrancher pour l'intégration du pic monoclonal la part imputable au Daratumumab.

À l'issue de notre étude, nous avons défini des conditions de mise en œuvre de l'Hydrashift pour la prise en charge en routine des patients traités par Daratumumab, basées sur les recommandations de la littérature[55,60,61]. Ces conditions d'utilisation prennent la forme d'un **algorithme décisionnel**, présenté dans le logigramme suivant :



<u>Figure 39</u> : Algorithme d'utilisation de l'Hydrashift en routine

Après cette étude permettant l'évaluation du test, l'Hydrashift 2/4 Daratumumab sera disponible prochainement au laboratoire d'Immunologie du CHU de Bordeaux. Il pourra être effectué à l'initiative du biologiste lors de la validation des immunofixations, pour tout patient ayant un myélome à IgG κ ou CLL κ comigrant avec le Daratumumab et se trouvant dans une situation d'ambiguïté par rapport à la RC, tel que présenté dans le logigramme ci-dessus. Si l'Hydrashift atteste de la RC sur la protéine monoclonale, il conviendra alors de la confirmer dans la moelle en réalisant un myélogramme pour évaluation de la plasmocytose, et le cas échéant de procéder à une analyse de la MRD, préférentiellement par technique de NGS plutôt qu'en CMF puisque non impactée par l'interférence du Daratumumab. Au contraire si à

la suite de l'Hydrashift le patient apparaît seulement en TBRP, aucune exploration complémentaire n'est requise et la surveillance habituelle de la protéine monoclonale devra être poursuivie.

Le déploiement de l'Hydrashift en complément de l'IF sérique pour les patients recevant du Daratumumab permettra une juste interprétation de la réponse au traitement affranchie de l'interférence. Cette technique contribuera ainsi à un suivi amélioré des myélomes, en assurant au clinicien de pouvoir évaluer avec précision et en toute circonstance le stade de la pathologie de ses patients.

Références bibliographiques

1. Bidri, M. & Arock, M. Différenciation des cellules hématopoïétiques : intervention des cytokines et expression des marqueurs membranaires. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **36**, 859–878 (1996).

2. Blom, B. & Spits, H. DEVELOPMENT OF HUMAN LYMPHOID CELLS. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 287–320 (2006).

3. Good-Jacobson, K. L., O'Donnell, K., Belz, G. T., Nutt, S. L. & Tarlinton, D. M. c-Myb is required for plasma cell migration to bone marrow after immunization or infection. *J. Exp. Med.* **212**, 1001–1009 (2015).

4. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–S52 (2010).

5. Rajkumar, S. V. *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **15**, e538–e548 (2014).

6. Kyle, R. A. *et al.* Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1362–1369 (2006).

7. Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol.* **134**, 573–589 (2006).

8. Kyle, R. A. *et al.* Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2582–2590 (2007).

9. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34 (2019).

10. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*. (Institut de veille sanitaire, 2013).

11. Kyle, R. A. *et al.* Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* **78**, 21–33 (2003).

12. Alexander, D. D. *et al.* Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer* **120**, 40–61 (2007).

13. Avet-Loiseau, H. & Corre, J. Cytogénétique et génétique moléculaire du myélome multiple. *Rev. Francoph. Lab.* **2019**, 50–57 (2019).

14. Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **93**, 1091–1110 (2018).

15. Bianchi, G. & Munshi, N. C. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* **125**, 3049–3058 (2015).

16. Bouvard, B. *et al.* Gammapathie monoclonale de signification indéterminée, myélome multiple et ostéoporose. *Rev. Rhum.* **77**, 144–148 (2010).

17. Roux, S. L'os du myélome multiple : physiopathologie. *Rev. Rhum. Monogr.* **84**, 181–186 (2017).

18. The 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.* **121**, 749–757 (2003).

19. Dispenzieri, A. & Kyle, R. A. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **18**, 553–568 (2005).

20. Oyajobi, B. O. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res. Ther.* **9 Suppl 1**, S4 (2007).

21. Hyperviscosity Syndrome in Plasma Cell Dyscrasias. *Semin. Thromb. Hemost.* **29**, 467–472 (2003).

22. Dispenzieri, A. & Kyle, R. A. Neurological aspects of multiple myeloma and related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **18**, 673–688 (2005).

23. Chawla, S. S. *et al.* Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* **95**, 57–64 (2015).

24. Daudignon, A. *et al.* Cytogenetics in the management of multiple myeloma: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 588–595 (20169-10). doi:10.1684/abc.2016.1178

25. Chesi, M. & Bergsagel, P. L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int. J. Hematol.* **97**, 313–323 (2013).

26. Palumbo, A. *et al.* Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2863–2869 (2015).

27. Caers, J. *et al.* Diagnosis, treatment, and response assessment in solitary plasmacytoma: updated recommendations from a European Expert Panel. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **11**, (2018).

28. Jaccard, A., Desport, E., Mohty, D. & Bridoux, F. Amylose AL. *Rev. Médecine Interne* **36**, 89–97 (2015).

29. Gavriatopoulou, M. *et al.* European myeloma network recommendations on diagnosis and management of patients with rare plasma cell dyscrasias. *Leukemia* (2018). doi:10.1038/s41375-018-0209-7

30. Li, J. & Zhou, D. New advances in the diagnosis and treatment of POEMS syndrome. *Br. J. Haematol.* **161**, 303–315 (2013).

31. on behalf of the International Myeloma Working Group *et al.* Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* **27**, 780–791 (2013).

32. Ribourtout, B. & Zandecki, M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphologie* **99**, 38–62 (2015).

33. Nadav, L. *et al.* Diverse niches within multiple myeloma bone marrow aspirates affect plasma cell enumeration. *Br. J. Haematol.* **133**, 530–532 (2006).

34. Oyaert, M., Delforge, M. & Boeckx, N. Use of multiparameter flow cytometry in multiple myeloma and other plasma cell neoplasms. *Belg. J. Hematol.* **6**, 46–53 (20150501).

35. Dejoie, T., Lakomy, D., Caillon, H., Pegourié, B. & Decaux, O. IFM (Intergroupe francophone du myélome) recommendations for uniform interpretation of serum and urine protein electrophoresis in multiple myeloma diagnosis and follow-up. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 429–441 (20167-8). doi:10.1684/abc.2016.1166

36. Ludwig, H. *et al.* International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia* **28**, 981–992 (2014).

37. Oudart, J. B. *et al.* Urinary investigations in the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies in daily practice. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 147–152 (20143-4). doi:10.1684/abc.2014.0937

38. Camaré, C. & Caussé, E. Urinary protein electrophoresis, which analysis to select? A simplified interpretation. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 667–678 (201311-12). doi:10.1684/abc.2013.0913

39. Corso, A. & Mangiacavalli, S. NON-SECRETORY MYELOMA: READY FOR A NEW DEFINITION? *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **9**, e2017053 (2017).

40. on behalf of the International Myeloma Working Group27 *et al.* International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* **23**, 215–224 (2009).

41. Bidet, A., Marit, G. & Bérard, A. M. [Clinical value of the blood measurement of the free light chains of immunoglobulins]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **66**, 427–431 (2008).

42. Kumar, S. *et al.* International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **17**, e328–e346 (2016).

43. Laforet, M. *et al.* Evolution in the treatment of multiple myeloma and impact on dialysis independence: data from a French cohort from 1999 to 2014. *Blood Cancer J.* **6**, e409–e409 (2016).

44. Gonsalves, W. I. *et al.* Utilization of hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus statement. *Bone Marrow Transplant.* **54**, 353–367 (2019).

45. Rajkumar, S. V. *et al.* Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* **117**, 4691–4695 (2011).

46. Frerichs, K. A. *et al.* CD38-targeting antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **14**, 197–206 (2018).

47. Usmani, S. Z. *et al.* Subcutaneous delivery of daratumumab in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood* **134**, 668–677 (2019).

48. Clemens, P. L. *et al.* Pharmacokinetics of Daratumumab Following Intravenous Infusion in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma After Prior Proteasome Inhibitor and Immunomodulatory Drug Treatment. *Clin. Pharmacokinet.* **56**, 915–924 (2017).

49. Ovacik, M. & Lin, K. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development: Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics. *Clin. Transl. Sci.* **11**, 540–552 (2018).

50. Xu, X. S. *et al.* Pharmacokinetics and Exposure-Response Analyses of Daratumumab in Combination Therapy Regimens for Patients with Multiple Myeloma. *Adv. Ther.* **35**, 1859–1872 (2018).

51. Moreau, P. *et al.* Practical Considerations for the Use of Daratumumab, a Novel CD38 Monoclonal Antibody, in Myeloma. *Drugs* **76**, 853–867 (2016).

52. Blair, H. A. Daratumumab: A Review in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Drugs* **77**, 2013–2024 (2017).

53. van de Donk, N. W. C. J. *et al.* Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood* **127**, 681–695 (2016).

54. Rosenberg, A. S., Bainbridge, S., Pahwa, R. & Jialal, I. Investigation into the interference of the monoclonal antibody daratumumab on the free light chain assay. *Clin. Biochem.* **49**, 1202–1204 (2016).

55. van de Donk, N. W. C. J. *et al.* Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA). *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **54**, (2016).

56. Oberle, A. *et al.* Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection. *Haematologica* **102**, e368–e370 (2017).

57. Nijhof, I. S. *et al.* CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood* **128**, 959–970 (2016).

58. Rabut, É., Castro-Fernandez, A., Le Gall, V. & Meknache, N. Case report: serological testing interference of daratumumab (anti-CD38) therapy in multiple myeloma. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **75**, 351–355 (2017).

59. Deneys, V. *et al.* Daratumumab: Therapeutic asset, biological trap! *Transfus. Clin. Biol.* **25**, 2–7 (2018).

60. McCudden, C. *et al.* Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **54**, (2016).

61. Caillon, H. *et al.* Overcoming the Interference of Daratumumab with Immunofixation Electrophoresis (IFE) Using an Industry-Developed Dira Test : Hydrashift 2/4 Daratumumab. *Blood* **128**, 2063–2063 (2016).

62. Thoren, K. L., Pianko, M. J., Maakaroun, Y., Landgren, C. O. & Ramanathan, L. V. Distinguishing Drug from Disease by Use of the Hydrashift 2/4 Daratumumab Assay. *J. Appl. Lab. Med.* **3**, 857–863 (2019).

63. Mills, J. R. & Murray, D. L. Identification of Friend or Foe: The Laboratory Challenge of Differentiating M-Proteins from Monoclonal Antibody Therapies. *J. Appl. Lab. Med. AACC Publ.* **1**, 421–431 (2017).

Annexe

Données cliniques et thérapeutiques des 70 patients de la cohorte

IDENTIFICATION	ÂGE	DATE DU DIAGNOSTIC DE MYÉLOME	ISOTYPE Ig MONOCLONALE	DATE D'INITIATION DU DARATUMUMAB	PROTOCOLE DARATUMUMAB	TRAITEMENTS ANTÉRIEURS	RÉPONSE AU DARATUMUMAB
Patient n°1	70 ans	mars 2005	CLL κ	24/10/2016	Daratumumab seul	Td et autogreffe, puis Rd, puis VMP, puis Pd, puis DCEP, puis VCd	RP puis maladie en progression puis décès
Patient n°2	75 ans	mars 2011	IgG κ	juin 2016	Daratumumab seul	MPT, puis Vd, puis Rd, puis Bendamustine, puis Pd	maladie stable puis en progression
Patient n°3	48 ans	juin 2010 ; associé à une amylose AL	IgG λ	27/02/2017	Daratumumab seul	VMP, puis VCd, puis Rd, puis Pd	décès
Patient n°4	68 ans	novembre 2009	CLL κ	06/11/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	Vd et autogreffe, puis VTd et autogreffe, puis Rd, puis Pd, puis Bendamustine + Bortézomib + Dexaméthasone, puis Cyclophosphamide + Bortézomib	rechute
Patient n°5	71 ans	février 2006	CLL κ	05/05/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	Vd et autogreffe, puis Lénalidomide, puis VMP, puis MPT, puis Pd	TBRP
Patient n°6	67 ans	décembre 1999	CLL λ	07/06/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et autogreffe, puis Thalidomide, puis allogreffe, puis Bortézomib, puis Vd, puis Lénalidomide, puis Pd	rechute
Patient n°7	73 ans	mai 2015 ; compliqué en juin 2016 d'une amylose AL	CLL κ	juin 2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VCd, puis Rd, puis Pd	maladie en progression
Patient n°8	75 ans	septembre 2009	IgG λ	30/10/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	Rd, puis VMP, puis Pd, puis Bortézomib + Bendamustine + Dexaméthasone	maladie en progression
Patient n°9	83 ans	novembre 2013	IgG κ et CLL κ	26/06/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VMP, puis Vd puis VCd, puis MP, puis Rd, puis Pd, puis Vd	maladie en progression
Patient n°10	75 ans	1998	IgA κ et CLL κ	07/04/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et autogreffe, puis VMP, puis Bendamustine, puis Rd, puis Pd	décès
Patient n°11	71 ans	juillet 2011	IgG κ	06/02/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VMP + Dexaméthasone, puis Rd, puis Pd	TBRP
Patient n°12	65 ans	janvier 2013	IgG κ	01/06/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VCd et autogreffe, puis Rd, puis Pd	maladie en progression puis décès
Patient n°13	56 ans	octobre 2012	IgG κ	04/05/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd, puis Rd	rechute
Patient n°14	78 ans	janvier 2003	IgG κ	16/01/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	MPT, puis Vd, puis Rd, puis Bendamustine, puis Dexaméthasone et Cyclophosphamide, puis Pd	TBRP puis maladie en progression
Patient n°15	75 ans	novembre 2005	IgG λ	03/07/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et autogreffe, puis Vd, puis Rd, puis Bendamustine, puis Pd	RP puis évolution en LA de Burkitt et décès
Patient n°16	62 ans	septembre 2014	IgA κ	27/04/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	KCd, puis IRd, puis Bortézomib + Panobinostat + Dexaméthasone	maladie en progression puis décès
Patient n°17	62 ans	avril 2012	IgG λ	14/06/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd et autogreffe, puis Rd, puis VPd	rechute puis décès
Patient n°18	50 ans	avril 2010	CLL κ	13/05/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	Vd et autogreffe, puis VTd, puis Bendamustine, puis PCd et autogreffe, puis RCd	maladie en progression puis décès
Patient n°19	69 ans	janvier 2007	IgG κ	03/10/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et Vd et double autogreffe avec consolidation et entretien par Revlimid, puis VMP, puis Pd	maladie en progression
Patient n°20	69 ans	janvier 2014	CLL κ	04/11/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	Vd, puis VMP, puis Rd, puis Bendamustine + Prednisone, puis PCd	maladie en progression
Patient n°21	62 ans	septembre 2016	IgG κ	08/03/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd, puis RCd	maladie en progression
Patient n°22	53 ans	novembre 2013	IgG λ	06/01/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd et autogreffe, puis VCd et PAD en alternance et autogreffe, puis PCd	RM puis maladie en progression

IDENTIFICATION	ÂGE	DATE DU DIAGNOSTIC DE MYÉLOME	ISOTYPE Ig MONOCLONALE	DATE D'INITIATION DU DARATUMUMAB	PROTOCOLE DARATUMUMAB	TRAITEMENTS ANTÉRIEURS	RÉPONSE AU DARATUMUMAB
Patient n°23	57 ans	novembre 2002	IgG κ	10/06/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et double autogreffe, puis Rd, puis Vd, puis VTd et autogreffe, puis Pd, puis Bendamustine, puis VCd	RP puis maladie en progression
Patient n°24	72 ans	janvier 2006	IgG κ	13/03/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et autogreffe, puis Td, puis Vd et autogreffe, puis Rd, puis VCd, puis Pd	maladie en progression
Patient n°25	66 ans	avril 2010 (découvert sur plasmocytome)	IgG κ	29/06/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	Vd, puis VTd et autogreffe, puis VRd, puis PCd	RC
Patient n°26	53 ans	août 2013	IgG λ	24/11/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd et autogreffe, puis Rd, puis Bendamustine + Bortézomib + Dexaméthasone, puis Pd, puis VCd	RM puis maladie en progression
Patient n°27	65 ans	juillet 2006	IgA κ	28/02/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	VAD et autogreffe, puis Rd, puis VTd et autogreffe, puis Bendamustine, puis Pd	TBRP puis maladie en progression
Patient n°28	54 ans	décembre 2013	IgG κ	23/06/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VTd et autogreffe, puis Rd, puis Vd et VCd et Cyclophosphamide, puis Pd	RP puis maladie en progression puis décès
Patient n°29	71 ans	février 2011	IgG κ	26/09/2016	Daratumumab + Dexaméthasone	VMP, puis Rd, puis Bendamustine, puis Pd, puis Cyclophosphamide + Dexaméthasone	maladie stable puis en progression puis décès
Patient n°30	81 ans	novembre 2004	IgG λ	19/12/2017	Daratumumab + Dexaméthasone	MP, puis Td, puis Vd, puis Rd, puis Bendamustine, puis Pd, puis VCd	maladie stable puis décès
Patient n°31	59 ans	janvier 2008	IgA κ	12/04/2018	Daratumumab + Dexaméthasone	VRd et autogreffe, puis VTd et autogreffe, puis PCd	rechute
Patient n°32	46 ans	septembre 2013	IgA κ et CLL κ	23/04/2018	Daratumumab + Dexaméthasone	VCd et autogreffe, puis RCd, puis allogreffe, puis Pd	RC puis rechute
Patient n°33	57 ans	février 2012 ; évolution en juin 2017 en leucémie à plasmocytes	IgA κ et CLL κ	15/06/2017	Daratumumab + Dexaméthasone + Melphalan	VTd et autogreffe, puis VCd et autogreffe, puis Rd, puis VPd	rechute puis décès
Patient n°34	60 ans	août 2010	IgG κ	11/07/2016	Daratumumab + Dexaméthasone, puis + Melphalan	Vd, puis VTd et autogreffe, puis Rd, puis Bendamustine, puis Pd, puis MP, puis Cyclophosphamide + Dexaméthasone	rechute
Patient n°35	44 ans	février 2018	CLL κ	11/04/2018	Daratumumab + Pd (en induction d'une double autogreffe)	VRd : Réfractaire primaire	TBRP
Patient n°36	66 ans	février 2012	IgG κ	21/01/2015	POLLUX (Daratumumab + Rd)	VTd et autogreffe	TBRP
Patient n°37	48 ans	décembre 2016	IgG λ	03/01/2018	CANDOR (Daratumumab + Kd)	VTd et autogreffe	TBRP puis maladie en progression
Patient n°38	67 ans	janvier 2009	IgG λ et CLL λ	08/02/2017	MMY1001 (bras Daratumumab + Kd)	Vd et double autogreffe, puis Rd, puis Pd	maladie stable puis en progression
Patient n°39	65 ans	février 2015	IgA κ	25/04/2017	MMY1001 (bras Daratumumab + Kd)	VTd, puis DCEP, puis double autogreffe	RCs
Patient n°40	69 ans	mai 2011	IgG κ	21/02/2018	COLUMBA (bras Daratumumab SC)	VRd et autogreffe avec entretien par Lénalidomide, puis PCd, puis VMP	RP puis maladie en progression
Patient n°41	66 ans	1986	IgG λ et CLL λ	24/04/2018	COLUMBA (bras Daratumumab SC)	VAD et autogreffe, puis Bortézomib, puis Rd, puis Vd et autogreffe, puis VMP, puis Dexaméthasone	maladie stable
Patient n°42	73 ans	novembre 2008	IgA κ	08/03/2018	COLUMBA (bras Daratumumab IV)	Vd et autogreffe, puis Rd, puis Bortézomib + Cyclophosphamide, puis Pd, puis Bortézomib + Panobinostat + Dexaméthasone	RP puis maladie en progression
Patient n°43	78 ans	juillet 2015	IgG λ	18/06/2018	PLEIADES (bras Daratumumab SC + Rd)	MP	TBRP

IDENTIFICATION	ÂGE	DATE DU DIAGNOSTIC DE MYÉLOME	ISOTYPE Ig MONOCLONALE	DATE D'INITIATION DU DARATUMUMAB	PROTOCOLE DARATUMUMAB	TRAITEMENTS ANTÉRIEURS	RÉPONSE AU DARATUMUMAB
Patient n°44	51 ans	février 2017	IgG λ et CLL λ	02/03/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RCs MRD négative
Patient n°45	60 ans	mars 2017	CLL κ	25/04/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RCs MRD négative
Patient n°46	57 ans	avril 2017	IgG κ et CLL κ	16/05/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RCs MRD négative
Patient n°47	42 ans	février 2017	IgG λ et CLL λ	28/03/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RP
Patient n°48	53 ans	septembre 2016	IgG λ et CLL λ	11/10/2016	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RCs MRD positive puis rechute
Patient n°49	56 ans	janvier 2016	IgG κ	02/02/2016	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RC MRD négative
Patient n°50	60 ans	septembre 2015	IgA κ puis IgG λ (nouveau clone)	24/11/2015	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd)		RCs MRD négative
Patient n°51	54 ans	mars 2017	CLL κ	11/04/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)		RC MRD positive
Patient n°52	65 ans	janvier 2016	CLL κ	23/02/2016	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)		RC MRD négative
Patient n°53	47 ans	octobre 2016	IgG κ	22/11/2016	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)		TBRP
Patient n°54	61 ans	juillet 2015	IgA κ	13/06/2017	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs
Patient n°55	58 ans	novembre 2015	CLL κ	04/10/2016	CASSIOPEIA (Daratumumab + VTd, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs MRD négative
Patient n°56	64 ans	octobre 2015 (évolution de plasmocytome diagnostiqué en octobre 2014)	IgG κ	27/09/2016	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs MRD négative
Patient n°57	37 ans	septembre 2015	IgG κ	02/08/2016	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		TBRP
Patient n°58	58 ans	janvier 2016	IgA κ et CLL κ	13/10/2016	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs MRD négative
Patient n°59	41 ans	mars 2016	IgA κ et CLL κ	01/02/2017	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		RC
Patient n°60	57 ans	septembre 2016	CLL λ	28/09/2017	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs
Patient n°61	61 ans	avril 2017	IgG κ et CLL κ	14/03/2018	CASSIOPEIA (bras VTd seul, puis Entretien par Daratumumab seul)		RCs MRD négative puis rechute puis décès
Patient n°62	79 ans	octobre 2016	IgG κ	27/10/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		TBRP
Patient n°63	70 ans	juin 2016	IgA λ	07/07/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		RCs MRD négative
Patient n°64	67 ans	novembre 2015 (découvert sur plasmocytome)	IgA κ	03/02/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		RC MRD positive
Patient n°65	73 ans	mai 2016	IgG λ	09/06/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		TBRP
Patient n°66	75 ans	décembre 2015	IgG κ	14/01/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		TBRP
Patient n°67	69 ans	janvier 2016	IgG λ	27/01/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		TBRP puis maladie en progression
Patient n°68	66 ans	juin 2016	IgA λ	20/07/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		RCs MRD positive puis rechute
Patient n°69	66 ans	janvier 2016	IgG κ	28/01/2016	MAIA (Daratumumab + Rd)		RC MRD négative
Patient n°70	65 ans	octobre 2015	IgG κ et CLL κ	03/11/2015	MAIA (Daratumumab + Rd)		RCs

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

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

RÉSUMÉ :
Le myélome multiple est une hémopathie maligne actuellement toujours incurable, mais dont les traitements ont considérablement évolué au cours des deux dernières décennies. Le Daratumumab, anticorps monoclonal anti-CD38, a montré une efficacité significative en termes de survie, et ses indications vont concerner un nombre croissant de patients. Mais son utilisation engendre aussi des difficultés dans le suivi, en interférant dans l'interprétation de plusieurs examens biologiques. En particulier, sa détection sur les examens incontournables de suivi, électrophorèse et immunofixation des protéines sériques, peut amener à méconnaître une Réponse Complète. Un test semi-automatisé a été commercialisé par la société Sebia sous le nom d'Hydrashift 2/4 Daratumumab® permettant de lever l'interférence sur l'immunofixation en modifiant la mobilité électrophorétique du Daratumumab.
Afin d'évaluer la technique, nous avons testé l'Hydrashift sur une cohorte de patients du service d'hématologie clinique du CHU de Bordeaux. Nous avons analysé la cinétique d'apparition de l'interférence au cours de la séquence thérapeutique. Notre étude confirme l'utilité de l'Hydrashift pour l'interprétation des immunofixations de patients traités par Daratumumab. Un algorithme décisionnel de la prescription de ce test est proposé pour son utilisation adaptée en pratique quotidienne garantissant ainsi une évaluation fiable, en toutes circonstances, de la réponse au traitement dans le suivi de ces myélomes.

TITLE and ABSTRACT :
Multiple myeloma treatment with Daratumumab : interference in biological response assessment and interest of Sebia Hydrashift for serum immunofixation electrophoresis interpretation

Multiple myeloma is an hematological malignancy that is still incurable to this day, but whose treatments have considerably evolved over the last two decades. Daratumumab, an anti-CD38 monoclonal antibody, has demonstrated a significant efficacy in terms of survival, and its indications will involve an increasing number of patients. But its use also causes troubles in follow-up, by interfering with interpretation of several biological tests. In particular, its detection on serum protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis which are key monitoring assays may lead to mask a Complete Response. A semi-automated test named Hydrashift 2/4 Daratumumab® was marketed by Sebia company, enabling to remove interference on immunofixation electrophoresis by modifying the electrophoretic mobility of Daratumumab.
In order to evaluate this assay, we tested the Hydrashift on a cohort of patients from clinical hematology department of the University Hospital of Bordeaux. We analyzed the kinetics of appearance of interference during the therapeutic sequence. Our study confirms the usefulness of Hydrashift for the interpretation of immunofixation electrophoresis in patients treated with Daratumumab. A decision-making algorithm for prescribing this test is proposed for an appropriate use in daily practice, thus warranting in all circumstances a reliable assessment of response to treatment in the follow-up of these myelomas.

DISCIPLINE : Biologie Médicale

MOTS-CLÉS : Myélome - Daratumumab - Immunofixation sérique - Anti-CD38 - Interférence biologique - Hydrashift - DIRA - Électrophorèse des protéines sériques

---

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :
Laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique - CHU de BORDEAUX - Groupe Hospitalier Pellegrin - Place Amélie Raba-Léon - 33000 BORDEAUX